

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIA TEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
ARENGUBIOLOOGIA ÕPPETOOL

Marii Ojastu

Guaniini nukleotiidivahetusfaktor RIC8 koduhiire ekstra-embrüonaalsete kudede arengus

Magistritöö

Juhendajad: MSc Sirje Lulla

PhD Tambet Tõnissoo

TARTU 2015

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	6
KIRJANDUSE ÜLEVAADE	8
1. Ekstra-embrüonaalsete kudede areng	8
1.1 Primaarsed trofoblasti gigantrakud	8
1.2 Parietaalne endoderm ja Reichert'i membraan	11
1.3 Vistseraalne endoderm	14
2. Guaniini nukleotiidivahetusfaktor RIC8	16
2.1 RIC8 üldine iseloomustus	16
2.2 RIC8 roll rakujagunemises	18
2.3 RIC8 roll rakkude migratsioonis ja adhesioonis	20
2.4 RIC8 roll aktiini tsütoskeleti dünaamikas	21
2.5 RIC8 koduhiire embrüonaalses arengus	22
EKSPERIMENTAALNE OSA	23
Töö eesmärk	23
3. Materjal ja meetodika	23
3.1 Kasutatud hiireliin	23
3.2 Parafiinlõikude valmistamine	23
3.3 Laser-mikrodissektatsioon	24
3.4 Immunohistokeemia parafiinlõikudele	24
3.5 Hematoksüliin-eosiin värving parafiinlõikudele	25
3.6 Embrüote dissekteerimine	25
3.7 <i>Whole-mount</i> immunohistokeemia	25
3.8 Embrüote genotüpiseerimine	26
3.9 Preparaatide pildistamine	27
3.10 Morfomeetrilised mõõtmised ja statistika	27
4. TULEMUSED	29
4.1 <i>Ric8^{-/-}</i> embrüote Reichert'i – ja basaalmembraani kirjeldamine vanuses E6.5	29
4.2 <i>Ric8^{-/-}</i> embrüote rebukoti morfomeetiline analüüs	34
4.3 <i>Ric8^{-/-}</i> embrüote ekstra-embrüonaalse vistseraalse endodermi iseloomustamine	39

ARUTELU.....	43
KOKKUVÕTE	47
SUMMARY.....	48
TÄNUSÕNAD.....	49
KIRJANDUSE LOETELU.....	50
LIHTLITSENTS.....	61

KASUTATUD LÜHENDID

AVE – anterioorne vistseraalne endoderm

Baz – *bazooka*

BM - basaalmembraan

CCT – *chaperonin-containing t-complex polypeptide 1*

Cer1 – *cerberus1*

DAPI – *4',6-Diamidino-2-phenylindole*

dNTP – nukleotiid trifosfaat

DRIP79 – *dopamine-receptor interacting protein 79*

DVE – distaalne vistseraalne endoderm

EDTA – etüleendiamiintetraatsetaat

EMT – epiteeliaal-mesenhümaalne transitsioon

ExVE – ekstra-embrüonaalne vistseraalne endoderm

ExM – ekstra-embrüonaalne mesoderm

FGF4 – *fibroblast growth factor 4*

Fog – *folded gastrulation*

GAP – GTPaase aktiveeriv valk

GATA4/6 – *GATA binding protein 4/6*

GDI – guaniini nukleotiidi dissotsiatsiooni inhibiitor

GDP – guanosiin difosfaat

GEF – guaniini nukleotiidivahetusfaktor

GPCR – *G-protein coupled receptor* (G valkudega seotud retseptor)

GTP – guanosiin trifosfaat

ICM – *inner cell mass* (sisemine rakumass)

Lefty1 – *left-right determination factor 1*

Lama-1 – laminiin-a1

Ln1 – laminiin-1

MMP9 – maatriks metalloproteaas-9

NuMa – *nuclear mitotic apparatus protein*

PBS – fosfaatpuhverdatud soolalahus

PCR – polümeraas ahelreaktsioon

PE – primitiivne endoderm

PEN – *polyethylen naphthalate*

PFA - paraformaldehüüd

Pins – *partner of inscuteable*

PhLP-1 – *phosducin like protein-1*

PL-1 – platsentaalne laktogeen-1

Pr13d1 – *prolactin family 3, subfamily d, member 1*

pTG rakk – primaarne trofoblasti gigantrakk

PTHrP – *parathyroid hormone related protein*

RhoA – *Ras homolog gene family, member A*

RIC8 – *resistance to inhibitors of cholinesterase 8*

RM – Reichert'i membraan

TAE - tris-atsetaat-EDTA

TE – trofektoderm

VE – vistseraalne endoderm

YS – *yolk sac* (rebukott)

SISSEJUHATUS

Imetajate ekstra-embrüonaalsete kudede normaalne areng on hädavajalik embrüo korrektseks implanteerumiseks emakasse ning raseduse edukaks kulgemiseks. Ekstra-embrüonaalsed koed vahendavad embrüo kontakti ema organismiga ning nad omavad olulist rolli embrüo kaitsmisel ema immuunsüsteemi eest ja embrüo varustamisel toitainetega. Ekstra-embrüonaalsete kudede arengudefektide puhul ei kujune embrüo ja ema organismi vahel välja funktsionaalset kontakti ning seetõttu on sellised defektid paljudel juhtudel embrüonaalselt letaalsed. Lisaks sellele võivad ekstra-embrüonaalsete kudede defektid panna ohtu ka ema tervise. Näiteks on üheks selliseks ekstra-embrüonaalsete kudede defektist põhjustatud haiguseks preeklampsia, mis võib raskematel juhtudel viia ema või loote surmaga lõppevate tüsistusteni.

Heaoluühiskonnas on üha kasvavamaks probleemiks viljatus, mille lahendusena nähakse *in vitro* viljastamist. Ka *in vitro* viljastamisel on kriitilise tähtsusega kehaväliselt viljastatud munaraku edukas implanteerumine emakasse, mis sõltub nii emaka vastuvõtlikkusest kui ka ekstra-embrüonaalsete kudede funktsionaalsusest. Samuti katkevad paljud loomulikul teel tekkinud rasedused implantatsiooni staadiumis ning pole võimalik täpselt hinnata kui suur hulk rasedusi sel põhjusel avastamata jääb. Arvestades seda, kui tähtis on raseduse varajane staadium raseduse edukaks kulgemiseks on oluline uurida nende kudede arengut, mis mängivad varajase raseduse edukal kulgemisel olulist rolli. Kuigi hiire ekstra-embrüonaalsete kudede areng erineb mõneti inimese ekstra-embrüonaalsete kudede arengust, siis on hiir siiski hea mudelorganism selleks, et uurida ekstra-embrüonaalsetes kudedes toimuvaid molekulaarseid mehhanisme.

Käesolevas magistritöös on käsitletud loomariigis konserveerunud guaniini nukleotiidivahetusfaktor RIC8 võimalikku rolli hiire ekstra-embrüonaalsete kudede arengus. On teada, et *Ric8* homosügootset mutatsiooni kandvad embrüod surevad gastrulatsiooni staadiumis omades erinevaid arengudefekte embrüonaalsetes kudedes. *Ric8*^{-/-} embrüote ekstra-embrüonaalsete kudede arengut pole varasemalt põhjalikult uuritud. Magistritöö eesmärgiks on analüüsida ja kirjeldada *Ric8*^{-/-} embrüote ekstra-embrüonaalsete kudede morfoloogiat ja histoloogiat varajases post-implantatsioonilises arengus. Töös käsitletakse eelkõige rebukoti ja vistseraalse endodermi arengut pregastrulatsiooni ja gastrulatsiooni staadiumis.

Magistritöö teoreetilises osas antakse ülevaade koduhiire *Mus musculus* ekstra-embrüonaalsete kudede arengust alates implantatsiooni staadiumist kuni embrüonaalse vanuseni E7.5. Lisaks sellele käsitletakse teoreetilises osas guaniini nukleotiidivahetusfaktor RIC8 teadaolevaid funktsioone ning RIC8 puudusega kaasnevaid arengudefekte erinevates mudelorganismides.

KIRJANDUSE ÜLEVAADE

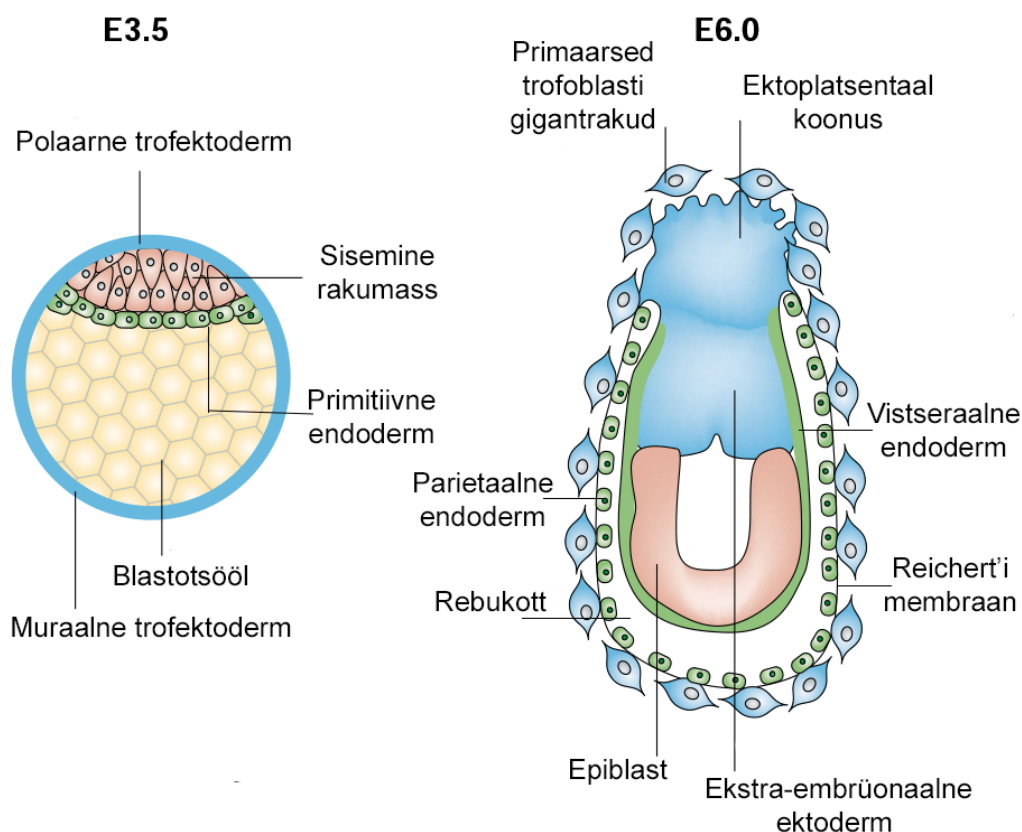
1. Ekstra-embrüonaalsete kudede areng

1.1 Primaarsed trofoblasti giganttrakud

Hiire embrüo implantatsioon emakasse algab neljanda embrüonaalse arengupäeva (E4.0) lõpus ning see toimub tänu blastotsüsti ja emakakoe vastastikkustele interaktsioonidele (Paria jt., 1993). Blastotsüsti staadiumis embrüos on eristatavad kolm koetüüpi: sisemine rakumass (ICM), primitiivne endoderm (PE) ja trofektoderm (TE) (Joonis 1). ICM paneb arengu käigus aluse embrüo kudedele ning PE ja TE panustavad ekstra-embrüonaalsete kudede arengusse (Yamanaka jt., 2006) (Joonis 1). Implantatsiooni vahendavad TE rakud, mis jagunevad polaarseteks ja muraalseteks TE rakkudeks vastavalt paiknemisele ICM suhtes (Joonis 1). Polaarne TE on kontaktis sisemise rakumassiga ning tänu sealt lähtuvatele signaalidele jätkub polaarsete TE rakkude proliferatsioon ka pärast implantatsiooni staadiumit ning neist arenevad ekstra-embrüonaalne ektoderm, ektoplatsentaalkoonus ja moodustuva platsenta trofoblasti rakud (Rossant, 2001). Muraalse TE rakud, mis pole kontaktis sisemise rakumassiga, lõpetavad implantatsiooni staadiumis jagunemise, kuid neis jätkub DNA endoreduplikatsioon ning nad diferentseeruvad primaarseteks trofoblasti giganttrakudeks (pTG rakk) (Cross jt., 1994; Rossant, 2001). Lõplikult diferentseerunud ja diferentseerumata seisundi regulatsioonis on üheks oluliseks komponendiks FGF4 (*fibroblast growth factor 4*), mille signaal takistab sisemise rakumassiga kontaktis olevate trofoblastide diferentseerumist pTG rakkudeks (Leunda-Casi jt., 2001). Muraalse TE päritolu pTG rakud omavad arvukalt erinevaid funktsioone nii implantatsioonilise kui ka post-implantatsioonilise arengu käigus. pTG rakud vahendavad blastotsüsti kontakti emaka epiteeliga, kutsuvad esile detsidualiseerumist ja tungivad emaka stroomasse. Nende protsesside tulemusena luuakse ema ja lootevaheline ühendus, mille kaudu toimub toitainete ja endokriinsete signaalide vahendamine enne funktsionaalse platsenta välja kujunemist (Cross jt., 1994).

Emaka ettevalmistamine embrüo implantatsiooniks toimub ema organismi poolt toodetud suguhormoonide progesteron ja östrogeen koostoimel (Dey jt., 2004). Progesteron ja östrogeen reguleerivad embrüo ja emakakoe vahelisi interaktsioone ning võimaldavad embrüot ümbritseva emaka endomeetriumi detsidualiseerumist (Ramathal jt.,

2010). TE interaktsioon emaka epiteeliga kutsub esile muutusi emakakoe geeniekspressioonis, mis on samuti vajalik detsidualiseerumiseks ja implantatsiooni efektiivseks toimumiseks (Paria jt., 2001). Detsidualiseerumise käigus moodustunud emaka detsiidua on oluline varajase tiinuse säilitamiseks ja embrüo kasvamiseks ning jääb embrüot ümbritsema kuni funktsionaalse platsenta välja kujunemiseni vanuses E10.5 (Ramathal jt., 2010).



Joonis 1. Hiire embrüo preimplantatsioonilises ja postimplantatsioonilises staadiumis. Vanuses E3.5 on embrüo blastotsüsti staadiumis ning koosneb trofektodermist (sinine), sisemisest rakumassist (roosa) ja primitiivsest endodermist (roheline). Trofektoderm jaguneb polaarseks ja muraalseks trofektodermiks vastavalt oma paiknemisele sisemise rakumassi suhtes. Polaarne trofektoderm on kontaktis sisemise rakumassiga ning muraalne trofektoderm ümbritseb blastotsöoli. Vanuses E6.0 on embrüo saavutanud munasilindri staadiumi. Muraalse trofektodermi rakkudest on arenenud primaarsed trofoblasti gigantrakud, mis on kontaktis Reichert'i membraaniga. Reichert'i membraani rebukoti poolsele pinnale paiknevad parietaalse endodermi rakud, mille eellaseks on primitiivse endodermi rakud, mis blastotsüsti staadiumis säilitasid kontakti trofektodermiga. Polaarse trofektodermi rakkudest arenevad ekto-plantsentaalkoonus ja ekstra-embrüonaalne ektoderm. Sisemisest rakumassist on arenenud epiblast, mida katab primitiivse endodermi rakkude diferentseerumisena tekkinud vistseraalne endoderm. Epiblasti sisemuses paikneb proamniootiline õõs. Joonis modifitseeritud (Rossant ja Cross, 2001) järgi.

Muraalse TE rakkude diferentseerumine pTG rakkudeks algab implantatsiooni staadiumis ning hõlmab endas muutusi rakkude polaarsuses, liikuvuses ja adhesioonivõimes (Sutherland, 2003). TE kontakt emaka epiteeliga toob kaasa emaka epiteeli rakkude apoptoosi ja võimaldab TE otsest kontakti emaka epiteeli all paikneva basaalmembraani ja emaka stroomaga (Aplin ja Kimber, 2004). Erinevatel basaalmembraani komponentidel on trofoblastide diferentseerumisele erinev mõju (Klaffky jt., 2001; Schultz jt., 1997). Trofoblastide rakukultuuris on näidatud, et trofoblastide proliferatsiooni ja migratsiooni edukus sõltub sellest missugust tüüpi laminiini rakkude maatriks sisaldab (Klaffky jt., 2001). Näiteks takistab laminiin-I ($\alpha 1\beta 1\gamma 1$) trofoblasti rakkude proliferatsiooni (Klaffky jt., 2001). Kuna varajases arengus ekspresseeruvad erinevates embrüo ja emaka piirkondades erinevad laminiini subühikud, siis on võimalik trofoblasti gigantrakkude diferentseerumise kontroll läbi erinevate laminiini subühikute ekspressiooni (Klaffky jt., 2001; Miner jt., 2004; Shim jt., 1997).

TE adhesioonis basaalmembraanile on oluline roll integriini perekonna valkudel (Sutherland, 2003). Trofoblastide adhesioonis ja migratsioonis fibronektiini maatriksil osalevad integriinid $\alpha 5\beta 1$, $\alpha V\beta 3$ ja $\alpha IIb\beta 3$, mis lokaliseeruvad fokaalse adhesiooni kompleksidesse (Rout jt., 2004). Kontakt basaalmembraani komponendi fibronektiiniga kutsub esile $\alpha 5\beta 1$ integriini ümberpaigutumist TE rakkudes ning mõjutab seeläbi trofoblastide diferentseerumist ja integriinidest sõltuvat adhesiooni basaalmembraanile (Schultz jt., 1997). Integriin $\alpha 4\beta 1$ ekspresseerub implantatsiooni käigus nii TE rakkudes kui implantatsioonisaedis vastusena östrogeeni toimele (Basak jt., 2002). Integriin $\beta 1$ mutantsed blastotsüstid on võimelised implanteeruma ning nende TE areng kulgeb normaalselt. Trofoblastide kinnitumine emaka detsiidualle on aga nõrk ning mutandid surevad vanuses E5.5 tänu erinevatele arengudefektidele, mis hõlmavad peamiselt sisemise rakumassi väärearengut (Stephens jt., 1995).

Lisaks integriinide ekspressioonile ja muutustele rakkude polaarsuses toimuvad trofoblastide diferentseerumise käigus ka ümberkorraldused trofoblastide aktiini tsütoskeletis (Parast jt., 2001). Trofoblasti gigantrakkude diferentseerumisel organiseerub aktiin stressifiibriteks ning tekivad fokaalsed adhesioonid raku ja ekstratsellulaarse maatriksi vahel (Parast jt., 2001). Implantatsiooni käigus omandavad muraalse TE rakud fagotsütoosi võime, mis säilib nende diferentseerumisel trofoblasti gigantrakkudeks (Rassoulzadegan jt., 2000). Aktiini tsütoskeleti remodelleerimine on eelduseks fagotsütoosi protsessi toimumisele rakkudes (May ja Machesky, 2001). Trofoblasti gigantrakkude invasioon

emaka detsiiduasse toimub fagotsütootilise mehhanismi kaudu (Parast jt., 2001). Lisaks sellele sekreteerivad trofoblasti gigantrakud ka erinevaid proteaase, mis hõlbustavad invasiooni detsiiduasse (Alexander jt., 1996; Plaks jt., 2013; Screen jt., 2008). Näiteks ekspresseerivad trofoblasti rakud tsüsteiini proteaase katepsiin-7 ja katepsiin-8, mis lisaks proteolüütilisele aktiivsusele mängivad rolli ka trofoblastide diferentseerumise regulatsioonis (Screen jt., 2008). Trofoblasti gigantrakkudes toimub ka näiteks maatriks metalloproteas-9 (MMP9) süntees (Alexander jt., 1996). *MMP9*^{-/-} embrüotes toimub MMP9 substraadi kollageen IV kuhjumine primaarsete trofoblasti gigantrakkude ümber implantatsioonisaadis ning see pärsib trofoblasti gigantrakkude funktsiooni (Plaks jt., 2013).

Lõplikult diferentseerunud pTG rakud vooderdavad implantatsioonisaiti, olles otseses kontaktis detsiiduaga. pTG rakud on omavahel ühendatud β -kateniini sisaldavate adherentsete liiduste kaudu (Parast jt., 2001). pTG rakud omavad mitmeid funktsioone ka pärast implantatsiooni toimumist, kuna nad sekreteerivad erinevaid para- ja endokriinseid faktoreid, mis on olulised tiinuse edukaks kulgemiseks. pTG rakkudes ekspresseerub *prl3dl* geen, mis kodeerib valku platsentaalne laktogeen-1 (PL-1) (Simmons jt., 2008). PL-1 stimuleerib progesterooni tootmist ema organismis (Thordarson jt., 1997). Trofektodermi päritolu ekstra-embrüonaalsed koed, kaasa arvatud pTG rakud, ekspresseerivad vere hüübimist takistavat valku trombomoduliin, mille puudus viib embrüonaalse letaalsuseni vanuses E8.5 (Isermann jt., 2003).

