

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

Neuraalsete eellasrakkude spetsiifilise RIC8 defitsiidi mõju hiire kõva suulae arengule

Bakalaureusetöö

12 EAP

Mihkel Veski

Juhendaja: Tambet Tõnissoo, PhD

TARTU 2018

INFOLEHT

Neuraalsete eellasrakkude spetsiifilise RIC8 defitsiidi mõju hiire kõva suulae arengule

Neuraalhari on selgroogsetele loomadele iseloomulik ajutine multipotentsetest rakkudest moodustunud struktuur, mis tekib embrüogeneesis areneva epidermise ja neuraalitoru vahele. Neuraalharja derivaatide hulka kuuluvad näiteks pea- ja näokolju luud, muuhulgas kõva suulage moodustavad luud. Imetajate suulae moodustumisel mängivad olulist rolli mitmesugused molekulaarsed faktorid. Antud bakalaureusetöö eesmärgiks oli uurida konserveerunud G-valkude guaniini-nukleotiidivahetusfaktori RIC8 võimalikku rolli hiire suulae moodustumisel kasutades mudelina neuraalsete eellasrakkude spetsiifilisi *Ric8* konditsionaalseid *knockout* hiiri (*Ric8^{CKO}*). Eksperimentaalse töö käigus tehti järgmised järeldused:

- Uuritud *Ric8^{CKO}* embrüote (E12.5-E15.5) suulae arengus esinesid märgatavad kõrvalekalded (palataalsete jätkete kujunemise mahajäämus ja kerkimishäired) eelkõige vanuses E14.5
- E15.5 ja P0 (vastündinud) *Ric8^{CKO}* hiirtel oli võrreldes kontrollhiirtega suulagi õhem.

Märksõnad: GEF, RIC8, neuraalhari, palatogenees, suulaelõhed

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

Impact of neural progenitor specific RIC8 deficit to the development of hard palate

Neural crest is a temporary multipotent cell structure characteristic to vertebrate animals. It develops between epidermis and neural tube and only exists during embryogenesis. An example of neural crest cell derivatives are craniofacial bones including bones that make up hard palate. Many molecular factors play crucial part in formation of mammalian palate. The aim of the following undergraduate thesis was to enquire the possible function of RIC8, a conserved G-protein guanine nucleotide exchange factor, in mouse palatogenesis, using neural progenitor specific Ric8 knockout mice as a model organism. Following conclusions were made:

- *Examined Ric8^{CKO} (E12.5-E15.5) embryos exhibited noticeable abnormalities in the development of the palate (lag in outgrowth of palatal shelves and defects of palatal shelf elevation) especially among E14.5 embryos.*
- *E15.5 and P0 (newborn) Ric8^{CKO} mice exhibited thinner palate than their control littermates.*

Key words: GEF, RIC8, neural crest, palatogenesis, cleft palate

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

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1 Näokolju areng.....	7
1.1.1 Kraniaalne neuraalhari	7
1.1.2 Kraniaalne neuraalhari aju- ja näokolju arengus	9
1.1.3 Kõva suulagi ja hiire palatogenees	11
1.1.4 Suulaelõhed ja sellega seonduv problemaatika	13
1.1.5 Defektid hiire palatogeneesis	14
1.2 RIC8	17
1.2.1 G-valgud	17
1.2.2 RIC8 üldiseloomustus	17
1.2.3 RIC8 biokeemiline funktsioon	18
1.2.4 RIC8 bioloogiline funktsioon	19
1.2.5 RIC8 närvisüsteemis	20
1.2.6 RIC8 neuraalharja migratsioonis	22
2. EKSPERIMENTAALNE TÖÖ	23
2.1 Eesmärgid	23
2.