1.2 Parietaalne endoderm ja Reichert'i membraan

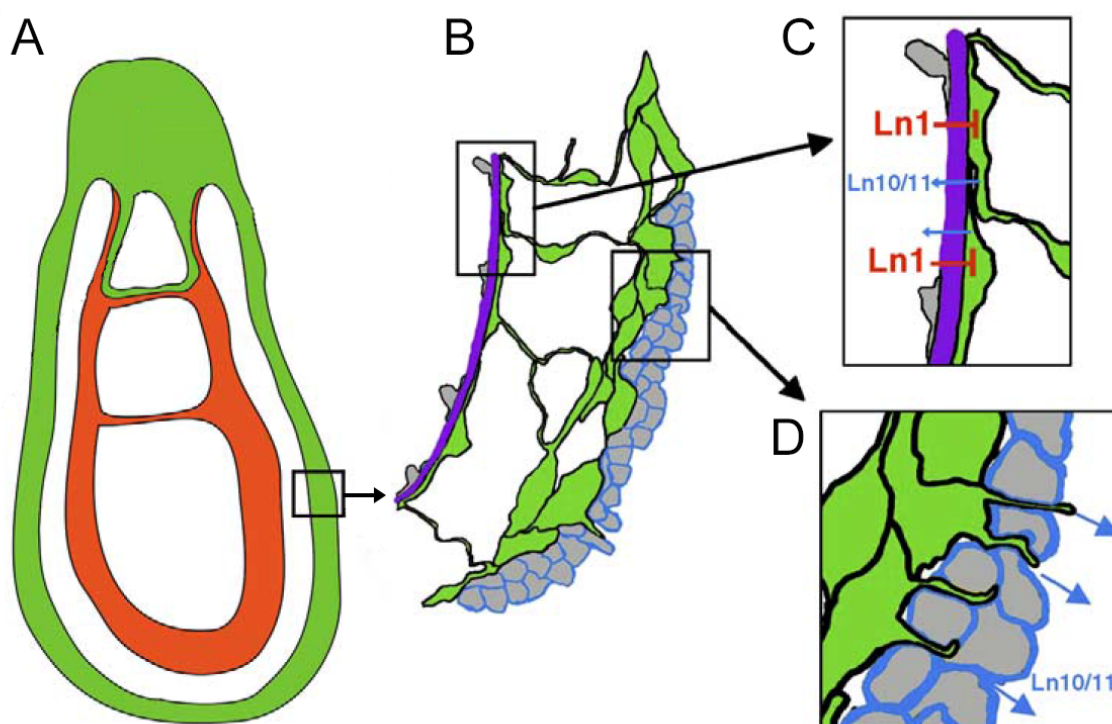
Vanuses E6.0 on hiire embrüo saavutanud iseloomuliku munasilindri kuju ning toimuvad ettevalmistused gastrulatsiooniks. Munasilindri staadiumis koosneb embrüo epiblastist, ekstra-embrüonaalsest ektodermist, ektoplatsentaalkoonusest ja rebukotist. Rebukoti moodustavad primaarsed trofoblasti gigantrakud, Reichert'i membraan, parietaalne endoderm ja vistseraalne endoderm (Joonis 1). Rebukott võimaldab ema ja embrüo vahelist toitainete ja gaaside vahetust enne funktsionaalse platsenta välja kujunemist vanuses E10.5.

Primitiivse endodermi diferentseerumine parietaalseks ja vistseraalseks endodermiks toimub vanuses E4.75. Primitiivse endodermi rakkudele on omane GATA4 (*GATA binding protein 4*) ja GATA6 (*GATA binding protein 6*) transkriptsioonifaktorite ekspressioon (Cai jt., 2008). Primitiivne endoderm, mis on kontaktis sisemise rakumassiga paneb aluse

vistseraalse endodermi arengule. Primitiivse endodermi rakkude arengus vistseraalse endodermi rakkudeks kaotavad rakud GATA6 ekspressiooni samas kui parietaalse endodermi rakkudes säilib nii GATA6 kui GATA4 ekspressioon (Cai jt., 2008). Primitiivse endodermi diferentseerumine parietaalseks endodermiks toimub läbi epiteliaal-mesenhümaalse transitsiooni (EMT) (Veltmaat jt., 2000). EMT käigus kaovad epiteliaalsete rakkude vahelt adherentsed liidused, rakud vabanevad epiteeli basaalmembraanist, toimuvad ümberkorraldused raku tsütoskeletis ja rakud on võimelised migreeruma üksikute rakkudena (Yang ja Weinberg, 2008). Üheks mehhanismiks, mille kaudu parietaalse endodermi rakkude EMT toimub on *Snail* ekspressiooni regulatsioon PTHrP (*parathyroid hormone related protein*) poolt, mille sünteesi eest vastutavad trofoblasti ja detsiidua rakud (Veltmaat jt., 2000). *Snail* osaleb EMT protsessis surudes maha E-kaderiini ekspressiooni ja vähendades seeläbi rakkude vahelist adhesiooni (Cano jt., 2000). Parietaalse endodermi rakud alustavad implantatsiooni staadiumis migreerumist ja katavad implantatsioonisaiti vooderdavate trofoblastide blastotsööli poolele jääva pinna (Bielinska jt., 1999). Parietaalse endodermi rakkude migratsioon on esimene migratsioonisündmus arenevas embrüos ning see toimub Rho signaaliraja vahendusel (Mills jt., 2005). Parietaalse endodermi rakud sünteesivad suurel hulgal Reichert'i membraani komponente laminiin-1 ja kollageen IV (Niimi jt., 2004). Lisaks sellele ekspresseerivad parietaalse endodermi rakkud ka ensüüme ja tšaperone, mis on vajalikud ekstratsellulaarse maatriksi komponentide post-translatsioonilisteks modifikatsioonideks (Futaki jt., 2003).

Reichert'i membraan on spetsiaalne ekstra-embrüonaalne struktuur, mis eksisteerib ainult näriliste ja nahkhiirte embrüogeneesis (Weiler-Guettler jt., 1996). Reichert'i membraan paikneb detsiiduaga kontaktis olevate primaarsete trofoblasti gigantrakkude ja parietaalse endodermi rakkude vahel (Joonis 2B). Reichert'i membraani koos trofoblasti gigantrakkude ja parietaalse endodermi rakkudega nimetatakse ka rebukoti platsentakts ja see vahendab toitainete ja hapniku transporti embrüosse difusiooni kaudu (Haghighi Poodeh jt., 2012). Reichert'i membraan toimib filtrina, mille kaudu liiguvad makromolekulid embrüo ja ema organismi vahel. Reichert'i membraanist pääsevad läbi üsna suured valgud nagu näiteks γ -globuliinid ja ferritiin (Smith ja Stickland, 1981). Reichert'i membraanis ekspresseeruvad erinevad laminiini subühikud, nidogeen-1 ja nidogeen-2, kollageen IV ja perlekaan (Gersdorff jt., 2005). Vanuses E7.5 osalevad Reichert'i membraani koosseisu kuuluvad laminiin-1 ja laminiin-10/11 trofoblasti gigantrakkude funktsiooni regulatsioonis (Klaffky jt., 2001, 2006; Miner jt., 2004). Reichert'i membraanis ekspresseeruvad laminiin-1

takistab trofoblastide invasiooni embrüo suunas samal ajal kui Reichert'i membraanis ekspresseeruv laminiin-10/11 võimaldab trofoblastide kontakti säilimist Reichert'i membraaniga (Joonis 2C) (Klaffky jt., 2006). Emaka detsiiduas ekspresseeruv laminiin-10/11 soodustab trofoblastide invasiooni detsiiduasse (Joonis 2D) (Klaffky jt., 2001, 2006; Miner jt., 2004). Samas ei ekspresseeru trofoblastidega kontaktis olevates emaka detsiidua rakkude basaalmembraanis laminiin-1 ja seetõttu puudub invasiooni takistav signaal detsiidua suunas (Klaffky jt., 2001).



Joonis 2. Primaarsete trofoblasti gigantrakkude interaktsioon Reichert'i membraani ja detsiiduga (A) Skemaatiline kujutis embrüost vanuses E7.5. Rohelisega on tähistatud piirkonnad kus paiknevad trofektodermi päritolu rakud. Punasega on tähistatud primitiivse endodermi ja epiblasti päritolu rakud. **(B)** Rebukoti emaka poole jääv osa, mis koosneb primaarsetest trofoblasti gigantrakkudest (roheline), Reichert'i membraanist (lilla) ja parietaalse endodermi rakkudest (hall). Primaarsed trofoblasti gigantrakud on otseses kontaktis detsiiduga (hall helesinise piirjoonega) ja Reichert'i membraaniga. **(C)** Reichert'i membraanis ekspresseerub Laminin-1 (Ln1), mis takistab primaarsete trofoblasti gigantrakkude invasiooni embrüo suunas. Reichert'i membraanis ekspresseeruv Laminin-10/11 (Ln10/11) on oluline primaarsete trofoblasti gigantrakkude adhesiooniks Reichert'i membraanile. **(D)** Detsiidua rakkudes ekspresseeruv Laminin-10/11 võimaldab primaarsete trofoblasti gigantrakkude invasiooni detsiiduasse. Samal ajal puudub detsiidua rakkudes Laminin-1, mis inhibeeriks invasiooni detsiiduasse. Joonis modifitseeritud (Klaffky jt., 2006; Sutherland 2003) järgi.

Kui arengu käigus esineb Reichert'i membraanis katkeid, siis pääsevad ema vere rakud rebukoti õõnsusse (Pöschl jt., 2004; Williamson jt., 1997). *Lama-1^{-/-}* embrüotel puudub Reichert'i membraan täielikult ning nad surevad enne vanust E7.0 (Miner jt., 2004). Reichert'i membraani komponentide välja lülitamine embrüotes kutsub lisaks esile ka hulgaliselt defekte embrüo üldises arengus. Seega ei ole üheselt selge kui suur roll on Reichert'i membraani defektidel embrüonaalse letaalsuse põhjustamises (Miner jt., 2004, Pöschl jt., 2004; Williamson jt., 1997). *Lama-1^{-/-}* embrüote puhul oletatakse, et trofoblasti rakkude diferentseerumine on tänu Reichert'i membraani puudusele häiritud ning embrüo jääb seetõttu toitainete ja hapniku puudusesse (Miner jt., 2004).

1.3 Vistseraalne endoderm

Primitiivne endoderm, mis on sisemisest rakumassist eraldatud basaalmembraaniga jääb epiteelina katma sisemist rakumassi ja sellest arenevat epiblasti, diferentseerudes vistseraalseks endodermiks (VE). Funktsionaalse VE välja kujunemisel on oluline laminiini korrektne ekspressioon VE basaalmembraanis (Åkerlund jt., 2009). Embrüoidkehades, mis on laminiin- α 1 globulaarsete domäänide 4-5 (α 1LG4-5) defitsiitsed, toimub endotsütoosis osalevate geenide ekspressiooni langus, mis viitab VE defektsele diferentseerumisele (Åkerlund jt., 2009). VE ja epiblasti vahel paiknev basaalmembraan on vajalik epiblasti rakkude polariseerumiseks ja proamniootilise õõnsuse tekkeks (Murray ja Edgar, 2000). Nendes epiblasti rakkudes, mis ei ole kontaktis basaalmembraaniga käivitub apoptoos ning selle protsessi tulemusena tekib proamniootiline õõnsus (Coucouvanis ja Martin, 1995). VE katab munasilindri staadiumis embrüos ekstra-embrüonaalset ektodermi ja epiblasti (Joonis 1). VE rakud, mis katavad epiblasti on olemuselt kuboidsed rakud, mille apikaalne pind on kaetud mikrohattudega ja sisaldab apikaalseid vakuole (Kawamura jt., 2012). VE rakud, mis paiknevad ekstra-embrüonaalsel poolel on morfoloogialt piklikumad ja neis sisalduvad apikaalsed vakuoolid on tunduvalt suuremad kui epiblasti katva VE rakkude apikaalsed vakuoolid (Kawamura jt., 2012).

VE rakkudes toimuvad endotsütootilised protsessid, mis on vajalikud toitainete ja signaalmolekulide transportimiseks embrüosse (Wallingford ja Giachelli, 2014). Emapoolsete faktorite endotsütoos vistseraalses endodermis toimub läbi mikroautofaagia sarnase protsessi (Kawamura jt., 2012). Endotsüteeritud molekulid transporditakse varajaste endosoomide abil apikaalse vakuooli pinnale, kus toimub apikaalse vakuooli membraani invaginatsioon ehk sissesopistumine (Kawamura jt., 2012). Seeläbi apikaalse vakuooli

sisemusse sattunud endosoomi ümbritseb topeltmembraan, mis koosneb endosoomi membraanist ja apikaalse vakuooli päritolu membraanist (Kawamura jt., 2012, Wada jt., 2013). VE rakkude apikaalses osas paiknevad apikaalsed vakuoolid on olemuselt spetsiaalset tüüpi lüsoosoomid (Wada jt., 2013). Apikaalses vakuoolis sisalduvad lipaasid lagundavad endosoomi ümbritseva apikaalse vakuooli päritolu membraani, seejärel laguneb endosoomi membraan ja endosoomi sisu vabaneb apikaalse vakuooli luumenisse (Kawamura jt., 2012). Kuna mikroautofaagia on imetajate rakkudes vähelevinud, siis ei ole selle protsessi täpsemad molekulaarsed mehhanismid selged (Mijaljica jt., 2011).

VE rakkudest pärinevad signaalid on vajalikud embrüo anterio-posterioorse kehatelje välja kujunemiseks ning embrüo korrektse kehaplaani kujundamiseks (Thomas ja Beddington, 1996). Vanuses E5.5 on epiblasti katva VE distaalses osas välja kujunenud spetsiifiline rakkude populatsioon, mida nimetatakse distaalseks vistseraalseks endodermiks (DVE) (Takaoka ja Hamada, 2012). DVE rakkudele on omane spetsiifiliste markerite *Cer1* ja *Lefty1* ekspressioon (Takaoka jt., 2011). Vanuses E5.5 muutub DVE rakkude morfoloogia kuboidsest silinderjaks ning DVE rakud alustavad kollektiivset proksimaalset migratsiooni tulevase anterioorse pooluse suunas (Migeotte jt., 2010). Olles jõudnud vanuses E5.75 epiblasti ja ekstra-embrüonaalse ektodermi piirile kaotavad osad DVE rakud *Lefty1* ekspressiooni ning neist saavad anterioorse vistseraalse endodermi (AVE) eellasrakud, mis migreeruvad kõigepealt tagasi embrüo distaalsesse osasse (Takaoka ja Hamada, 2012). Seal omandavad *Lefty1* negatiivsed AVE eellasrakud *Lefty1* ekspressiooni ja migreeruvad DVE rakkude järel proksimaalselt anterioorsele poolusele, kus vanuseks E6.5 on neist moodustunud funktsionaalne AVE (Takaoka ja Hamada, 2012). DVE ja AVE rakkude migreerumine vistseraalses endodermis toimub interkalatsiooni kaudu, mis mõjutab epiblasti katvat vistseraalset endodermi, kuid ei too kaasa rakkude ümberpaigutumist ekstra-embrüonaalses vistseraalses endodermis (ExVE) (Trichas jt., 2011). AVE'st tulenevate signaalide tulemusena ekspresseeruvad embrüo epiblasti anterioorsel ja posterioorsel poolusel erinevad geenid (Perea-Gomez jt., 2001). Epiblasti posterioorsele poolusele on omane *Nodal* ekspressioon, mis on vajalik ürgjuti piirkonna välja kujunemiseks (Varlet jt., 1997). *Nodal* mutantsetel embrüotel ei teki ürgjutti ja nende mesodermi rakkude migratsioon on häiritud, mistõttu ilmnevad alates vanusest E7.5 tõsised gastrulatsiooni defektid (Conlon jt., 1994). AVE's ekspresseeruvad *Lefty1* ja *Cer1* toimivad *Nodal* ekspressiooni antagonistina ja seetõttu positsioneerub ürgjutt posterioorsele poolusele (Perea-Gomez jt., 2002). Selleks, et takistada AVE migratsioon ekstra-embrüonaalsele poolusele on

geeniekspressioon ExVE ja epiblasti katva VE piirkonnas erinev (Trichas jt., 2011). ExVE piirkonnas on maha reguleeritud Dvl-2 (*Dishevelled*) valgu ekspressioon ja raku apikaalses osas üles reguleeritud F-aktiini ekspressioon. Selline modifikatsioon muudab ExVE rakud staatiliseks ning takistab AVE rakkude migreerumist ekstra-embrüonaalsele poolusele (Trichas jt., 2011).

VE rakud on vajalikud ka embrüo normaalse vaskulogeneesi (veresoonte teke) ja hematopoeesi (vererakkude teke) toimumiseks. Ekstra-embrüonaalse mesodermi (ExM) piirkonnas, mida katab ExVE tekivad vanuses E8.0 veresaared ning see tähistab embrüo vaskulogeneesi ja hematopoeesi algust (Boucher ja Pedersen, 1996). *In vitro* kultuuris on näidatud, et hematopoees saab toimida ka ilma ExVE rakkude olemasoluta, kuid vaskulogeneesiks on hädavajalik nii ExM kui ExVE olemasolu (Palis jt., 1995).

2. Guaniini nukleotiidivahetusfaktor RIC8

2.1 RIC8 üldine iseloomustus

RIC8 (*Resistance to Inhibitors of Colinesterase*) on evolutsiooniliselt konserveerunud valk, mida kirjeldati esmalt nematoodi *Caenorhabditis elegans* närvisüsteemis (Miller jt., 2000). RIC8 toimib G valkude guaniini nukleotiidivahetusfaktorina (GEF) osaledes seeläbi G valkude poolt vahendatud retseptorsõltumatus signaaliülekanDES (Tall jt., 2003). Lisaks täidab RIC8 G valkude biosünteesis tsäperoni rolli, olles vajalik vastsünteesitud Ga subühikute korrektseks voltumiseks ja lokaliseerimiseks rakus (Chan jt., 2013).

Heterotrimeersed G valgud koosnevad α , β ja γ subühikust. Inaktiivses olekus on Ga subühik seotud GDP ja $G\beta\gamma$ dimeeriga. G valkude aktiveerumiseks on vajalik Ga subühikuga seotud GDP vahetus GTP vastu, mis võimaldab Ga-GTP subühikul vabaneda $G\beta\gamma$ dimeerist. Vabanenud Ga-GTP ja $G\beta\gamma$ dimeer on seejärel võimelised järgnevateks interaktsioonideks rakusiseste efektoritega (Cabera-Vera jt., 2006).

G valkudega seotud retseptorid (GPCR - *G protein coupled receptor*) on üks suuremaid ja mitmekesisemaid valgu perekondi imetajate genoomis (Kroeze jt., 2003). GPCR vahendusel toimuvad arvukad füsioloogilised protsessid nagu näiteks närviimpulsside ülekande, rakkude metabolism, diferentseerumine ja kasv ning põletikuline- ja immuunvastus (Chattopadhyay, 2014). GPCR struktuur koosneb seitsmest

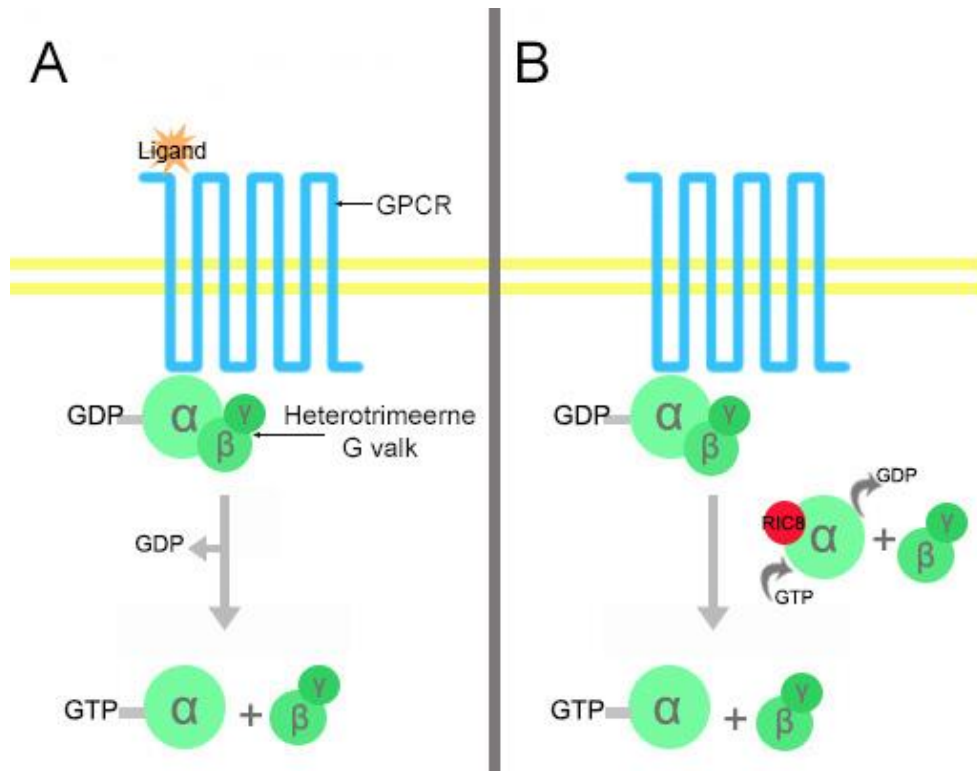
transmembraanses α -heeliksist. Retseptor paikneb plasmamembraanis ning selle ekstratsellulaarne osa vastutab ligandi seondumise eest ja intratsellulaarne osa vastutab interaktsioonide eest heterotrimeersete G valkudega (Oldham ja Hamm, 2008).

G valkude biosünteesi rajas osalevad mitmed tsaperonid, mis võimaldavad funktsionaalse heterotrimeerse G valgu korrektset moodustumist. $G\gamma$ subühiku puhul täidab tsaperoni funktsiooni valk DRIP79 (*dopamine-receptor interacting protein 79*) (Dupré jt., 2007). $G\beta$ subühiku voltumist ja seondumist $G\gamma$ subühikuga vahendavad valgud CCT (*chaperonin-containing t-complex polypeptide 1*) ja PhLP-1 (*phosducin-like protein-1*) (Wells jt., 2006; Humrich jt., 2005). $G\alpha$ subühiku tsaperoniks on RIC8, mis osaleb $G\alpha$ subühikute posttranslatsioonilisel voltumisel (Chan jt., 2013). RIC8 puudusel langeb $G\alpha$ subühikute arv rakus oluliselt, $G\alpha$ subühikute seondumine raku membraanidele on tugevalt häiritud ja toimub vastsünteesitud $G\alpha$ subühikute kiire lagundamine (Gabay jt., 2011).

G valkude aktiveerimine võib toimuda retseptorsõltuvalt ehk kanooniliselt või retseptorsõltumatult ehk mittekanoniliselt (Joonis 3). Retseptorsõltuva aktivatsiooni puhul kutsub $G\alpha$ subühiku GDP vahetuse GTP vastu esile ligandi seondumine retseptorile (Joonis 3A). Ligandi seondumine põhjustab GPCR konformatsioonilise muutuse, mis võimaldab retseptoril toimida kui guaniini nukleotiidivahetusfaktor ja võimaldada $G\alpha$ subühikul GDP vahetust GTP vastu (Wettschureck ja Offermanns, 2005). Retseptorsõltumatu mehhanismi puhul viivad aktivatsiooni läbi erinevad guaniini nukleotiidivahetusfaktorid ning ligandi seondumine retseptorile pole vajalik (Joonis 3B). Üheks selliseks guaniini nukleotiidivahetusfaktoriks on RIC8 (Hewavitharana ja Wedegaertner, 2012). RIC8 seondub $G\alpha$ -GDP subühikuga, katalüüsib GDP vabanemist ja stabiliseerib nukleotiidivaba $G\alpha$ subühikut, võimaldades GTP seondumist $G\alpha$ subühikuga (Tall jt., 2003). Imetajates leidub kaks RIC8 paralooget, RIC8A ja RIC8B, mis on mõlemad võimelised interakteeruma erinevate $G\alpha$ subühikutega (Tall jt., 2003). RIC8B on guaniini nukleotiidivahetusfaktoriks $G\alpha_s$ ja $G\alpha_q$, $G\alpha_{olf}$, $G\alpha_{13}$ subühikutele (Chan jt., 2011). RIC8A (edaspidi RIC8) toimib guaniini nukleotiidivahetusfaktorina $G\alpha_q$, $G\alpha_{i1}$, $G\alpha_o$, $G\alpha_{12}$ ja $G\alpha_{13}$ subühikutele (Tall jt., 2003, Tall ja Gilman, 2004).

RIC8 bioloogilist rolli on näidatud mitmete mudelorganismide arenguliselt tähtsates protsessides (Afshar jt., 2004; David jt., 2005; Hampoelz jt., 2005; Ruisu jt., 2013; Tõnissoo jt., 2010). RIC8 osaleb paljudes bioloogilistes protsessides nagu näiteks rakkude jagunemine, migratsioon, adhesioon ja signaaliülekanne (Fuentealba jt., 2013; Gabay jt.,

2011; Ma jt., 2012; Woodard jt., 2010). *Ric8* puudus on hiirtelele embrüonaalselt letaalne põhjustades mitmesuguseid arenguhäireid gastrulatsioonis (Gabay jt., 2011; Tõnissoo jt., 2010).



Joonis 3. G valkude retseptorsõltuv ja retseptorsõltumatu aktivatsioon. (A) G valkude retseptorsõltuv aktivatsioon. Ligandi seondumisel toimib GPCR guaniini nukleotiidivahetusfaktorina (GEF) ja soodustab GDP vahetust GTP vastu. $G\alpha$ -GTP vabaneb $G\beta\gamma$ subühikust ning mõlemad kompleksid on võimelised järgnevateks interaktsioonideks rakusiseste efektoritega. (B) G valkude retseptorsõltumatu aktivatsioon. Retseptorsõltumatu aktivatsiooni käigus võimaldab GDP-GTP vahetust GEF RIC8, mis seondub $G\alpha$ subühikuga, katalüüsib GDP hüdrolyüüsi ning stabiliseerib nukleotiidivaba $G\alpha$ subühikut võimaldades selle seondumist GTPga. (Joonis Tall jt., 2003 andmete põhjal).

2.2 RIC8 roll rakujagunemises

Rakkude mitmekesisuse tekkimiseks organismi arengus on vajalik asümmeetrilise rakujagunemise toimumine, mis võimaldab erineva suuruse ja saatusena tütarakkude teket. Asümmeetrilise rakujagunemise eelduseks on rakkude polaarsuse välja kujunemine. Asümmeetriline rakujagunemine saab toimuda tänu mitoosikäivi asümmeetrilisele paigutumisele jagunevas raku, mida põhjustab erinev mikrotuubulite mõjuv tõmbejõud

raku vastaspoolustel. Mudelorganismides *Drosophila melanogaster* ja *C. elegans* on näidatud, et mitoosikävi korrektseks paigutumiseks asümmeetrilise rakujagunemise käigus on vajalikud heterotrimeersed G valgud (Gotta ja Ahringer, 2001; Schaefer jt., 2000).

Nematoodi *C. elegans* embrüogeneesis toimub esimene rakujagunemine sügoodis (P₀) pikki anterio-posterioorset telge asümmeetriliselt ja selle tulemuseks on erineva suurusega tütararakud AB ja P₁ (Sulston jt., 1983). Selles protsessis on olulise tähtsusega G_α subühikud GAO-1 ja GPA-16, mille puudumise korral on esimene rakujagunemine sümmeetriline (Gotta ja Ahringer, 2001). G_α subühikute aktivatsioon nematoodi sügoodis toimub retseptorsõltumatult (Gotta jt., 2003). Retseptorsõltumatul aktivatsioonil osaleb ka RIC8, mis interakteerub nii GAO-1 kui ka GPA-16 subühikuga. RIC8 toimib guaniini nukleotiidivahetusfaktorina GAO-1 subühikule (Afshar jt., 2004). GPA-16 subühiku puhul tagab RIC8 selle subühiku kortikaalse lokaliseerimise, kuid ei toimi nukleotiidivahetusfaktorina (Afshar jt., 2005). *ric8* välja lülitamine nematoodi sügoodis põhjustab mitoosikävi sümmeetrilist paigutumist mistõttu on rakujagunemisel tekkivad tütararakud sama suured (Afshar jt., 2004). *ric8* ja *goa-1* topeltmutatsioon on embrüonaalselt letaalne. Hukkunud embrüod koosnevad erinevatest diferentseerunud kudede rakkudest millel puudub organiseeritus (Miller ja Rand, 2000).

Äädikakärbse *D. melanogaster* embrüogeneesis on näidatud *ric8* rolli nii neuroblastide kui ka sensoorsete eellasrakkude asümmeetrilises jagunemises (David jt., 2005; Hampoelz jt., 2005). Äädikakärbse sensoorsetes eellasrakkudes toob *ric8* välja lülitamine kaasa tugevad defektid rakkude polaarsusmarkerite Pins (*Partner of Inscuteable*) ja Baz (*Bazooka*) lokaliseerimises ning G_α subühiku ekspressioon neis rakkudes kas langeb või kaob täielikult (David, jt., 2005). Lisaks on näidatud, et Ric8 on võtmetähtsusega äädikakärbse gastrulatsioonis suunates G_α_{12/13} subühiku kortikaalset lokaliseerimist, mis on vajalik gastrulatsiooni protsesse reguleerivas Fog (ingl. k. *Folded gastrulation*) signaalirajas (Peters ja Rogers, 2013). Analoogselt nematoodi embrüotele, on Ric8 puudus ka äädikakärbse embrüotele letaalne ning *Ric8*^{-/-} embrüod surevad vastse teises staadiumis (L2) gastrulatsioonidefektide tõttu (Hampoelz jt., 2005).

Imetaja raku on mitoosikävi moodustumiseks ja korrektseks organiseerumiseks vajalik valk LGN (*G protein signaling modulator 2*) (Du jt., 2001). Mitoosi käigus moodustab LGN kompleksi valkudega NuMa (*Nuclear Mitotic Apparatus protein*) ja G_α ning see kompleks reguleerib interaktsioone astraalsete mikrotuubulite ja raku korteksi vahel

(Du ja Macara, 2004). RIC8 on võimeline aktiveerima GDP-Gai/LGN/NuMa kompleksi, vabastades kompleksist GTP-Gai ning võimaldades NuMA vabanemist LGN'ist (Tall ja Gilman, 2005). HeLa rakkudes tehtud katsed on näidanud, et RIC8 aktiivsuse inhibeerimine toob endaga kaasa mitoosikäevi orientatsiooni häireid ning juhuslikku mitoosi aresti või mitoosi ajalist pikenedamist (Woodard jt., 2010).

2.3 RIC8 roll rakkude migratsioonis ja adhesioonis

Täiskasvanud koduhiire *Mus Musculus* ajus ekspresseerub RIC8 neokorteksis, vöökäärus, juttkehas, hippokampus, väikeajus ja käbikehas (Tõnissoo jt., 2003). Kuna *ric8* homosügootne mutatsioon on embrüonaalselt letaalne, siis on RIC8 rolli uurimiseks närvisüsteemi arengus kasutatud konditsionaalseid mutante (Kask jt., 2015; Ma jt., 2012; Ruisu jt., 2013). On näidatud, et nii embrüonaalses kui postnataalses arengus on RIC8 väikeajus vajalik Bergmani gliia rakkude adhesiooniks basaalmembraanile (Ma jt., 2012). Imetaja väikeaju korteks koosneb kolmest kihist mida nimetatakse välimiseks molekulaarkihiks, keskmiseks Purkinje rakkude kihiks ja sisemiseks granulaarkihiks (Voogd ja Glickstein, 1998). Sellise struktuuri saavutamiseks on vajalikud Bergmani gliia rakud, mis võimaldavad arengus granulaarrakkude eelassakkude migratsiooni välimisest kihist sisemisse kihti (Sudarov ja Joyner, 2007). Bergmani gliia rakud on unipolaarsed pikkade fiibriga astrotsüüdid, mille rakukeha asub Purkinje rakkude kihis ja fiibrid kulgevad läbi molekulaarkihi ning on molekulaarkihi pinnal kontaktis basaalmembraaniga (Yamada ja Watanabe, 2002). Hiirtel, kelle neuraalsetes eelassakkudes on *Ric8* välja lülitatud, ei toimu väikeaju kihtide korrapärasest moodustumist, Bergmani gliia rakud pole organiseerunud ning häiritud on granulaarrakkude migratsioon (Ma jt., 2012). *In vitro* katsed *Ric8* mutantsete gliia rakkudega näitavad, et mutantsetel rakkudel on probleeme kinnitumisega laminiinile, mis on basaalmembraani komponent. Sellest tulenevalt on oletatud, et RIC8 roll väikeaju arengus on seotud Bergmani gliia rakkude ja basaalmembraani vaheliste interaktsiooni protsessidega (Ma jt., 2012). RIC8 seost basaalmembraani defektidega on demonstreeritud ka hiljuti avaldatud töös, mis käsitleb *Ric8* mutantseid neuraalseid eelassakke hiire arenevas neokorteksis. Basaalmembraani defektid ilmnevad neokorteksis alates embrüonaalsest vanusest E14.5 ning neid kirjeldab eelkõige laminiini fragmenteeritud ekspressioon basaalmembraanis. Samuti on *Ric8* puudusel häiritud mitoosikäevi orientatsioon ja rakkude jagunemine neurogeneesi protsessides (Kask, jt. 2014).

Kannuskonna *Xenopus tropicalis* embrüogeneesis on RIC8 erinevates kudedes detekteeritav alates varajasest arengust. Hilisemas embrüonaalses arengus koondub ekspressioon neuraalsetesse kudedesse, kaasaarvatud neuraalharja rakkudesse ja nende derivaatidesse (Maldonado-Agurto jt., 2011). Neuraalharja rakud tekivad embrüonaalses arengus neurulatsiooni käigus sulgunud neuraaloru ja epidermise vahelisel alal ning migreeruvad sealt edasi erinevatesse areneva embrüo piirkondadesse, et panustada seal mitmete erinevate kudede ja organite tekkimisse (Alfandari jt., 2010). *In vitro* katsed, milles uuriti kannuskonna *X. tropicalis* *xtric8 knock-down* neuraalharja rakkude migratsiooni kemoatraktandi suunas, näitasid et RIC8 on vajalik neuraalharja rakkude suunatud migratsiooniks. Samas töös uuriti ka *xtric8 knock-down* neuraalharja rakkude adhesiooni ja lamenumist fibonektiini maatriksil ning leiti, et *xtric8 knock-down* rakkudes oli vähem fosfopaksilliini ja sellest tulenevalt oli vähenenud ka fokaalse adhesiooni komplekside arv. Pakuti välja hüpotees, mille kohaselt RIC8 osaleb fokaalse adhesiooni kompleksis reguleerides paksilliini fosforülimist läbi G α subühikute (Fuentealba jt., 2013). Fokaalse adhesiooni kompleksi kaudu toimub rakkude kinnitumine ekstratsellulaarsele maatriksile integriinide vahendusel (Sastry ja Burridge, 2000). Paksilliin kuulub fokaalse adhesiooni kompleksi tsütoplasmaatiliste valkude hulka ning seondub mitmete valkudega, mis on vajalikud aktiini tsütoskeleti remodelleerimiseks (Turner, 2000).

2.4 RIC8 roll aktiini tsütoskeleti dünaamikas

On näidatud, et hiire *Ric8^{-/-}* embrüonaalsetes tüvirakkudes (ES) väheneb polümeriseeritud aktiini (F-aktiin) hulk võrreldes metsiktüüpi rakkudega 70% võrra. Lisaks sellele on võrreldes metsiktüüpi rakkudega vähenenud ka aktiivse RhoA hulk rakkudes (Gabay jt., 2011). Aktiini dünaamika eest vastutavad rakkudes Rho perekonna GTPaasid, mille aktiivsust reguleerivad guaniini nukleotiidivahetusfaktorid (GEF), GTP-aase aktiveerivad valgud (GAP) ja guaniini nukleotiidi dissotsiatsiooni inhibiitorid (GDI) (Ellenbroek ja Collard, 2007). Üheks Rho guaniini nukleotiidivahetusfaktoriks on p115 RhoGEF, mille aktivatsioon toimub läbi G α_{12} ja G α_{13} subühikute (Hart jt., 1998). RIC8 on vajalik nii G α_{13} subühiku aktivatsiooniks kui ka lokaliseerimiseks plasmamembraanile (Gabay jt., 2011; Chan jt., 2011). *Ric8^{-/-}* ES rakkudes taastab normaalse F-aktiini taseme konstitutiivselt aktiivne RhoA. Oletatakse, et RIC8 osaleb aktiini tsütoskeleti remodelleermises läbi G α subühikute, mis on võimelised aktiveerima Rho guaniini nukleotiidivahetusfaktoreid (Gabay jt., 2011).

Hiljuti näidati, et heterotrimeersed G valgud aitavad makrofaagide poolt läbi viidavas fagotsütoosi protsessis reguleerida aktiini polümeriseerumist. Makrofaage töödeldi toksiiniga, mis takistab $G\alpha_i$ subühikuga seondunud GDP vahetust GTP vastu ja $G\beta\gamma$ vabanemist ning nähti, et selle protsessi inhibeerimine takistab fagotsütoosi toimumist ning aktiini polümeriseerumist. Uurides mittekanoonilises G valkude rajas osalevaid valke, mis kolokaliseerusid fagotsütoosi toimumise piirkonnas F-aktiini ja $G\alpha_i$ subühikutega leiti, et üheks selliseks valguks makrofaagides on RIC8. RIC8 valgu taseme alla viimine makrofaagides vähendab oluliselt makrofaagide fagotsütoosi võimet (Huang jt., 2014).

2.5 RIC8 koduhiire embrüonaalses arengus

Hiire (*Mus musculus*) 2-rakulise embrüo blastomeerides ekspresseerub RIC8 tsütoplasmas, raku korteksis ja mitoosikäavis. RIC8 ekspressioon on embrüo kõikides kudedes (nii trofoblasti rakkudes kui ka sisemises rakkude massis ning nende derivaatides) detekteeritav kogu preimplantatsioonilise arengu vältel (E1.5-E4.0) (Ojastu, 2013, bakalaureusetöö). Vanuses E5.5-E6.5 ekspresseerub RIC8 eelkõige embrüot ümbritseva emaka detsiidua rakkudes olles vähesemal määral ekspresseerunud ka embrüonaalsetes ja ekstra-embrüonaalsetes kudedes. Vanuses E7.0-E8.5 muutub RIC8 ekspressioonimuster vastupidiseks – ekspressioonitase langeb emapoolsetes kudedes ning tõuseb tugevalt kõikides embrüonaalsetes- kui ka ekstra-embrüonaalsetes kudedes (Tõnissoo jt., 2010). Hilisemas embrüonaalses arengus (E9.5-E12.0) on RIC8 ekspressioon eelkõige neurospetsiifiline ning täiskasvanud hiires on ekspressioon koondunud kesknärvisüsteemi kuuluvatesse kudedesse (Tõnissoo jt., 2003). *Ric8^{-/-}* hiire embrüod on võimelised implanteeruma ning algatama gastrulatsiooni kuid arvukate arengudefektide tõttu surevad *Ric8^{-/-}* embrüod vanuses E6.5-E8.5 (Gabay jt., 2011; Tõnissoo jt., 2010). *Ric8^{-/-}* mutantsed embrüod on arengus kasvult väiksemad, neil esinevad kavitatsioonihäired ning nende orientatsioon emaka telgede suhtes on ebanormaalne. Vanuses E7.5 pole *ric8^{-/-}* embrüotel välja kujunenud amnioni ega allantoisi, moodustunud mesoderm ja basaalmembraan on defektsed ning embrüonaalses ektodermis esineb apoptoosi (Tõnissoo jt., 2010). Haplodefitsiitsetel *Ric8^{+/-}* embrüotel ei esine teadaolevaid kõrvalekaldeid normaalsest arengust, nad läbivad edukalt pre- ja postnataalse arengu ning on võimelised andma järglasi (Gabay jt., 2011; Tõnissoo jt., 2003, 2006).

EKSPERIMENTAALNE OSA

Töö eesmärk

Analüüsida ja kirjeldada *Ric8*^{-/-} embrüote ekstra-embrüonaalsete kudede morfoloogiat ja histoloogiat varajases post-implantatsioonilises arengus.

3. Materjal ja meetodika

3.1 Kasutatud hiirelinn

Käesolevas magistritöös tehtud katsetes kasutati transgeenset *LacZ knock-in* hiirelinni *Ric8*^{LacZ/+} (Tõnissoo jt., 2006). *Ric8*^{LacZ/LacZ} (edaspidi *Ric8*^{-/-}) embrüote saamiseks ristati omavahel heterosügootseid *Ric8*^{LacZ/+} (edaspidi *Ric8*^{+/-}) hiiri. Embrüote vanuseks E0.5 loeti emashiirtel kopulatsiooni tulemusena tekkiva vaginaalse limakorgi ilmumise päev. Katsete käigus võrreldi omavahel *Ric8*^{-/-} ja *Ric8*^{+/-} või *Ric8*^{+/+} embrüoid. *Ric8*^{+/-} genotüübiga embrüotel ei esine teadaolevaid kõrvalekaldeid normaalsest fenotüübist, nad läbivad edukalt pre- ja postnataalse arengu ja on võimelised andma eluterveid järglasi (Tõnissoo jt., 2003, 2006).

Kõiki töös kasutatud hiiri hoiti standardsetes tingimustes ning neile võimaldati ööpäevaringne ligipääs puhtale söögile ja joogile. Eksperimentides kasutatud katseloomad ohverdati vastavalt Euroopa Liidus kehtestatud eeskirjadele vastavat luba omava isiku poolt.

3.2 Parafiinlõikude valmistamine

Embrüod koos neid ümbritseva emakakoega fikseeriti 4%-lises paraformaldehüüdi (PFA) lahuses fosfaatpuhverdatud soolalahuses (PBS) 5-6 tundi temperatuuril 4°C. Pärast fikseerimist pesti embrüod PBS'is ning alustati veetustamist tõusva kontsentratsiooniga (50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96% ja 2 korda 100%) etanooli lahuses. Veetustatud koetükid tõsteti seejärel 2 korda kaheks tunniks ksülooli, seejärel üheks tunniks parafiini ja järgnevalt kolmeks tunniks puhtasse parafiini mida hoiti termostaadis 65°C temperatuuril. Koetükid sisestati seejärel parafiini kasutades selleks ettenähtud aparati Microm AP280-2. Parafiinblokke säilitati temperatuuril 4°C.

Parafiinlõikude valmistamiseks kasutati mikrotoomi Microm HM 355s (Thermo Scientific). Parafiini sisestatud embrüotest tehti 6 µm paksused seerialõigud, mis asetati alusklaasidele Polysine® Slides (Thermo Scientific). Igast embrüost 3-6 lõiku asetati genotüpiseerimiseks PEN-membraaniga kaetud alusklaasidele MembraneSlide 1.0 PEN (Zeiss). Alusklaasidel koelõikudel lasti kuivada ja kinnituda üleöö temperatuuril 40°C ning seejärel säilitati klaase temperatuuril 4°C kuni edasise töötluseni.

3.3 Laser-mikrodissektsioon

Parafiini sisestatud embrüote genotüpiseerimiseks kasutati laser-mikrodissektsiooni, mis võimaldab PEN-membraaniga kaetud alusklaasidele paigutatud parafiinlõikudelt välja lõigata embrüonaalse koe. Preparaate hoiti üleöö 56°C juures ning seejärel viidi läbi deparafiniseerimine. Alusklaasid kaeti 2 korda 2 min ksülooliga ning seejärel kanti klaasidele langevas kontsentratsioonis etanool (100%; 96%; 80%; 70%; 50%). Koelõike hoiti igas etanooli lahuses 1 min. Seejärel hoiti koelõike 1 min deioniseeritud vees ddH₂O (mQ). Vesi eemaldati ja klaasidel lasti kuivada. Embrüonaalse koe dissekteerimiseks kasutati laser-mikrodissektsiooni aparatuuri PALM MicroBeam (Zeiss). Embrüonaalne materjal koguti PALM Adhesive Caps 0,5 ml tuubide silikooniga kaetud korgi sisse.

3.4 Immunohistokeemia parafiinlõikudele

Alusklaasidel parafiinlõigud asetati pooleks tunniks temperatuurile 60°C. Seejärel viidi läbi deparafiniseerimine ja rehüdreerimine. Alusklaasid kaeti 2 korda 5 min ksülooliga, seejärel ksülool eemaldati ning alusklaasid kaeti 2 korda 3 min 100% etanooliga. Edasi kaeti alusklaasid langevas kontsentratsioonis (96%; 80%; 70%; 50%) etanooli lahusega. Koelõike hoiti igas etanooli lahuses 2 korda 1 min ning pesti ddH₂O vees 2 korda 5 min. Alusklaasidel koelõike kuumutati 40 min 10mM Na-tsitraatpuhvris (pH 6.0) temperatuuril 97°C ning lasti alusklaasidel seejärel 30 min toatemperatuuril jahtuda. Koelõike pesti 3 korda 5 min PBS'is ning permeabiliseriti 20 min 0,1% Triton-X-100 lahusega toatemperatuuril. Seejärel pesti klaase 3 korda 5 min PBS'iga. Immunoglobuliini mittespetsiifilise seondumise blokeerimiseks inkubeeriti klaase 1,5 tundi 1% veise seerumi albumiin (BSA) lahuses PBS'is mis sisaldas 5% kitse seerumit. Pärast blokeerimist inkubeeriti koelõike pimendatud niisutuskambris üleöö 4°C juures primaarse antikehaga (polükloonaalne *rabbit* anti-laminiin-1, lahjendus 1:500, Sigma-Aldrich) 1% BSA lahuses PBS'is. Koelõike pesti 3 korda 10 min PBT puhvris (0,1% Tween-20 PBS'is) ning inkubeeriti sekundaarse antikehaga (*goat-anti*

rabbit Alexa Fluor 555, lahjendus 1:750, Invitrogen) 1% BSA PBS'is 1,5 tundi toatemperatuuril pimendatud niisutuskambris. Seejärel pesti koelõike 3 korda 10 min PBT puhvris ning viidi läbi tuumade värvimine DAPI'ga (1:1000) PBS'is. Koelõike pesti 2 korda 5 min PBS'is ning preparaadid sulundati sulundusvedelikku Fluoromount G (Electron Microscopy Sciences). Klaasid kaeti 24x50 mm katteklaasidega (Deltalab) ning klaaside servad kleebiti kinni läbipaistva küünelakiga. Preparaate säilitati 4°C juures pimedas kuni pildistamiseni. Kõikides immunohistokeemilistes katsetes kasutati paralleelselt negatiivset kontrolli (inkubeeriti ainult sekundaarse antikehaga), kontrollimaks sekundaarse antikeha võimalikku ebaspetsiifilist seondumist.

3.5 Hematoksüliin-eosiin värving parafiinlõikudele

Alusklaasidel parafiinlõike hoiti 30 min 60°C juures ning seejärel deparafiniseeriti lõigud ksülooliga 2 korda 10 min. Järgnevalt rehüdreeriti koelõigud langeva kontsentratsiooniga (100%; 96%; 80% ja 70%) etanooli lahuses. Lõike hoiti igas lahuses 5 min. Koelõike pesti ddH₂O veega ning värviti 10 min hematoksüliiniga. Värv kinnitati hoides lõike 10 minutit filtreeritud kraanivees. Järgnevalt värviti lõike 1-1,5 min eosiiniga, millele järgnes värvi kinnitamine 10 min jooksul filtreeritud kraanivees. Preparaadid dehüdreeriti kasvava kontsentratsiooniga (70%; 80%; 96% ja 100%) etanooli lahuses, igas lahuses umbes 1 min. Koelõike töödeldi ksülooliga 2 korda 2 min. Seejärel sulundati preparaadid sulundusvedelikuga Pertex ning klaasid kaeti katteklaasidega.

3.6 Embrüote dissekteerimine

Eelnevalt ohverdatud emashiirtelt dissekteeriti välja emakas mis asetati seejärel jääal asuvasse Petri tassi, mis sisaldas külma PBS'i. Kasutades mikroskoopi M165 FC (Leica), eraldati pintsettide abil emaka müomeetrium, mille all paikneb detsidualiseerunud endomeetrium. Detsidualiseerunud endomeetriumis paiknev implantatsioonisaht avati pintsettide abil ning eraldati selles paiknev embrüo koos rebukotiga. Embrüod koguti suupipeti abil PBS'i tilkadesse alusklaasil. Edasise töötamise käigus hoiti alusklaasi niisutuskambris, et vältida lahuste aurustumist.

3.7 Whole-mount immunohistokeemia

Emakast välja dissekteeritud embrüotega viidi läbi *whole-mount* immunohistokeemiline analüüs. Embrüod fikseeriti 15 min 4% PFA lahuses PBS'is. Seejärel pesti embrüoid 10 min

PBS'is, 10 min 0,1% Triton X-100 PBS'is ja 10 min PBS'is. Järgnevalt blokeeriti embrüoid 1 tund toatemperatuuril 0,1% BSA lahuses PBT puhvis, mis sisaldas 2% kitse seerumit. Embrüod viidi primaarse antikeha lahusesse (polükloonaalne *rabbit* anti-laminiin-1, lahjendus 1:500, Sigma-Aldrich) 0,1% BSA PBS'is mis sisaldas 2% kitse seerumit ning inkubeeriti üleöö 4°C juures. Embrüoid pesti 10 min PBS'is ning inkubeeriti 1 tund 2% kitse seerum/PBT's. Seejärel inkubeeriti embrüoid sekundaarse antikeha lahuses (*goat-anti rabbit* Alexa Fluor 633; lahjendus 1:750; Invitrogen) 0,1% BSA PBS'is 1 tund toatemperatuuril. Embrüoid pesti 10 min PBS'is ning töödeldi tuumade visualiseerimiseks DAPI'ga (1:1000) PBS'is 10 min ning seejärel pesti 10 min PBS'is. Embrüod sisestati 8-kambrilistele alusklaasidele sulundusvedelikku Fluoromount G (Electron Microscopy Sciences). Kambrid kaeti 24x50 mm katteklaasiga (Deltalab) mis kinnitus alusklaasil olevale silikoonribale. Preparaate säilitati 4°C juures pimedas. Kõikides immunohistokeemilistes katsetes kasutati paralleelselt negatiivset kontrolli (inkubeeriti ainult sekundaarse antikehaga), kontrollimaks sekundaarse antikeha võimalikku ebaspetsiifilist seondumist.

3.8 Embrüote genotüüpiseerimine

Laser-mikrodissektiooni käigus kogutud materjal lüüsi PALM AdhesiveCaps tuubide silikooniga korgil 4µl lüüsilahuses (proteinaas K, 10µg/ml; 10x(NH₄)₂SO₄ puhver (Solis BioDyne)) 56°C juures üleöö. Emakast välja dissekteeritud embrüod, mida kasutati *whole-mount* immunohistokeemilises analüüsis lüüsi 15 µl lüüsilahuses (proteinaas K, 10µg/ml; 10x(NH₄)₂SO₄ puhver (Solis BioDyne)) 56°C juures üleöö. Lüsaadis sisalduv proteinaas K inaktiveeriti temperatuuril 98°C 20 min. Saadud genoomset DNA'd kasutati järgnevalt embrüote genotüüpiseerimiseks alleel-spetsiifilise PCR'iga.

PCR kasutati järgnevaid alleelspetsiifilisi primereid:

LacZ300 5' - CGC ATC GTA ACC GTG CAT CT - 3',

RicPTG_{genof} 5' - CTC TCC CAG CAT CCC TCA C - 3',

PTG(Ric8)_{in1rev} 5' - CAC ACC CCA GCC GAG TTG - 3'.

PCR'i reaktsioonisegu koosnes: 10x(NH₄)₂SO₄ puhver (Solis BioDyne), 25 mM MgCl₂ (Fermentas), 2mM dNTP, praimer RicPTGgenoF 2ng/μl, praimerid LacZ300 ja PTG(Ric8)in1rev 1ng/μl, Taq polümeraas 0.02U/μl, 2μl DNA ja ddH₂O. Reaktsiooni kogumaht oli 10 μl.

Kasutatud PCR-i programmi parameetrid:

95 °C 5 minutit

95 °C 30 sekundit,

58 °C 40 sekundit,

72 °C 1 minut,

72 °C 10 minutit.

} 33 tsüklit

PCR tulemusena saadud produkte analüüsiti 1%-lise TAE (Tris-atsetaat-EDTA) agarosgeelektroforeesil ning produktide hindamiseks kasutati DNA pikkusmarkerit (1kb DNA *ladder*; Fermentas).

3.9 Preparaatide pildistamine

Embrüoid vaadeldi ja pildistati Olympus IX81 mikroskoobiga, mis on varustatud FluoView1000 konfokaalsüsteemiga. 3D mudelite koostamiseks kasutati Olympus FluoView FV1000 Ver 3.0 Viewer tarkvara. Parafiinlõikude vaatlemiseks ja pildistamiseks kasutati mikroskoopi Olympus BX51, mis on varustatud kaameraga Olympus DP71. Pildipaneelide koostamiseks kasutati Adobe Photoshop CS6 tarkvara.

3.10 Morfomeetrilised mõõtmised ja statistika

Morfomeetrilised mõõtmised viidi läbi Adobe Photoshop CS6 tarkvaraga, kasutades referentsina standardiseeritud 0,01 mm sammuga mõõtelõiku. Morfomeetrilised mõõtmised viidi läbi hematoksüliin-eosiin värvinguga koelõikudel. Ekstra-embrüonaalse vistseraalse endodermi (ExVE) rakkude morfoloogia kvantitatiivseks kirjeldamiseks mõõdeti ExVE rakkude kogupikkus ja ExVE rakkude apikaalse osa pikkus. Rakkude basaalse osa pikkus tuletati arvutuslikult meetodil lahutades raku kogupikkusest apikaalse osa pikkuse. Vanuses E6.5 mõõdeti igas embrüos (n=3 *Ric8*^{-/-}; n=3 *Ric8*^{+/+}) viie järjestikkuse ExVE raku

kogupikkus ja samade rakkude apikaalse osa pikkus. Vanuses E7.5 mõõdeti igas embrüos (n=3 *Ric8^{-/-}*; n=3 *Ric8^{+/+}*) kümne järjestikkuse ExVE raku kogupikkus ja samade rakkude apikaalse osa pikkus. Rebukoti morfomeetrilisel mõõtmisel (E5.5, E6.5 ja E7.5) mõõdeti iga embrüo (n=3 *Ric8^{-/-}*; n=3 *Ric8^{+/+}* või *Ric8^{+/-}* kõigis uuritud vanustes) keskmistest seerialõikudest kolme järjestikkuse lõigu rebukoti pikkus ja laius ning embrüo munasilindri pikkus ja laius (Joonis 7). Statistiliseks analüüsiks kasutati programmi Excel 2013 (Microsoft Office). Statistilise olulisuse hindamiseks kasutati t-testi ning statistiliselt oluliseks loeti tulemused mille p-väärtus $\leq 0,05$.

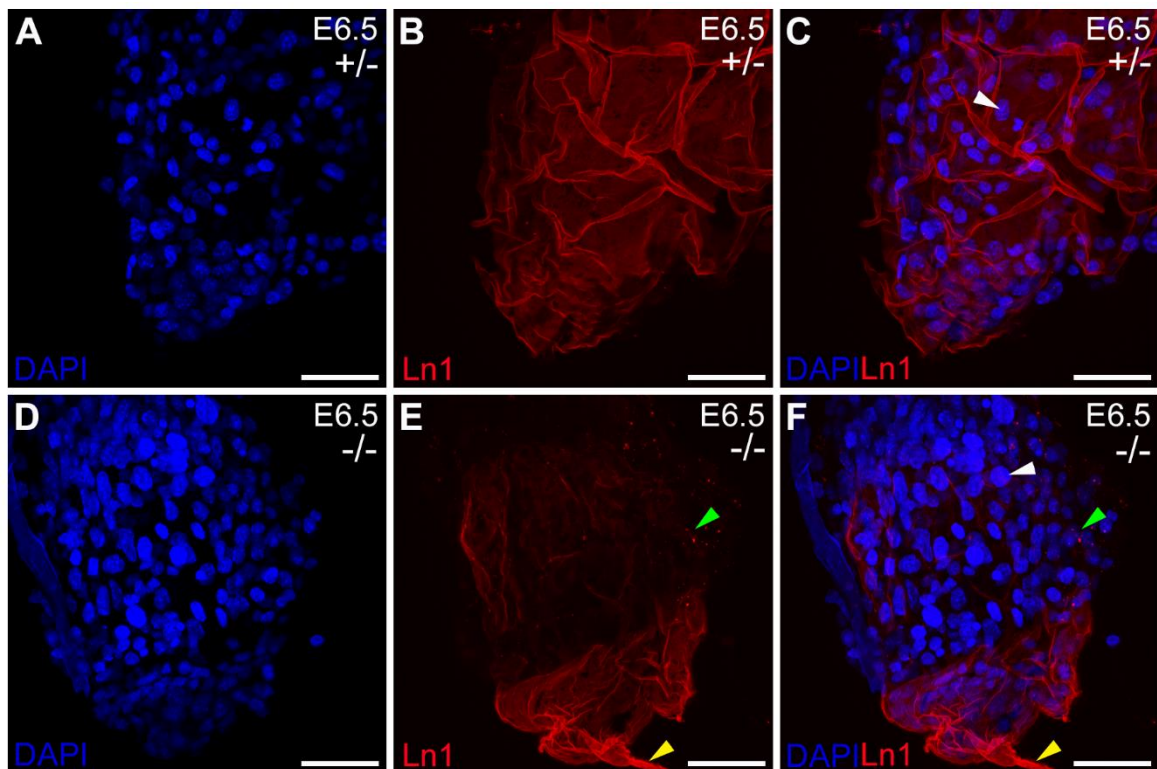
4. TULEMUSED

4.1 *Ric8*^{-/-} embrüote Reichert'i – ja basaalmembraani kirjeldamine vanuses E6.5

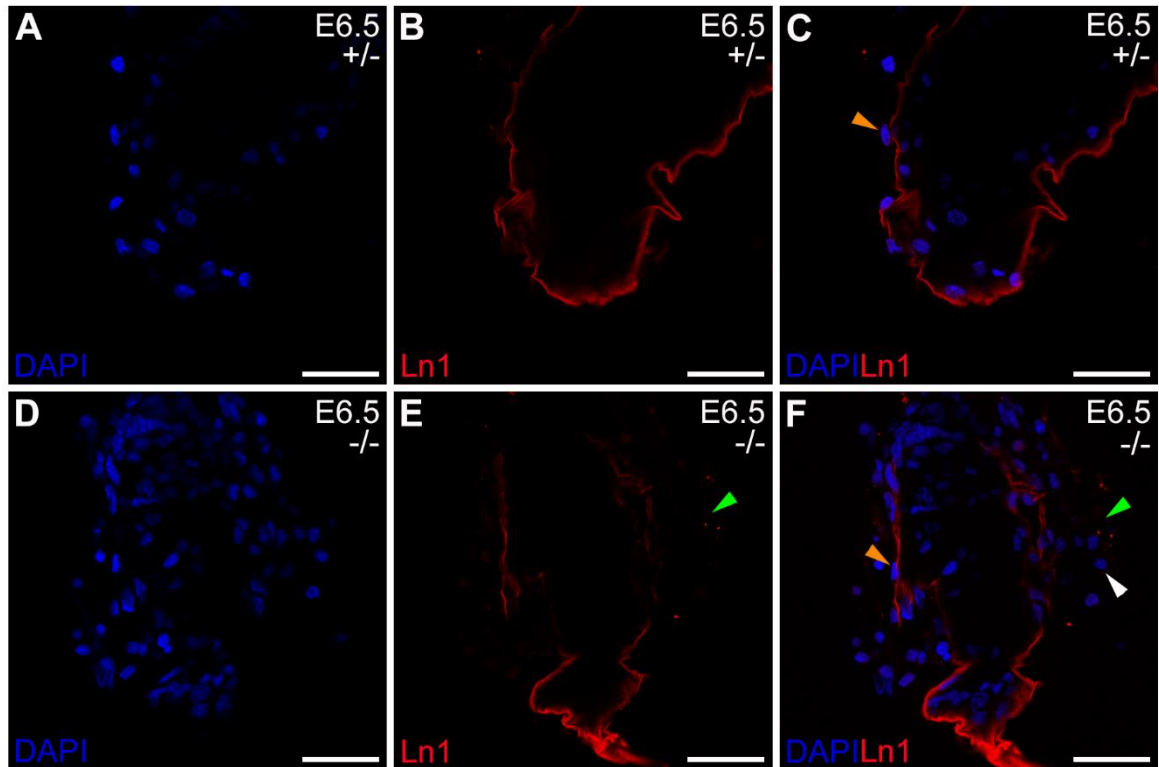
Arenevat embrüot ümbritseb parietaalse endodermi ja trofoblasti rakkude vahel paiknev mitmekihiline basaalmembraan – Reichert'i membraani (RM). Selleks, et hinnata Reichert'i membraani terviklikkust dissekteeriti emakast välja embrüod koos ekstra-embrüonaalsete kudede (RM, rebukott, ektoplatsentaalkoonus) ning RM visualiseeriti immunohistokeemiliselt. RM visualiseerimiseks kasutati laminiin-1 vastast antikeha. Laminiin-1 kuulub RM komponentide hulka. Embrüotest tehti konfokaalmikroskoobiga 3D pesakonnakaaslaste Reichert'i membraani 3D kujutistega. Võrdlusena kasutatud *Ric8*^{+/-} genotüübiga embrüotel ei esine teadaolevaid kõrvalekaldeid normaalsest fenotüübist, nad läbivad edukalt pre- ja postnataalse arengu ja on võimelised andma elutermeid järglasi (Tõnissoo jt., 2003,2006).

Analüüsi tulemusena täheldati, et *Ric8*^{-/-} Reichert'i membraan sarnaneb üldjoontes pesakonnakaaslaste Reichert'i membraanile (Joonis 4). Üheks silmapaistvaks erinevuseks on *Ric8*^{-/-} embrüote Reichert'i membraani ümbritsev tihe rakkude mass (Joonis 4F, valge nooleots). Kuna rakud katavad tihedalt eelkõige embrüo proksimaalset osa, siis on selles osas ka laminiini ekspressiooni märgatavalt raskem detekteerida, kuna RM on rakkude poolt varjestatud (Joonis 4E ja F). Erinevalt *Ric8*^{-/-} embrüotest on *Ric8*^{+/-} embrüote puhul Reichert'i membraani pinnal näha üksikuid rakke (Joonis 4C, valge nooleots). *Ric8*^{-/-} embrüotele on iseloomulik ka Reichert'i membraani distaalses otsas asuv laminiini rikas välja venitatud morfoloogiaga ebatavaline moodustis (Joonis 4E ja F, kollased nooleotsad), mis pesakonnakaaslaste puhul puudub täielikult (Joonis 4C) või on tunduvalt väiksem. Lähemal vaatlusel on näha, et *Ric8*^{-/-} embrüote Reichert'i membraan ning sellega seotud rakkude mass sisaldab piirkondi, milles laminiin-1 lokaliseerub üksikute täppidena (Joonis 4E ja F, roheline nooleots). Selleks, et saada selgust, kuidas paiknevad RM kontaktis olevad rakud RM suhtes vaadeldi seeriapilte, millest 3D kujutised on koostatud (Joonis 5). *Ric8*^{+/-} embrüote puhul on näha, et Reichert'i membraani pinnal paiknevad üksikud rakud on tihedas kontaktis Reichert'i membraaniga, mis annab aluse väita, et tegemist on primaarsete trofoblasti gigantrakkudega (pTG rakud) (Joonis 5C, oranž nooleots). *Ric8*^{-/-} embrüote puhul on näha Reichert'i membraaniga otseses kontaktis olevaid rakke (tõenäoliselt pTG rakud;

Joonis 5F, oranž nooleots), kui ka hulgaliselt rakke, mis paiknevad Reichert'i membraanist eemal (Joonis 5F, valge nooleots) Nende rakkude läheduses on detekteeritavad ka ebatüüpilised laminiini rikkad täpid (Joonis 5E ja F, roheline nooleots).



Joonis 4. *Ric8*^{-/-} embrüote Reichert'i membraani 3D kujutis vanuses E6.5. (A-C) *Ric8*^{+/+} embrüo Reichert'i membraanis (RM) ekspresseerub laminiin ühtlaselt. RM katavad üksikud rakud (C, valge nooleots). (D-F) *Ric8*^{-/-} embrüote RM laminiini ekspressioonis on lisaks ühtlasele ekspressioonile näha ka üksikuid laminiini kogumeid (E ja F, roheline nooleots). Reichert'i membraani katab tihe rakkude mass (F, valge nooleots). Embrüo distaalses otsas on näha ebatavalist laminiini rikast moodustist (F, kollane nooleots), mis pesakonnakaaslasel puudub. Rakutuumade visualiseerimiseks on kasutatud DAPI't. Ln1 – laminiin-1. Mõõtkava 40μm.

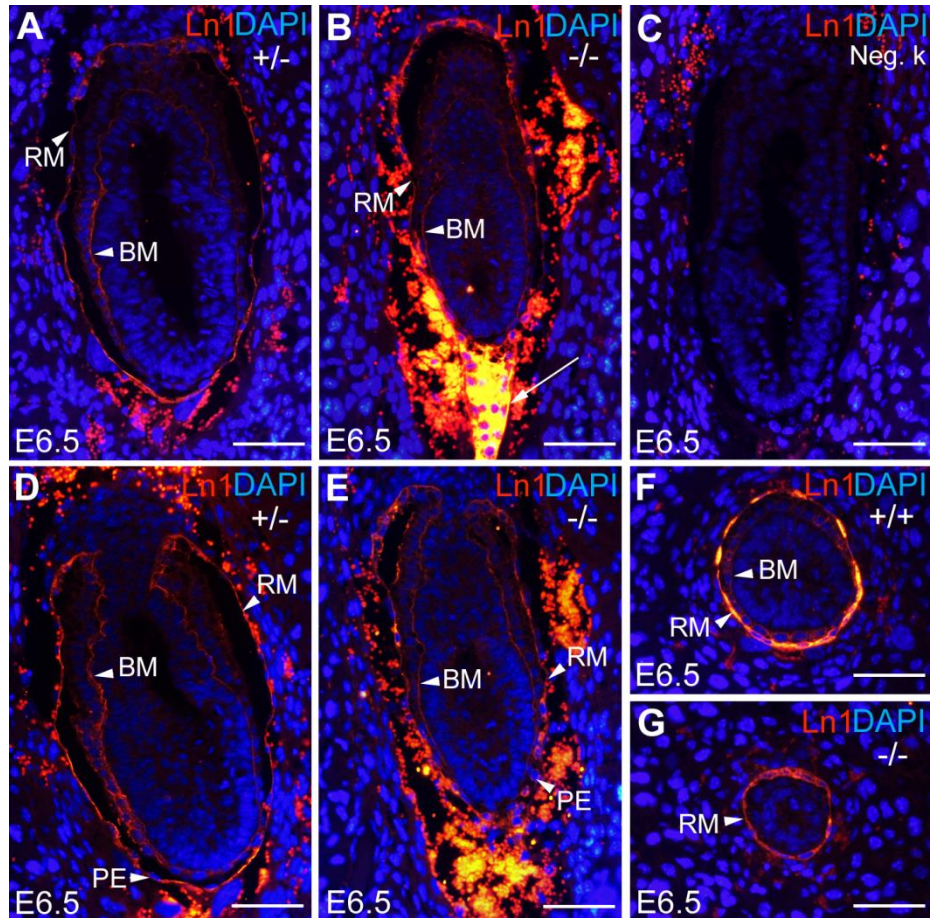


Joonis 5. Reichert'i membraani ümbritsevate rakkude paigutus konfokaalmikroskoopia seerialõikudel vanuses E6.5. (A-C) *Ric8*^{+/-} embrüo Reichert'i membraan (RM). (C) *Ric8*^{+/-} embrüo RM pinnal on näha primaarseid trofoblasti gigantrakke (oranž nooleots). (D-F) *Ric8*^{-/-} embrüo RM. (F) *Ric8*^{-/-} embrüo RM'i ümbritseb rakkude mass (valge nooleots). Leidub ka ebatüüpilisi laminiini kogumeid (roheline nooleots). RM pinnal on näha primaarseid trofoblasti gigantrakke (oranž nooleots). Rakutuumade visualiseerimiseks on kasutatud DAPI't. Ln1 – laminiin-1. Mõõtkava 40 µm

Selleks, et uurida täpsemalt Reichert'i membraani ja ka basaalmembraani E6.5 vanustes *Ric8*^{-/-} embrüotes teostati immunofluorestsents analüüs *Ric8*^{-/-} ja *Ric8*^{+/-} embrüotest tehtud histoloogilistele koelõikudele. Analüüsi tulemused näitasid, et *Ric8*^{-/-} Reichert'i membraan on terviklik (Joonis 6B ja E). Seda kinnitab ka see, et immunohistokeemilise meetodiga ebaspetsiifiliselt märkunud (Joonis 6C) emapoolsed erütrotsüüdid (tuumata rakud) Reichert'i membraani ümbruses ei ole pääsenud *Ric8*^{-/-} embrüote rebukoti sisemusse (Joonis 6B ja E). Küll aga on erütrotsüütide hulk *Ric8*^{-/-} embrüote Reichert'i membraani ümbruses tunduvalt suurem kui *Ric8*^{+/-} pesakonnakaaslasel (Joonis 6A ja B; punased väikesed ümarad tuumata rakud). *Ric8*^{-/-} embrüote puhul jääb detsiidua ja RM vahele tunduvalt suurem vahemik kui *Ric8*^{+/-} pesakonnakaaslasel, mis on täitunud ema erütrotsüütidega (Joonis 6B ja E). *Ric8*^{-/-} embrüote külgmistel sagitaallõikudel on nähtav iseloomulik rebukotist ja Reichert'i membraanist moodustunud väljaveninud struktuur embrüo distaalses otsas, mis on tugeva laminiini signaaliga (Joonis 6B, valge nool). Selle omapärase struktuuri sisemuses

on detekteeritavad ka mitmed tuumaga rakud (Joonis 6B). Heterosügootidel sarnase morfoloogiaga struktuuri ei ole (Joonis 6A). Lisaks on *Ric8^{-/-}* embrüote rebukoti parietaalse endodermi rakkude ümber märgatavalt rohkem näha laminiini märgist kui *Ric8^{+/-}* embrüotel (Joonis 6 D ja E), mistõttu näib *Ric8^{+/-}* embrüote RM peenem ja selgepiirilisem võrreldes *Ric8^{-/-}* embrüotega (Joonis 6A ja B, F ja G).

Teine oluline basaalmembraan (BM), mida vaadeldi paikneb vistseraalse endodermi all. See BM on ekstra-embrüonaalses – ja embrüonaalses osas selgesti nähtav ning *Ric8^{+/-}* ja *Ric8^{-/-}* embrüotes üldjoontes sarnane (Joonis 6A, B, D-F). Embrüo distaalses osas paiknev BM on nii *Ric8^{-/-}* kui *Ric8^{+/-}* embrüote puhul raskemini detekteeritav (Joonis 6A, B, D, E). Samas osadel *Ric8^{-/-}* embrüotel ei ole VE rakkude ümber paiknev laminiini ekspressioon tuvastatav (Joonis 6G).



Joonis 6. E6.5 embrüote basaalmembraanide analüüs. (A) *Ric8*^{+/-} embrüo külgmise sagitaallõik. Embrüol on eristatav selgelt kulgev Reichert'i membraan (RM) ja basaalmembraan (BM). Embrüo distaalses otsas ja külgedel on näha vähesel määral ema erütrotsüüte (B) *Ric8*^{-/-} embrüo külgmise sagitaallõik. RM on terviklik kuid seda ümbritseb hulgaliselt ema erütrotsüüte. Rebukoti sisemuses erütrotsüüte pole. Embrüo distaalses tipus paikneb laminiini rikas moodustus, milles on näha ka tuumaga rakke (valge nool). (C) Negatiivne kontroll, mille puhul pole viidud läbi tötlust primaarse antikehaga. Laminiini ekspresioon puudub. Sekundaarse antikehaga on ebaspetsiifiliselt reageerinud ema erütrotsüüdid. (D) *Ric8*^{+/-} embrüo keskmine sagitaallõik. Embrüol on eristatav selgelt kulgev RM ja BM. (E) *Ric8*^{-/-} embrüo keskmine sagitaallõik. Reichert'i membraani ümbritseb hulgaliselt ema erütrotsüüte. PE rakke ümbritseb tugev laminiini signaal. BM on selgelt detekteeritav, väljaarvatud embrüo distaalses osas. (F) *Ric8*^{+/+} embrüo ristlõik embrüo distaalsest osast. Vistseraalse endodermi (VE) ja epiblasti vahel paiknev BM pole selgelt välja kujunenud. Laminiin ümbritseb ka VE rakke. RM kulgeb selgelt ja ühtlaselt. (G) *Ric8*^{-/-} embrüo ristlõik embrüo distaalsest osast. VE ja epiblasti vahel kulgev basaalmembraan pole detekteeritav. RM laminiini ekspresioon on võrreldes *Ric8*^{+/+} embrüoga nõrgem ja hajusam. Rakutuumade visualiseerimiseks on kasutatud DAPI't. Lühendid: BM-basaalmembraan; Ln1 – laminiin-1; RM – Reichert'i membraan; PE – parietaalne endoderm. Mõõtkava 100 μm

4.2 *Ric8*^{-/-} embrüote rebukoti morfomeetriline analüüs

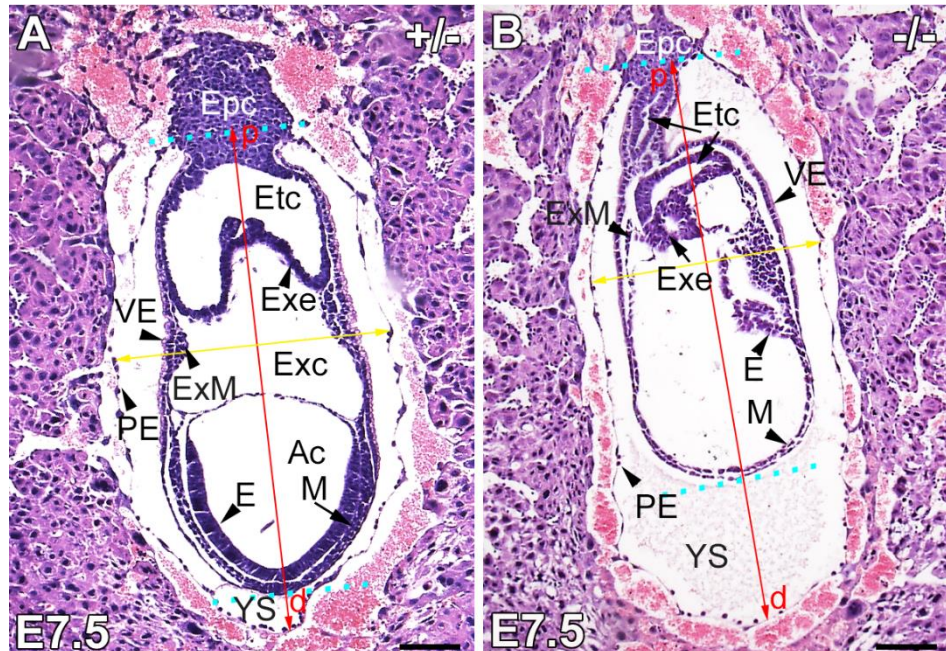
Ric8^{-/-} embrüote rebukoti arengu kirjeldamiseks analüüsiti hematoksüliin-eosiin värvinguga sagitaal-tasapinnas koelõike ning viidi läbi morfomeetrilised mõõtmised. *Ric8*^{-/-} embrüoid võrreldi *Ric8*^{+/+} ja *Ric8*^{+/-} genotüübiga pesakonnakaaslastega.

Koelõikude histoloogilis-morfoloogilisel analüüsil selgus, et embrüonaalses vanuses E7.5 on *Ric8*^{-/-} embrüod selgelt väiksemad kui pesakonnakaaslased. *Ric8*^{-/-} embrüotele on iseloomulik varieeruva morfoloogiaga selgete arenguanomaaliatega trofektodermi päritolu ektoplatsentaalkoonus ja ekstra-embrüonaalne ektoderm (Joonis 7B). Lisaks kirjeldab neid korrektselt moodustunud õõnte (ektoplatsentaalõõs, ekso-tsöloom ja proamniootiline õõs) puudumine ning embrüonaalsete kudede arengudefektid (Joonis 7B), mida on varasemalt põhjalikult kirjeldatud (Tõnissoo jt., 2010) ning millel käesolev töö ei peatu. Munasilindri kujulist embrüot ümbritseb rebukott, mille moodustavad vistseraalne endoderm ning parietaalne endoderm ja sellega seotud Reichert'i membraan (Joonis 7A). *Ric8*^{-/-} embrüotel on rebukott munasilindri pikitelje suunas ebanormaalselt välja veninud (Joonis 7B). Silmapaistev erinevus on *Ric8*^{-/-} embrüote rebukoti distaalses otsas, kus embrüo ja rebukoti vahele jääb tunduvalt suurem vahemik kui pesakonnakaaslaste puhul (Joonis 7A ja B). Lisaks on *Ric8*^{-/-} embrüotel võrreldes pesakonnakaaslastega rebukoti ümber ebaproportsionaalselt palju emapoolseid erütrotsüüte (Joonis 7B, tuumata rakud).

Selgitamaks kuidas toimub *Ric8*^{-/-} rebukoti areng viidi läbi morfomeetrilised mõõtmised E5.5, E6.5 ja E7.5 vanustes embrüotes. Morfomeetriliste mõõtmiste käigus mõõdeti sagitaaltasapinnas embrüo (munasilindri embrüonaalne ja ekstraembrüonaalne osa) ja teda ümbritseva rebukoti pikkust ning laiust. Embrüo pikkuseks loeti proksimaalselt paikneva ektoplatsentaalkoonuse ja embrüo vistseraalse endodermi distaalse otsa vahele jääv vahemaa (Joonis 7A ja B, sinised punktiirjooned). Rebukoti pikkuseks loeti proksimaalselt paikneva ektoplatsentaalkoonuse ja rebukoti parietaalse endodermi distaalse otsa vahele jääv vahemaa (Joonis 7A ja B; p-d telje pikkus). Analüüsi tulemusena selgus, et *Ric8*^{-/-} embrüod on oma pesakonnakaaslastest kogu vaadeldud arenguperioodi vältel (E5.5-E7.5) oluliselt lühemad ($p < 0,05$) (Joonis 8).

Ric8^{-/-} embrüote laius (mõõdetuna piirkonnast, kus embrüo on kõige laiem) vanuses E5.5 ja E6.5 oluliselt ei erine ($p = 0,21$ ja $p = 0,5$ vastavalt), kuigi *Ric8*^{-/-} embrüod on

pesakonnakaaslastest mõnevõrra kitsamad (Joonis 9). Gastrulatsiooni staadiumis (E7.5) on *Ric8^{-/-}* embrüote laius pesakonnakaaslastest juba oluliselt väiksem ($p < 0,01$) (Joonis 9).

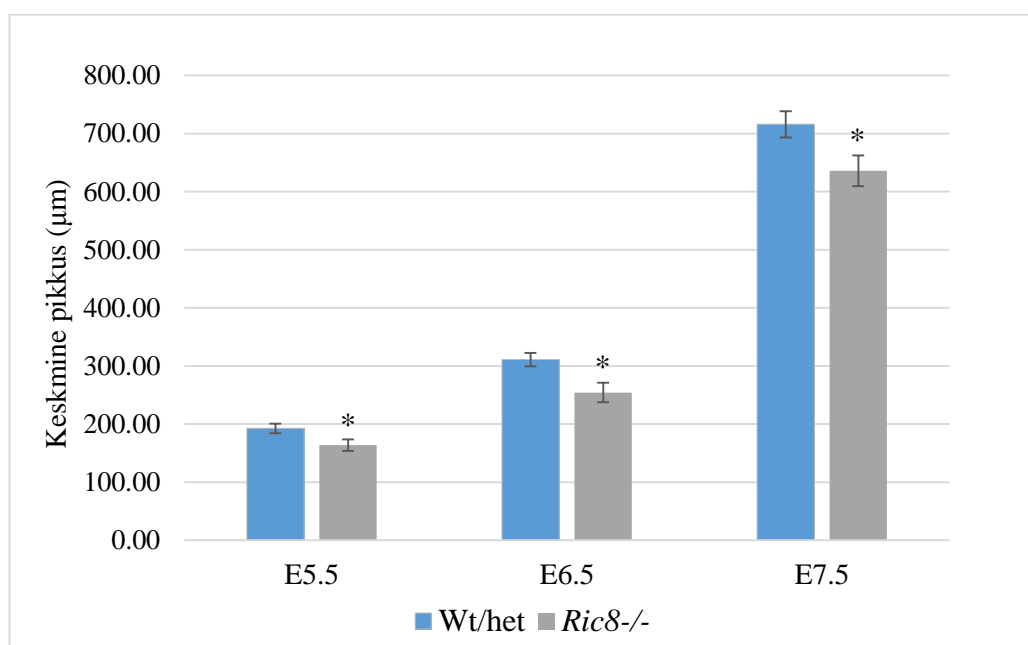


Joonis 7. *Ric8^{-/-}* embrüote fenotüüp vanuses E7.5. (A) *Ric8^{+/+}* embrüol on korrektselt välja arenenud kehaõõned, selgelt on eristatavad embrüonaalne ja ekstra-embrüonaalne osa, eristunud on mesoderm ja ektoderm. Munasilindrit ümbritseb parietaalne endoderm koos Reichert'i membraaniga, mis koos vistseraalse endodermiga moodustavad normaalse suurusega rebukoti. Rebukoti emaka poolse seina (PE-parietaalne endoderm) ja embrüo vahele jääb nii embrüo külgedelt kui embrüo distaalsest tipust ühtlase suurusega vahemik. (B) *Ric8^{-/-}* embrüo on võrreldes *Ric8^{+/+}* embrüoga tunduvalt väiksem, omades mitmesuguseid arengudefekte. Rebukott on ebanormaalselt suurenenud. *Ric8^{-/-}* embrüo ja rebukoti emaka poolse seina (PE-parietaalne endoderm) vahele jääv vahemik on embrüo distaalses osas tunduvalt suurem kui embrüo külgedel. Joonistel on punase kaksiknoolega tähistatud teljed mille suhtes mõõdeti rebukoti pikkust (p-proksimaalne; d-distaalne) ja kollase kaksiknoolega teljed mille suhtes mõõdeti rebukoti laiust. Sinise punktiirjoone vahele jääb embrüo munasilindri mõõdetud pikkus pikki proksimaal-distaalset telge. Lühendid: Ac – amniotiline õõs; E – epiblast; Epc – ektoplatsentaal koonus; Etc – ektoplatsentaal-õõs; Exc – ekso-tsöloom; Exe – ekstra-embrüonaalne ektoderm; ExM – ekstra-embrüonaalne mesoderm; PE – parietaalne endoderm; VE – vistseraalne endoderm; YS – rebukott. Mõõtkava 100µm.

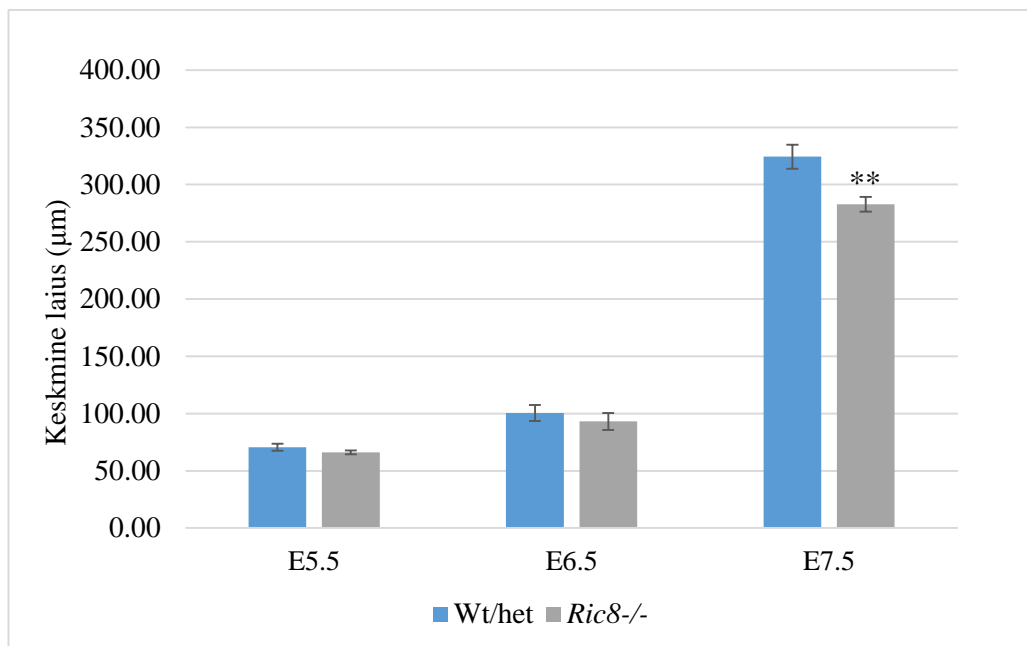
Rebukoti mõõtmistulemused näitasid, et vanuses E5.5 on *Ric8^{-/-}* embrüote rebukott pesakonnakaaslaste omast oluliselt kitsam (mõõdetuna piirkonnast kus rebukott on kõige laiem) ja ka lühem ($p < 0,01$ ja $p \leq 0,05$ vastavalt) (Joonis 10 ja Joonis 11). Vanuses E6.5 statistiliselt olulist erinevust *Ric8^{-/-}* embrüote ja pesakonnakaaslaste rebukoti pikkuses ega

laiuses ei esine ($p=0,4$ ja $p=0,6$), ehkki $Ric8^{-/-}$ embrüote rebukott on pesakonnakaaslaste omast mõnevõrra (keskmiselt $28,68 \mu\text{m}$) pikem (Joonis 10 ja Joonis 11). Tähelepanuväärselt on vanuses E7.5 $Ric8^{-/-}$ embrüote rebukoti pikkus pesakonnakaaslaste omaga võrreldes oluliselt suurem ($p<0,05$) (Joonis 11), samas ei esine $Ric8^{-/-}$ embrüotel rebukoti ebanormaalset laienemist ($p=0,09$) (Joonis 10).

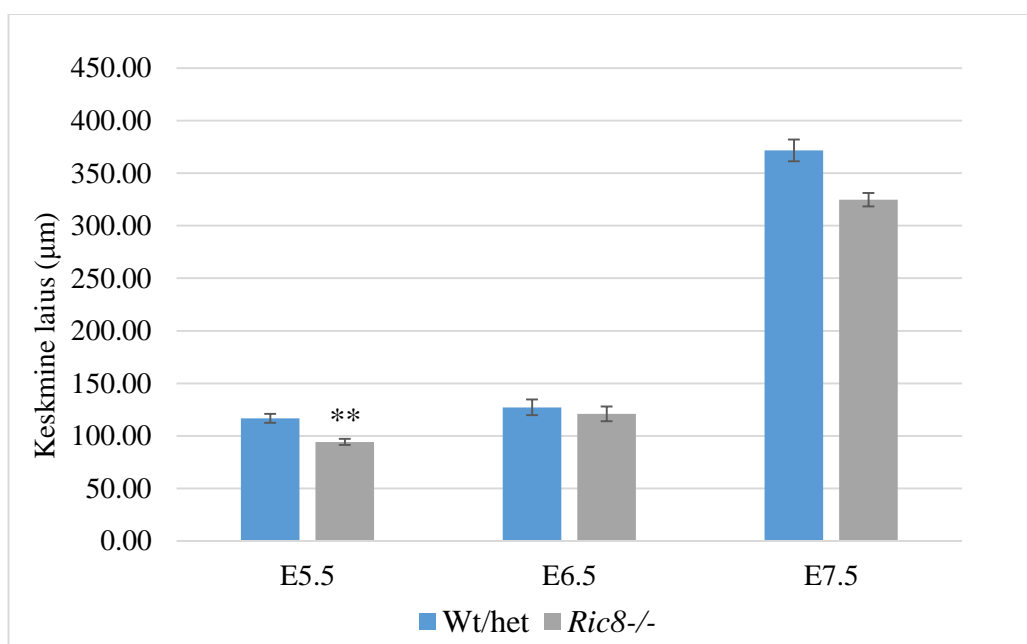
Kokkuvõtvalt näitavad nii histoloogiline analüüs kui morfomeetrilised mõõtmised, et pregastrulatsiooni arenguetapis toimub $Ric8^{-/-}$ embrüote rebukoti ebanormaalne pikenemine ning gastrulatsiooni etapil on rebukoti pikkus saavutanud eproportsionaalselt suured mõõtmed (Joonis 12).



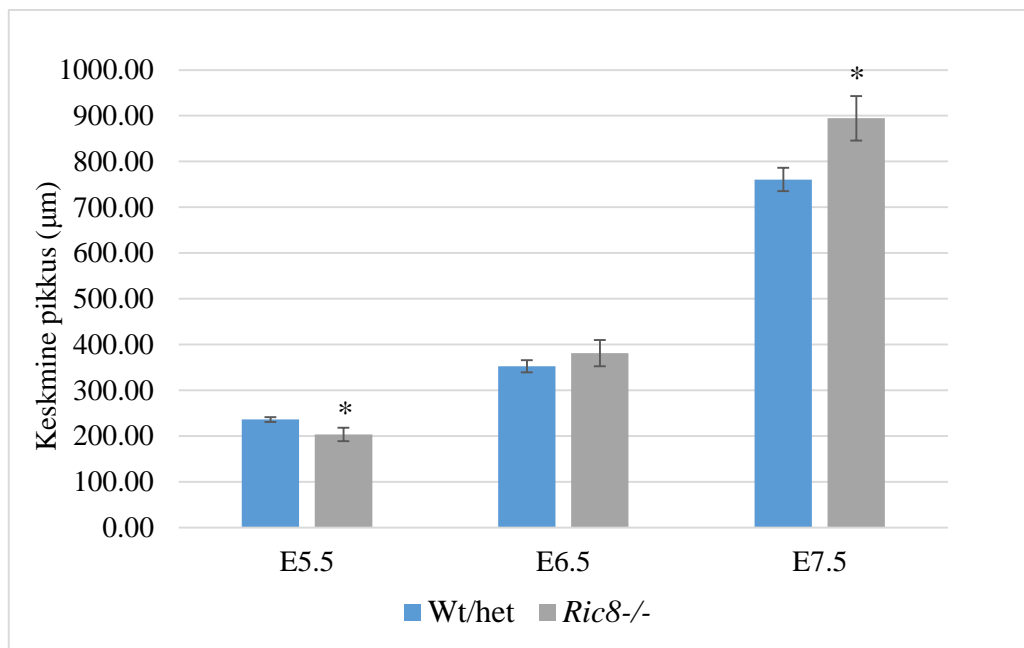
Joonis 8. Embrüote pikkuse morfomeetiline analüüs E5.5-E7.5. Vanuses E5.5, E6.5 ja E7.5 on $Ric8^{-/-}$ embrüod võrreldes pesakonnakaaslastega (wt/het) oluliselt lühemad. Kõigis vaadeldud vanustes kasutati kolme (nii $Ric8^{-/-}$ kui $Ric8^{+/-}$ või $Ric8^{+/+}$) embrüo lõikudelt saadud andmeid. Vearivad joonisel tähistavad standardviga. Statistilise olulisuse tuvastamiseks on kasutatud t-testi. * $p<0,05$



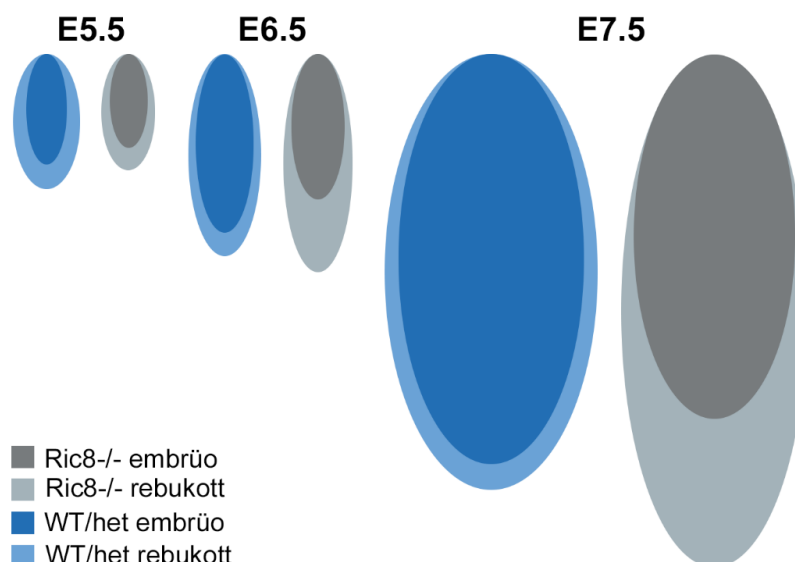
Joonis 9. Embrüote laiuse morfomeetriline analüüs E5.5-E7.5. Vanuses E5.5 ja E6.5 *Ric8^{-/-}* embrüote laiuses võrreldes pesakonnakaaslastega (wt/het) olulist erinevust ei esine. Vanuses E7.5 on *Ric8^{-/-}* embrüod võrreldes pesakonnakaaslastega oluliselt kitsamad. Kõigis vaadeldud vanustes kasutati kolme (nii *Ric8^{-/-}* kui *Ric8^{+/-}* või *Ric8^{+/+}*) embrüo lõikudelt saadud andmeid. Vearibad joonisel tähistavad standardviga. ** $p < 0,01$



Joonis 10. Rebukoti laiuse morfomeetriline analüüs E5.5-E7.5. Vanuses E5.5 on *Ric8^{-/-}* embrüote rebukotti võrreldes pesakonnakaaslastega (wt/het) oluliselt kitsam. Vanuses E6.5 ja E7.5 *Ric8^{-/-}* embrüote ja pesakonnakaaslaste rebukoti laiuste vahel olulist erinevust ei esine. Kõigis vaadeldud vanustes kasutati kolme (nii *Ric8^{-/-}* kui *Ric8^{+/-}* või *Ric8^{+/+}*) embrüo lõikudelt saadud andmeid. Vearibad joonisel tähistavad standardviga. ** $p \leq 0,01$



Joonis 11. Rebukoti pikkuse morfomeetiline analüüs E5.5-E7.5. Vanuses E5.5 on *Ric8^{-/-}* embrüote rebukott pesakonnakaaslaste (wt/het) rebukotist oluliselt lühem (mõõdetuna ektoplatsentaalkoonusest parietaalse endodermi distaalse otsani). Alates vanusest E6.5 algab *Ric8^{-/-}* embrüotel rebukoti ebanormaalne pikenemine ning vanuseks E7.5 on *Ric8^{-/-}* embrüo rebukott võrreldes pesakonnakaaslastega statistiliselt oluliselt pikem. Kõigis vaadeldud vanustes kasutati kolme (nii *Ric8^{-/-}* kui *Ric8^{+/-}* või *Ric8^{+/+}*) embrüo lõikudelt saadud andmeid. Vearibad joonisel tähistavad standardviga. * $p \leq 0,05$



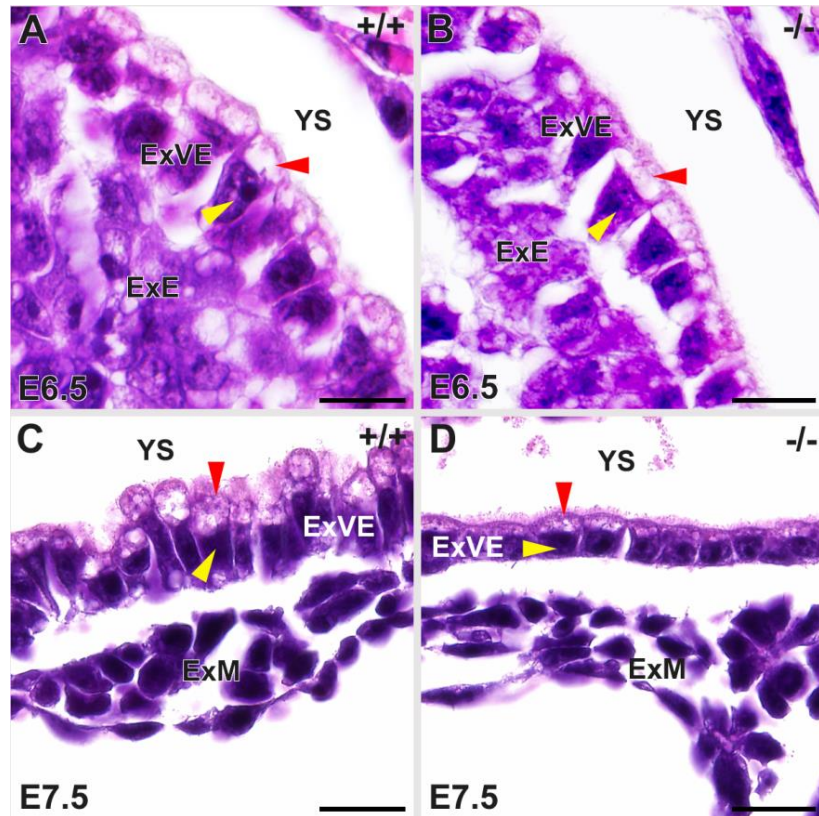
Joonis 12. Skemaatiline esitus embrüote rebukoti arengu dünaamikast. Vanuses E5.5 on *Ric8^{-/-}* embrüote rebukott võrreldes pesakonnakaaslastega oluliselt lühem. Alates vanusest E6.5 algab *Ric8^{-/-}* embrüote rebukoti pikenemine võrreldes pesakonnakaaslastega, saavutades ebanormalselt suured mõõtmed vanuseks E7.5. Joonisel on kujutatud embrüo ja rebukoti reaalsed proportsionaalsed suhted erinevate genotüüpide puhul erinevates vanustes.

4.3 *Ric8*^{-/-} embrüote ekstra-embrüonaalse vistseraalse endodermi iseloomustamine

Ric8^{-/-} embrüote ekstra-embrüonaalse vistseraalse endodermi (ExVE) morfoloogia kirjeldamiseks võrreldi histoloogilisi hematoksüliin-eosiin värvinguga koelõike *Ric8*^{-/-} ja *Ric8*^{+/+} embrüotest vanuses E6.5 ja E7.5.

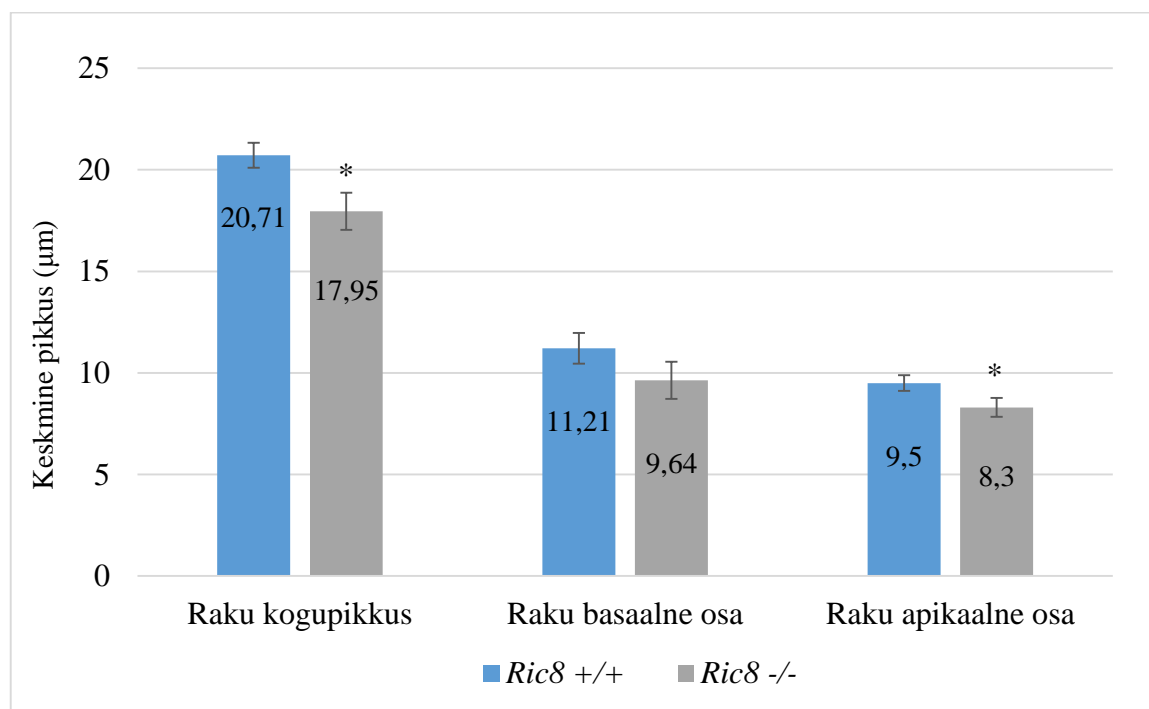
Varases gastrulatsiooni staadiumis, vanuses E6.5 sarnaneb *Ric8*^{-/-} embrüote ExVE rakkude fenotüüp *Ric8*^{+/+} embrüote omaga (Joonis 13A ja B). Mõlema genotüübi puhul on selgelt eristatavad pikliku kujuga ExVE rakkude apikaalsed osad, mis sisaldavad suuri apikaalseid vakuole, kui ka rakkude basaalsed osad, milles paikneb rakutuum (Joonis 13A ja B; apikaalne – punane nooleots, basaalne – kollane nooleots). Apikaalsed vakuoolid on mõlema genotüübi puhul võrreldava suurusega (Joonis 13A ja B, must nool). Kuigi visuaalsel hindamisel tundub, et *Ric8*^{-/-} ExVE rakkude morfoloogias võrreldes *Ric8*^{+/+} ExVE rakkudega tõsiseid kõrvalekaldeid ei esine, teostati täpsemaks analüüsiks ExVE rakkude morfomeetrilised mõõtmised. Saadud andmete analüüsil selgus, et *Ric8*^{-/-} embrüote ExVE rakud on vanuses E6.5 *Ric8*^{+/+} embrüote ExVE rakkudest statistiliselt oluliselt ($p < 0.05$) lühemad (Joonis 14). Kui vaadelda ExVE rakkude apikaalset osa, siis *Ric8*^{-/-} embrüotel on see võrreldes *Ric8*^{+/+} embrüotega oluliselt lühem ($p \leq 0,05$). Samuti on *Ric8*^{-/-} embrüote ExVE rakkude basaalne osa mõnevõrra lühem kui *Ric8*^{+/+} embrüote ExVE rakkude basaalne osa, ehkki tegemist pole statistiliselt olulisuse erinevusega ($p = 0,19$) (Joonis 14). Vaatamata väiksematele mõõtmetele on *Ric8*^{-/-} embrüote ExVE rakkudel apikaalse ja basaalse osa üldine proportsionaalne jaotus (54% basaalne/46% apikaalne) sarnane *Ric8*^{+/+} embrüotele.

Gastrulatsiooni staadiumis, vanuses E7.5 on *Ric8*^{-/-} ja *Ric8*^{+/+} embrüote vahelised erinevused ExVE rakkude morfoloogias selgesti eristatavad (Joonis 13C ja D). *Ric8*^{+/+} embrüote ExVE rakud on silinderepiteelile omaselt pikliku kujuga, rakkude basaalne ja apikaalne osa on selgelt eristuv ning apikaalses osas on nähtavad suured apikaalsed vakuoolid (Joonis 13C, kollane ja punane nooleots, must nool). *Ric8*^{-/-} ExVE rakud on erinevalt *Ric8*^{+/+} ExVE rakkudest pigem kuboidse kujuga ning nende apikaalne osa on märgatavalt õhem ning lamenenud. Lisaks sellele pole *Ric8*^{-/-} ExVE rakkude apikaalsed vakuoolid nii selgelt eristatavad kui *Ric8*^{+/+} embrüote ExVE rakkudes, olles oma mõõtmetelt tunduvalt väiksemad (Joonis 13D).

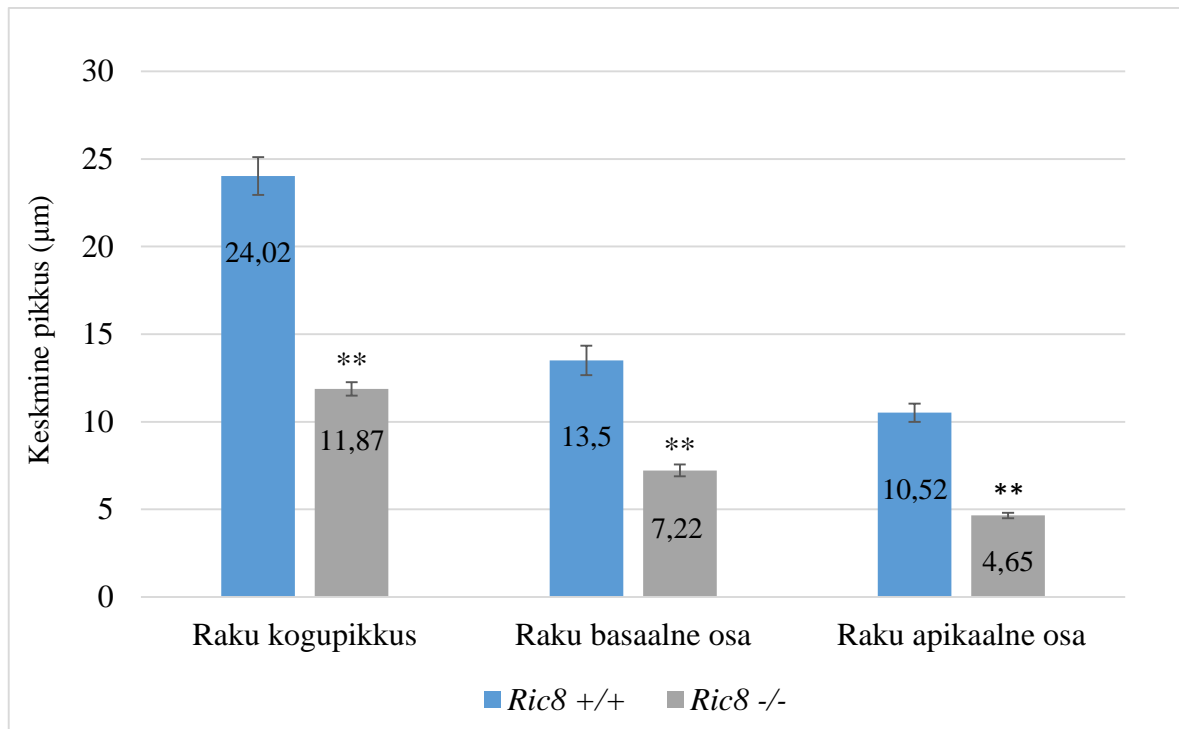


Joonis 23. *Ric8*^{-/-} ja *Ric8*^{+/+} embrüote ExVE histoloogiline analüüs. (A) Vanuses E6.5 on *Ric8*^{+/+} (+/+) embrüo ExVE rakkudel selgelt eristatav raku apikaalne osa, mis sisaldab apikaalseid vakuole ja raku basaalne osa, milles paikneb rakutuum. (B) *Ric8*^{-/-} embrüo ExVE rakkudes on sarnaselt *Ric8*^{+/+} ExVE rakkudele eristatavad nii vakuole sisaldav apikaalne kui ka tuuma sisaldav basaalne osa. (C) E7.5 vanuses *Ric8*^{+/+} embrüos on välja venitatud piklike ExVE rakkude apikaalne ja basaalne osa teineteisest selgelt eristatavad ja apikaalses osas on näha mitmeid vakuole. (D) *Ric8*^{-/-} embrüo ExVE rakud on vanuses E7.5 võrreldes *Ric8*^{+/+} ExVE rakkudega tunduvad lamedamad ja kuboidsemad. Rakkude märgatavalt õhnenud apikaalses osas ei ole võimalik selgelt eristada apikaalseid vakuole. Lühendid: av - apikaalne vakuool; ExE - ekstra-embrüonaalne ektoderm; ExM - ekstra-embrüonaalne mesoderm; ExVE - ekstra-embrüonaalne vistseraalne endoderm; YS - rebukott. Must nool osutab apikaalsele vakuoolile. Kollane nooleots tähistab ExVE rakkude basaalses osas. Punane nooleots tähistab ExVE rakkude apikaalset osa. Mõõtkava: 20µm

Morfomeetriline analüüs kinnitab, et vanuses E7.5 on *Ric8^{-/-}* embrüote ExVE rakud *Ric8^{+/+}* embrüote ExVE rakkudest oluliselt (~2 korda) lühemad ($p < 0,01$; Joonis 15). Nii apikaalse kui basaalse osa pikkused on *Ric8^{-/-}* embrüote ExVE rakkudes võrreldes *Ric8^{+/+}* embrüote apikaalse ja basaalse osa pikkustega oluliselt lühemad ($p < 0,01$; Joonis 15). Lisaks sellele on muutunud ExVE rakkude apikaalse ja basaalse osa proportsionaalne jaotus raku. *Ric8^{+/+}* embrüote ExVE rakkude basaalse osa pikkus on keskmiselt 13,5 μm ja moodustab 56% raku kogupikkusest ning apikaalse osa pikkus on keskmiselt 10,52 μm , moodustades 44% raku kogupikkusest. Samas on *Ric8^{-/-}* embrüote ExVE rakkude basaalse osa pikkus keskmiselt 7,22 μm ja moodustab 60% raku kogupikkusest ning apikaalse osa pikkus on keskmiselt 4,65 μm moodustades 40% raku kogupikkusest.



Joonis 14. *Ric8^{-/-}* ExVE rakkude morfomeetriliste mõõtmiste tulemused vanuses E6.5. *Ric8^{-/-}* embrüote (n=3) ExVE rakud on võrreldes *Ric8^{+/+}* embrüote (n=3) ExVE rakkudega oluliselt lühemad. ExVE rakkude basaalse osa keskmine pikkus on *Ric8^{-/-}* ja *Ric8^{+/+}* embrüotel sarnane. *Ric8^{-/-}* ExVE rakkude apikaalse osa keskmine pikkus on oluliselt lühem kui *Ric8^{+/+}* embrüotel. Vearibad joonisel tähistavad standarddviiga. Statistilise olulisuse hindamiseks on kasutatud t-testi. * $p < 0,05$



Joonis 15. *Ric8*^{-/-} ExVE rakkude morfoomeetrislike mõõtmiste tulemused vanuses E7.5. *Ric8*^{-/-} embrüote (n=3) ExVE rakkude keskmine pikkus on oluliselt lühem kui *Ric8*^{+/+} embrüote (n=3) ExVE rakkudel. *Ric8*^{-/-} embrüote ExVE rakkude basaalsed kui ka apikaalsed osad on võrreldes *Ric8*^{+/+} embrüote ExVE rakkudega tunduvalt lühemad. Vearibad joonisel tähistavad standardviga. Statistilise olulisuse hindamiseks on kasutatud t-testi. ** p<0.01

ARUTELU

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli analüüsida ja kirjeldada *Ric8*^{-/-} embrüote ekstra-embrüonaalsete kudede morfoloogiat ja histoloogiat varajases post-implantatsioonilises arengus. Ekstra-embrüonaalsete kudede korrektne areng on hädavajalik tiinuse normaalseks kulgemiseks ja säilimiseks. Ekstra-embrüonaalsed koed vahendavad ema ja loote vahelisi interaktsioone, kaitsevad embrüot ema immuunsüsteemi eest ning nende kudede vahendusel jõuavad embrüoni toitained. Magistritöös kirjeldatud katsetes uuriti embrüoid vanuses E5.5-E7.5. Sellel arenguperioodil kuuluvad ekstraembrüonaalsete kudede hulka trofektodermi päritolu primaarsed trofoblasti gigantrakud (pTG rakud), ektoplatsentaalkoonus ja ekstra-embrüonaalne ektoderm ning primitiivse endodermi päritolu parietaalne endoderm ja vistseraalne endoderm. Parietaalse endodermi ja pTG rakkude vahele jääb parietaalse endodermi rakkude poolt sünteesitud Reichert'i membraan (RM), mis toimib filtrina mille kaudu liiguvad makromolekulid embrüo ja ema organismi vahel.

Antud töös analüüsiti *Ric8*^{-/-} embrüote Reichert'i membraani struktuuri *whole-mount* immunohistokeemilisel meetodil vanuses E6.5. Katsete tulemusena selgus, et *Ric8*^{-/-} embrüote Reichert'i membraan on terviklik. Seda toetab eelkõige fakt, et *Ric8*^{-/-} embrüote puhul ei täheldatud ema vererakkude sattumist rebukotti. Ema vererakkude esinemine rebukoti sisemuses on üldine indikaator sellest, et Reichert'i membraanis esineb katkeid (Pöschl jt., 2004; Williamson jt., 1997). Kuna ema vererakke *Ric8*^{-/-} embrüo rebukotis ei esine võib väita, et *Ric8*^{-/-} embrüo RM toimib efektiivse barjäärina ema organismi ja embrüo vahel. Siiski on Reichert'i membraanil embrüonaalses arengus ka teine oluline funktsioon.

Reichert'i membraani pinnal paiknevad primaarsed trofoblasti gigantrakud, mis on olulised ema ja loote vahelise ühenduse loomisel (Cross jt., 1994). Varasemalt on näidatud, et *Ric8* ekspresseerub pTGC rakkudes (Tõnissoo jt., 2010). Reichert'i membraan reguleerib pTG rakkude funktsiooni läbi erinevate laminiini subühikute ekspressiooni (Klaffky jt., 2001, 2006; Miner jt., 2004). pTG rakud interakteeruvad neis ekspresseeruva integriini retseptori $\alpha 7\beta 1$ kaudu laminiini isovormidega, mis mõjutavad pTG rakkude funktsiooni erinevalt (Klaffky jt., 2001). pTG rakud on invasiivsed rakud, mis tungivad emaka detsiiduassee. See funktsioon on otseselt seotud pTG rakkudes ekspresseeruva integriini ja implantatsioonisaidis ekspresseeruvate laminiinide vaheliste interaktsioonidega (Klaffky jt., 2001, 2006). Magistritöös näidati mitmeid *Ric8*^{-/-} embrüote arenguanomaaliaid, mis võiks otseselt või kaudselt olla seotud pTG rakkude häiritud funktsiooniga. Näiteks täheldati *Ric8*

^{-/-} välja dissekteeritud embrüote puhul seda, et *Ric8^{-/-}* embrüote pinnal paikneb rohkem rakke kui *Ric8^{+/-}* embrüote pinnal. Selleks, et teada, kui suur hulk neist rakkudest on pTG rakud oleks vaja kasutada mõnda pTG rakkude spetsiifilist markerit. Selliseks pTG rakkude spetsiifiliseks markeriks on näiteks platsentaalne laktogeen-1 (PL-1) (Simmons jt., 2008). Lisaks leidis *Ric8^{-/-}* mutantseid embrüoid ümbritsevatel rakkudel ebatüüpilisi laminiini kogumikke. Kuna embrüot ümbritseva detsiidua rakkudes laminiin-1 sel perioodil ei ekspresseeru, siis ei saa nähtud laminiini ekspressioon olla detsiidua päritolu (Klaffky jt., 2001). Histoloogilistel preparaatidel nähti, et *Ric8^{-/-}* embrüote Reichert'i membraani ümbritseb hulgaliselt ema erütrotsüüte ning detsiidua ja Reichert'i membraani vahele jääb suur vahemik. *Ric8^{+/-}* embrüote puhul on ema erütrotsüütide hulk tunduvalt madalam ja Reichert'i membraan paikneb vastu detsiiduat. Neid anomaaliaid arvestades võib oletada, et *Ric8^{-/-}* embrüotes on häiritud pTG rakkude fagotsütootilise mehhanismi kaudu toimuv invasioon emaka detsiiduasse. RIC8 rolli on näidatud fagotsütootilistes protsessides. RIC8 valgus vähenenud ekspressioon makrofaagides vähendab oluliselt makrofaagide fagotsütoosi võimet (Huang jt., 2014). Võimalik, et RIC8 puudus mõjutab pTG rakkude invasiooni võimet ka integriinide kaudu. Integriini retseptorite aktiveerimisel osalevad erinevad G valgud (Patel, 2004). RIC8 osaleb G valkude poolt vahendatud signaaliülekanne rajas guaniini nukleotiidivahetusfaktorina ning lisaks toimib Ga subühikute tsäperonina (Chan jt., 2013; Tall jt., 2003). Integriinide normaalne funktsioon on emaka ja embrüo vahelise kontakti loomiseks hädavajalik. Integriin $\beta 1$ mutantsed embrüod ei ole võimelised looma tugevat kontakti emaka detsiiduaga ning surevad vanuses E5.5 erinevate arengudefektide tõttu (Stephens jt., 1995).

pTG rakud ekspresseerivad ka erinevaid para- ja endokriinseid faktoreid, mis on olulised tiinuse edukaks kulgemiseks. Näiteks ekspresseerub neis vere hüübimist takistav valk trombomoduliin, mille puudus on embrüonaalselt letaalne (Isermann jt., 2003). Vere hüübimise takistamine on oluline selleks, et embrüoni jõuaks piisavalt toitaineid. *Ric8^{-/-}* embrüotel on täheldatud ema vererakkude (erütrotsüütide) kogunemist Reichert'i membraani ümbrusesse. Sellise fenotüübi üheks põhjuseks võiks olla pTG rakkude häiritud funktsioon. Selle oletuse kinnitamiseks oleks oluline teada, kas Reichert'i membraani ümbritsev veri on hüübinud.

Käesolevas töös nähti ka mitmeid defekte *Ric8^{-/-}* embrüote rebukoti arengus. Vanuses E6.5 täheldati laminiini ebanormaalset kogunemist *Ric8^{-/-}* embrüote distaalsesse otsa. Lisaks sellele algab selles vanuses ka *Ric8^{-/-}* embrüote rebukoti ebanormaalne välja venimine, mis

vanuses E7.5 on saavutanud märkimisväärsed mõõtmised. Gastrulatsiooni staadiumis toimub embrüo toitmine ekstraembrüonaalsete kudede vahendusel. Toitained jõuavad läbi Reichert'i membraani difusiooni kaudu rebukoti õõnsusesse, kust need transporditakse vistseraalse endodermi vahendusel embrüoni. Vistseraalse endodermi rakkudes toimuvat endotsütoosi protsessi nimetatakse mikroautofaagia sarnaseks protsessiks (Kawamura jt., 2012). VE rakkudel on spetsiifiline morfoloogia, mis on eriti selgelt välja kujunenud ekstraembrüonaalse vistseraalse endodermi rakkudes. ExVE rakud sisaldavad suuri apikaalseid vakuole, milles toimub endotsüteeritud molekulide protsessimine (Kawamura jt., 2012). Käesolevas töös analüüsiti *Ric8^{-/-}* embrüote ExVE rakkude morfoloogiat ning analüüsi tulemusena selgus, et vanuses E7.5 on *Ric8^{-/-}* ExVE rakkude morfoloogia tugevalt häirunud. *Ric8^{-/-}* ExVE rakkude apikaalses osas paiknevad apikaalsed vakuoolid on tunduvalt väiksemad ning rakkude apikaalse ja basaalse osa proportsioonid on oluliselt muutunud. See annab infot sellest, et *Ric8^{-/-}* embrüote ExVE ei funktsioneeriks efektiivselt, ning see võib olla ka põhjuseks, miks toimub vedeliku kogunemine rebukotti ja rebukoti välja venimine. Lisaks sellele võib oletada, et *Ric8^{-/-}* embrüo jääb tänu defektsetele ExVE rakkudele toitainete vaegusesse. Seda tõestab ilmekalt ka fakt, et *Ric8^{-/-}* embrüod on kasvult väiksemad ja neil esineb arenguline mahajäämus (Tõnissoo jt., 2010).

Vistseraalne endoderm toimib ka embrüo kehaplaani kujundavate signaalide vahendajana ja on oluline anterio-posterioorse kehatelje välja kujunemiseks (Thomas ja Beddington, 1996). Vistseraalse endodermi endotsütoosi defektide puhul toimub anterio-posterioorse telje markerite *Lefty*, *Cer1*, *Nodal* ja *Brahury* korrektne positsioneerumine E6.2 vanuses embrüos, kuid nende markerite ekspressioonitase on madalam, embrüod ei läbi korrektselt gastrulatsiooni ja surevad gastrulatsioonistaadiumis (Kawamura jt., 2012). *Ric8^{-/-}* embrüote puhul on varasemalt vaadeldud *Cer1* ja *Nodal* ekspressiooni vanuses E6.5 (Tõnissoo jt., 2010). *Ric8^{-/-}* embrüotes toimub nende markerite positsioneerumine samuti üldiselt korrektselt kuid ekspressioon on nõrgem ning embrüod surevad gastrulatsioonidefektide tõttu (Tõnissoo jt., 2010). Seega võivad embrüos esinevad gastrulatsioonidefektid tuleneda ekstra-embrüonaalse koe, vistseraalse endodermi, defektsest arengust. RIC8 roll vistseraalse endodermi endotsütoosilise funktsiooni välja kujunemisel võib olla seotud laminiini ekspressiooniga. Katsetes embrüoidkehadega on näidatud, et embrüoidkehad, mis on laminiin- α 1 globulaarsete domäänide 4-5 defitsiitsed toimub endotsütoosis osalevate geenide ekspressioonitaseme langus, mis viitab VE defektsele diferentseerumisele (Åkerlund jt., 2009). *In vitro* katsetes *Ric8* mutantsete gliia

rakkudega on näidatud, et nendel rakkudel on probleeme kinnitumisega laminiinile (Ma jt., 2012). Basaalembraani defekte on täheldatud ka neurospetsiifiliste *Ric8* konditsionaalsete hiire mutantide ajukelmetel all paiknevas basaalembraanis (Kask jt., 2015). Samuti on teada, et vanuses E7.5 esineb *Ric8*^{-/-} embrüotel VE basaalembraanis defekte (Tõnisoo jt., 2010). Sellest tulenevalt võib *Ric8*^{-/-} embrüote ExVE rakkudel kirjeldatud morfoloogiline eripära olla seotud ExVE rakkude all paikneva basaalembraaniga, mis vanuses E6.5 on võrreldav pesakonnakaaslastega kuid milles esinevate defektide ilmumist on täheldatud vanuses E7.5 (Tõnisoo jt., 2010).

Käesolevas töös demonstreeriti mitmeid *Ric8*^{-/-} embrüote ekstra-embrüonaalsete kudede defekte. *Ric8*^{-/-} embrüotel on tõsiseid probleeme rebukoti ning vistseraalse endodermi arengus. Varasemalt ei ole *Ric8*^{-/-} embrüote ekstra-embrüonaalsete kudede arengule tähelepanu pööratud, kuid käesoleva töö tulemused näitavad, et ekstra-embrüonaalsete kudede defektidel võib olla oluline roll *Ric8*^{-/-} embrüotele omaste arenguanomaaliate ja letaalsuse tekkel.

KOKKUVÕTE

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli analüüsida ja kirjeldada *Ric8^{-/-}* embrüote ekstraembrüonaalsete kudede morfoloogiat ja histoloogiat varajases post-implantatsioonilises arengus.

Eksperimentaalses osas saadud tulemuste põhjal tehti järgnevad kokkuvõtavad järeldused:

1. *Ric8^{-/-}* Reichert'i membraan on terviklik ning võimeline toimima efektiivse barjäärina ema organismi ja embrüo vahel.
2. Vanuses E6.5 on *Ric8^{-/-}* embrüote basaalmembraan intaktne.
3. *Ric8^{-/-}* embrüote rebukott hakkab vanuses E6.5 ebanormaalselt pikenema, saavutades eaproportsionaalselt suured mõõtmed vanuseks E7.5.
4. *Ric8^{-/-}* embrüote rebukoti distaalses osas paikneb ebatüüpiline laminiini-rikas rakke sisaldav välja veninud morfoloogiaga struktuur.
5. *Ric8^{-/-}* embrüote ekstraembrüonaalne vistseraalne endoderm (ExVE) on vanuses E7.5 defektne. Rakud on lühemad ning sisaldavad võrreldes pesakonnakaaslaste ExVE rakkudega tunduvalt väiksemaid apikaalseid vakuole.

SUMMARY

Guanine exchange factor RIC8 in the development of mouse extraembryonic tissues.

Marii Ojastu

The development of extra-embryonic tissues is a critical prerequisite for effective implantation and development of the embryo. In the embryonic development of mice the extra-embryonic tissues protect the embryo from mothers immune system and provide nutrition for the embryo before the development of a fully functional placenta. The extra-embryonic tissues responsible for those functions are the primary trophoblast giant cells, Reichert's membrane and parietal and visceral endoderm that together form the yolk sac. Therefore it is important to study the molecular processes that are part of the development of those tissues with carry such big responsibility in the early development of the mouse embryo. The current research focused on analysing and describing the morphology and histology of extra-embryonic tissues in RIC8 mutant mice. RIC8 is a conserved guanine exchange factor that functions in G protein signaling pathway. It also has an additional role as a *chaperone* in the synthesis of G protein α subunits. Numerous studies have shown RIC8 role in fundamentally important biological processes like cell division, adhesion, migration and signal transduction. Absence of RIC8 has proven to be embryonically lethal in mice. RIC8 deficient embryos die around 7.5 days into embryonic development due to various defects in gastrulation. Through immunohistochemical and histological methods we show that RIC8 mutants express various defects in the development of extraembryonic tissues. We established that the yolk sac and the basement membrane of RIC8 mutants (E6.5) is intact, although it shows different developmental anomalies. We demonstrated excessive synthesis of basement membrane component laminin-1 in the distal part of RIC8 mutant embryos yolk sac. In addition we established that the yolk sac of RIC8 mutant embryos grows excessively in length and reaches abnormal size by the embryonic day 7.5. The morphology of the cells of extra-embryonic visceral endoderm (ExVE) of RIC8 mutant embryos has drastically changed compared to the littermates. By the embryonic day E7.5 the cells of RIC8 mutant ExVE have reduced in size and show very small apical vacuoles. The results conclude that the extra-embryonic tissues that form the yolk sac of RIC8 mutant embryos express various defects that have a potentially strong impact on the development of the mutant embryos.

TÄNUSÕNAD

Täna juhendajaid Tambet Tõnissood ja Sirje Lullat. Suurimad tänusõnad ka Riho Meierile kes on magistritöö valmimisel olnud abiks kasulike nõuannete ja ideedega. Lisaks täna Toomas Jagomäed, Keiu Kaske ja Katrin Ruisut.

KIRJANDUSE LOETELU

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 Ga function during asymmetric division of *C. Elegans* embryos. *Cell*. 119:219-230

Afshar, K., Willard, F.S., Colombo, K., Siderovski, D.P., Gönczy. (2005) Cortical localization of the Ga protein GPA-16 requires RIC-8 function during *C. Elegans* asymmetric cell division. *Development*. 132(20):4449-4459

Agurto-Maldonado, R., Toro, G., Fuentealba, J., Arriagada, C., Albistur, M., Henriquez, J.P., Olate, J., Hinrichs, M.V., Torrejón, M. (2011) Cloning and spatiotemporal expression of RIC-8 in *Xenopus* embryogenesis. *Gene Expression Patterns*. 11:401-408

Åkerlund, M., Carmignac, V., Schéele, S., Durbeej, M. (2009) Laminin α 1 domains LG4-5 are essential for the complete differentiation of visceral endoderm. *Cell Tissue Res*. 338:129-137

Alexander, C.M., Hansell, E.J., Behrendtsen, O., Flannery, M.L., Kishnani, N.S., Hawkes, S.P., Werb, Z. (1996) Expression and function of matrix metalloproteinases and their inhibitors at the maternal-embryonic boundary during mouse embryo implantation. *Development*. 122:1723-1736

Alfandari, D., Cousin, H., Marsden, M. (2010) Mechanism of *Xenopus* cranial neural crest cell migration. *Cell. Adh. Migr*. 4(4): 553-560

Aplin, J.D., Kimber, S.J. (2004) Trophoblast-uterine interactions at implantation. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2:48

Bielinska, M., Narita, N., Wilson, D.B. (1999) Distinct roles for visceral endoderm during embryonic mouse development. *Int. J. Dev. Biol*. 43:183-205

Basak, S., Dhar, R., Das, C. (2002) Steroids modulate the expression of α 4 integrin in mouse blastocysts and uterus during implantation. *Biology of Reproduction*. 66:1784-1789

Boucher, D.M., Pedersen, R.A. (1996) Induction and differentiation of extra-embryonic mesoderm in the mouse. *Reprod. Fertil. Dev*. 8:765-777

Cabera-Vera, T.M., Vanhauwe, J., Thomas, T.O., Medkova, M., Preininger, A., Mazzoni, M. R., Hamm, H.E. (2003) Insights into G Protein Structure, Function, and Regulation. *Endocrine Reviews*. 26 (4):765-781

Cai, K.Q., Capo-Chichi, C.D., Rula, M. E., Yang, D-H., Xu, X-X. (2008) Dynamic GATA6 expression in primitive endoderm formation and maturation in early mouse embryogenesis. *Developmental Dynamics*. 237:2820-2829

Cano, A., Pérez-Moreno, M.A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M.J., Barrio, M., Portillo, F., Nieto, M.A. (2000) The transcription factor Snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat. Cell Biol.* 2:76-83

Chan, P., Gabay, M., Wright, F.A., Tall, G.G. (2011) Ric-8B is a GTP-dependent G protein α_s guanine nucleotide exchange factor. *J. Biol. Chem.* 286 (22): 19932-19942

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: 3794-3799

Chattopadhyay, A. (2014) GPCRs: lipid-dependent membrane receptors that act as drug targets. *Advances in Biology*. 2014: ID 143023

Conlon, F. L., Lyons, K.M., Takaesu, N., Barth, K.S., Kispert, A., Herrmann, B., Robertson, E.J. (1994) A primary requirement for *nodal* in the formation and maintenance of the primitive streak in the mouse. *Development*. 120:1919-1928

Coucouvanis, E., Martin, G.R. (1995) Signals for death and survival: a two-step mechanism for cavitation in the vertebrate embryo. *Cell*. 83:279-287

Cross, J.C., Werb, Z., Fisher, S.J. (1994) Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. *Science*. 266:1508-1518

David, N.B., Martin, C.A., Segalen, M., Rosenfeld, F., Schweisguth, F., Bellaïche. (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 Biol.* 7:1083-1090

Dey, S.K., Lim,H., Das, S.K., Reese, J., Paria, B.C., Daikoku, T., Wang, H. (2004) Molecular cues to implantation. *Endocrine Reviews*. 25(3):341-373

Du, Q., Stukenberg, P.T., Macara, I.G. (2001) A mammalian Partner of inscuteable binds NuMa and regulates mitotic spindle organization. *Nature Cell Biology*. 3 (12):1069-1075

Du, Q., Macara, P.T. (2004) Mammalian Pins is a conformational switch that links NuMa to heterotrimeric G proteins. *Cell*. 119:503-516

Dupré, D.J., Robitaille, M., Richer, M., Éthier, N., Mamarbachi, A.M., Hébert, T.E. (2007) Dopamine Receptor-interacting Protein 78 acts as a molecular chaperone for G γ subunits before assembly with G β . *J. Biol. Chem*. 282: 13703-13715

Ellenbroek, S.I.J., Collard, J.G. (2007) Rho GTPases: functions and association with cancer. *Clin. Exp. Metastasis*. 24:657-672

Fuentealba, J., Toro-Tapia, G., Arriagada, C., Riquelme, Beyer, A., Henriquez, P., Caprile, T., Mayor, R., Marcellini, S., Hinrichs, M.V., Olate, J., 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

Futaki, S., Hayashi, Y., Yamashita, M., Yagi, K., Bono, H., Hayashizaki, Y., Okazaki, Y., Sekiguchi, K. (2003) Molecular basis of constitutive production of basement membrane components. *J. Biol. Chem*. 278:50691-50701

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 alpha subunit membrane association. *Sci. Signal*. 4(200): ra79

Gersdorff, N., Müller, M., Otto, S., Poschandel, R., Hübner, S., Miosge, N. (2005) Basement membrane composition in the early mouse embryo day 7. *Developmental Dynamics*. 233:1140-1148

Gotta, M., Ahringer, J. (2001) Distinct roles for G α and G $\beta\gamma$ in regulating spindle position and orientation in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Nature Cell Biol*. 3:297-300

Gotta, M., Dong, Y., Peterson, Y.K., Lanier, S.M., Ahringer, J. (2003) Asymmetrically distributed *C. Elegans* homologs of AGS3/PINS control spindle position in the early embryo. *Current Biology*. 13:1029-1037

Haghighi Poodeh, S., Salonurmi, T., Nagy, I., Koivunen, P., Vuoristo, J., Räsänen, J., Sormunen, R., Vainio, S., Savolainen, M.J. (2012) Alcohol-induced premature permeability of mouse placenta-yolk sac barriers *in vivo*. *Placenta*. 33(10):866-873

Hamatani, T., Daikoku, T., Wang, H., Matsumoto, H., Carter, M.G., Ko, M.S.H., Dey, S.K. (2004) Global gene expression analysis identifies molecular pathways distinguishing blastocyst dormancy and activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101(28):10326-10331

Hampoelz, B., Hoeller, O., Bowman, S.K., Dunican, D., Knoblich, J.A. (2005) *Drosophila* Ric-8 is essential for plasma-membrane localization of heterotrimeric G proteins. *Nature Cell Biol.* 7(11): 1099-1105

Hart, J. M., Jiang, X., Kozasa, T., Roscoe, W., Singer, W.D., Gilman, A.G., Sternweis, P.C., Bollag, G. (1998) Direct stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115 RhoGEF by G α_{13} . *Science*. 280: 2112-2114

Hewavitharana, T., Wedegaertner, P.B. (2012) Non-canonical signaling and localizations of heterotrimeric G proteins. *Cellular Signaling*. 24(1), 25-34

Huang, N-N., Becker, S., Boullaran, C., Kemenyeva, O., Vural, A., Hwang, I-Y., Shi, C-S., Kehrl, J.H. (2014) Canonical and noncanonical G-protein signaling helps coordinate actin dynamics to promote macrophage phagocytosis of Zymosan. *Mol Cell Biol.* 34(22): 4186-4199

Humrich, J., Bermel, C., Bünemann, M., Härmark, L., Frost, R., Quitterer, U., Lohse, M. J. (2005) Phosducin-like protein regulates G-protein $\beta\gamma$ folding by interaction with Tailless Complex polypeptide-1a. *J. Biol. Chem.* 280: 20042-20050

Isermann, B., Sood, R., Pawlinski, R., Zogg, M., Kalloway, S., Degen, J.L., Mackman, N., Weiler, H. (2003) The thrombomodulin-protein C system is essential for the maintenance of pregnancy. *Nature medicine*. 9(3):331-337

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*. DOI: 10.1002/dneu.22264

Kawamura, N., Sun-Wada, G-H., Aoyama, M., Harada, A., Takasuga, S., Sasaki, T., Wada, Y. (2012) Delivery of endosomes to lysosomes via microautophagy in the visceral endoderm of mouse embryos. *Nat. Commun.* 3:1071 DOI:10.1038

Klaffky, E., Williams, R., Yao, C-C., Ziober, B., Kramer, R., Sutherland, A. (2001) Trophoblast-specific expression and function of the integrin $\alpha 7$ subunit in the peri-implantational mouse embryo. *Developmental Biology.* 239:161-175

Klaffky, E.J., Gonzales, I.M., Sutherland, A.E. (2006) Trophoblast cells exhibit differential responses to laminin isoforms. *Developmental Biology.* 292:277-289

Kroeze, W.K., Sheffler, D.J., Roth, B.L. (2003) G-protein-coupled receptors at a glance. *Cell Science.* 116, 4867-4869

Leunda-Casi, A., Hertogh, R., Pampfer, S. (2001) Control of trophectoderm differentiation by inner cell mass-derived fibroblast growth factor-4 in mouse blastocysts and corrective effect of FGF-4 on high glucose-induced trophoblast disruption. *Mol. Reprod. Dev.* 60:38-46

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. *Journal of Neuroscience.* 32(43):14979-14993

May, R.C., Machesky, L.M. (2001) Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *J.Cell.Sci.* 114:1061-1077

Migeotte, I., Omelchenko, T., Hall, A., Anderson, K.V. (2010) Rac1-dependent collective cell migration is required for specification of the anterior-posterior body axis of the mouse. *PLoS.* 8(8):e1000442

Mijaljica, D., Prescott, M., Devenish, R.J. (2011) Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy.* 7(7):673-682

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 α_q signaling in the *C. Elegans* nervous system. *Neuron.* 27:289-299

Miller, K.G., Rand, J.B. (2000) A role for RIC-8 (Synembryn) and GOA-1 (G α_a) in regulating a subset of centrosome movements during early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* 156:1649-1660.

Mills, E., Lamonica, K., Hong, T., Pagliaruli, T., Mulrooney, J., Gabel, L. (2005) Roles for Rho/ROCK and Vinculin in parietal endoderm migration. *Cell Commun. Adhes.* 12:9-22

Miner, J.H., Li, C., Mudd, J.L., Go, G., Sutherland, A.E. (2004) Compositional and structural requirements for laminin and basement membranes during mouse embryo implantation and gastrulation. *Development.* 131(10):2247-2256

Murray, P., Edgar, D. (2000) Regulation of programmed cell death by basement membranes in embryonic development. *J. Cell Biol.* 150(5):1215-1221

Niimi, T., Hayashi, Y., Futaki, S., Sckiguchi, K. (2004) SOX7 and SOX17 regulate the parietal endoderm-specific enhancer activity of mouse laminin $\alpha 1$ gene. *J. Biol. Chem.* 279(36):38055-38061

Ojastu, M. (2013) Guaniini nukleotiividivahetusfaktor RIC8 hiire lõigustumisel (E1.5-E4.0) Bakalaureusetöö

Oldham, W.M., Hamm, H.E. (2008) Heterotrimeric G protein activation by G protein coupled receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9:60-71

Palis, J., McGrath, K.E., Kingsley, P.D. (1995) Initiation of hematopoiesis and vasculogenesis in murine yolk sac explants. *Blood.* 86(1):156-163

Parast, M.M., Aeder, S., Sutherland, A. (2001) Trophoblast giant-cell differentiation involves changes in cytoskeleton and cell motility. *Dev. Biol.* 230:43-60

Paria, B.C., Huet-Hudson, Y.M., Dey, S.K. (1993) Blastocyst's state of activity determines the 'window' of implantation in the receptive mouse uterus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:10159-10162

Paria, B.C., Ma, W., Tan, J., Raja, S., Das, S.K., Dey, S.K., Hogan, B.L.M. (2001) Cellular and molecular responses of the uterus to embryo implantation can be elicited by locally applied growth factors. *PNAS.* 98(3):1047-1052

Patel, T.B. (2004) Single transmembrane spanning heterotrimeric G Protein-Coupled receptors and their signaling cascades. *Pharmacol. Rev.* 56(3):371-385

Perea-Gomez, A., Rhinn, M., Ang, S-L. (2001) Role of the anterior visceral endoderm in restricting posterior signals in the mouse embryo. *Int. J. Dev. Biol.* 45:311-320

Perea-Gomez, A., Vella, F.D.J., Shawlot, W., Oulad-Abdelghani, M., Chazaud, C., Meno, C., Pfister, V., Chen, L., Robertson, E., Hamada, H., Behringer, R. R., Ang, S-L. (2002) Nodal antagonists in the anterior visceral endoderm prevent the formation of multiple primitive streaks. *Developmental Cell*. 3:745-756

Peters, K.A., Rogers, S.L. (2013) *Drosophila* Ric-8 interacts with the $G\alpha_{12/13}$ subunit, Concertina, during activation of the Folded gastrulation pathway. *Mol. Biol. Cell*. 24:3460-3471

Plaks, V., Rickenberger, J., Dai, J., Flannery, M., Sund, M., Kanasaki, K., Ni, W., Kalluri, R., Werb, Z. (2013) Matrix metalloproteinase-9 deficiency phenocopies features of preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110(27):11109-11114

Pöschl, E., Schlötzer-Schrehardt, U., Brachvogel, B., Saito, K., Ninomiya, Y., Mayer, U. (2004) Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development. *Development*. 131(7):1619-1628

Ramathal, C.Y., Bagchi, I.C., Taylor, R.N., Bagchi, M.K. (2010) Endometrial decidualization: of mice and men. *Semin. Reprod. Med.* 28(1):17-26.

Rassoulzadegan, M., Rosen, B.S., Gillot, I., Cuzin, F. (2000) Phagocytosis reveals a reversible differentiated state early in the development of the mouse embryo. *EMBO J.* 19(13):3295-3303

Rossant, J. (2001) Stem cells from the mammalian blastocyst. *Stem Cells*. 19:477-482

Rossant, J., Cross, J.C. (2001) Placental development: lessons from mouse mutants. *Nat. Rev. Genet.* 2:538-548

Rout, U.K., Wang, J., Paria, B.C., Armant, D.R. (2004) $\alpha 5\beta 1$, $\alpha V\beta 3$ and the platelet-associated integrin $\alpha IIb\beta 3$ coordinately regulate adhesion and migration of differentiating mouse trophoblast cells. *Dev. Biol.* 268:135-151

Ruisu, K., Kask, K., Meier, R., Saare, M., Raid, R., Verakšitš, A., Karis, A., Tõnissoo, T., Pooga, M. (2013) Ablation of RIC8A function in mouse neurons leads to a severe neuromuscular phenotype and postnatal death. *PLoS ONE*. 8(8):1-11

Sastry, S.K., Burridge, K. (2000) Focal adhesions: A nexus for intracellular signaling and cytoskeletal dynamics. *Experimental Cell Research*. 261:25-36

Schaefer, M., Shevchenko, A., Shevchenko, A., Knoblich, J.A. (2000) A protein complex containing Inscuteable and the Ga-binding protein Pins orients asymmetric cell divisions in *Drosophila*. *Current Biology*. 10:353-362

Schultz, J.F., Mayernik, L., Rout, U.K., Armant, R. (1997) Integrin trafficking regulates adhesion to fibronectin during differentiation of mouse peri-implantation blastocysts. *Developmental Genetics*. 21:31-43

Screen, M., Dean, W., Cross, J.C., Hemberger, M. (2008) Cathepsin proteases have distinct roles in trophoblast function and vascular remodelling. *Development*. 135:3311-3320

Shim, C., Choi, D., Kwon, H.B., Kim, K. (1997) Expression of laminin chain-specific gene transcripts in mouse uterine tissues during peri-implantation period. *Molecular reproduction and development*. 48:176-184

Simmons, D.G., Rawn, S., Davies, A., Hughes, M., Cross, J.C. (2008) Spatial and temporal expression of the 23 murine prolactin/placental lactogen-related genes is associated with their positions in the locus. *BMC Genomics* doi:10.1186/1471-2164-9-352

Smith, K.K., Strickland, S. (1981) Structural components and characteristics of Reichert's membrane, and extra-embryonic basement membrane. *J. Biol. Chem.* 256(9):4654-4661

Stephens, L.E., Sutherland, A.E., Klimanskaya, I.V., Andrieux, A., Meneses, J., Pedersen, R.A., Damsky, C.H. (1995) Deletion of $\beta 1$ integrins in mice results in inner cell mass failure and peri-implantation lethality. *Genes and Development*. 9:1883-1985

Sudarov, A., Joyner, A.L. (2007) Cerebellum morphogenesis: the foliation pattern is orchestrated by multi-cellular anchoring centers. *Neural Development*. 2(26):1-21

Sulston, J.E., Schierenberg, E., White, J.G., Thomson, J.N. (1983) The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 100:64-119

Sutherland, A. (2003) Mechanisms of implantation in the mouse: differentiation and functional importance of trophoblast giant cell behaviour. *Developmental Biology*. 258:241-251

Takaoka, K., Yamamoto, M., Hamada, H. (2011) Origin and role of distal visceral endoderm, a group of cells that determines anterior-posterior polarity of the mouse embryo. *Nat. Cell Biol.* 13(7):743-752

Takaoka, K., Hamada, H. (2012) Cell fate decisions and axis determination in the early mouse embryo. *Development.* 139(1):3-14

Tall, G.G., Krumins, A.M., Gilman, A.G. (2003) Mammalian Ric-8A (Synembryn) is a heterotrimeric G α Protein Guanine Nucleotide Exchange Factor. *J. Biol. Chem.* 278 (10): 8356-8362

Tall, G.G., Gilman, A.G. (2004) Purification and functional analysis of Ric-8A: a guanine nucleotide exchange factor for G-protein alpha subunits. *Methods Enzymol.* 390:377-388

Tall, G.G., Gilman, A.G. (2005) Resistance to inhibitors of cholinesterase 8A catalyzes release of G α i-GTP and nuclear mitotic apparatus protein (NuMA) from NuMA/LGN/G α i-GDP complexes. *PNAS.* 102:16584-16589

Thomas, P., Beddington, R. (1996) Anterior primitive endoderm may be responsible for patterning the anterior neural plate in the mouse embryo. *Curr. Biol.* 6:1487-1496

Thordarson, G., Galosy, S., Gudmundsson, O., Newcomer, B., Sridaran, R., Talamantes, F. Interaction of mouse placental lactogens and androgens in regulating progesterone release in cultured mouse luteal cells. (1997) *Endocrinology.* 138(8):3236-3241

Trichas, G., Joyce, B., Crompton, L.A., Wilkins, V., Clements, M., Tada, M., Rodriguez, T. A., Srinivas, S. (2011) Nodal dependent differential localisation of Dishevelled-2 demarcates regions of differing cell behaviour in the visceral endoderm. *PLoS.* 9(2):e1001019

Turner, C. E. (2000) Paxillin interactions. *Cell Sci.* 113:4139-4140

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.* 3:591-594

Tõnissoo, T., Kõks, S., Meier, R., Plaas, M., Vasar, E., Karis, A., Raud, S. (2006) Heterozygous mice with Ric-8 mutation exhibit impaired spatial memory and decreased anxiety. *BBR*. 167, 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*. 239:3404-3415

Varlet, I., Collignon, J., Robertson, E.J. (1997) *nodal* expression in the primitive endoderm is required for specification of the anterior axis during mouse gastrulation. *Development*. 124:1033-1044

Voogd, J., Glickstein, M., (1998) The anatomy of the cerebellum. *Trends Neurosci*. 21:370-375

Wada, Y., Sun-Wada, G-H., Kawamura, N. (2013) Microautophagy in the visceral endoderm is essential for mouse early development. *Autophagy*. 9(2):252-254

Wallingford, M.C., Giachelli, C.M. (2014) Loss of PiT-1 results in abnormal endocytosis in the yolk sac visceral endoderm. *Mech. Dev*. 133:189-202

Weiler-Guettler, H., Aird, W.C., Rayburn, H., Husain, M., Rosenberg, R.D., (1996) Developmentally regulated gene expression of thrombomodulin on postimplantation mouse embryos. *Development*. 122:2271-2281

Wells, C.A., Dingus, J., Hildebrandt, J.D. (2006) Role of the chaperonin CCT/TRiC complex in G protein $\beta\gamma$ -dimer assembly. *J. Biol. Chem*. 281:20221-20232

Wettschureck, N., Offermanns, S. (2005) Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev*. 85: 1159-1204

Williamson, R.A., Henry, M.D., Daniels, K.J., Hrstka, R.F., Lee, J.C., Sunada, Y., Ibraghimov-Beskrovnaya, O., Campbell, K. P. (1997) Dystrocycan is essential for early embryonic development: disruption of Reichert's membrane in *Dag1*-null mice. *Human Molecular Genetics*. 6(6):831-841

Woodard, G.E., Huang, N-N., Hyeseon, C., Miki, T., Tall, G.G., Kehrl, J.H. (2010) Ric-8A and G α Recruit LGN, NuMA, and Dynein to the cell cortex to help orient the mitotic spindle. *Mol. Cell. Biol*. 30(14):3519-3530

Yamada, K., Watanabe, M. (2002) Cytodifferentiation of Bergmann glia and its relationship with Purkinje cells. *Anat. Sci. Int.* 77:94-108

Yamanaka, Y., Ralston, A., Stephenson, R.O., Rossant, J. (2006) Cell and molecular regulation of the mouse blastocyst. *Developmental Dynamics.* 235:2301-2314

Yang, J., Weinberg, R.A. (2008) Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Developmental Cell.* 14(6):818-829

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Marii Ojastu

(sünnikuupäev: 17.12.1990)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Guaniini nukleotiidivahetusfaktor RIC8 koduhiire ekstra-embrüonaalselte kudede arengus“

mille juhendajad on Sirje Lulla ja Tambet Tõnissoo

- 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 **26.05.2020** 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, 26.05.14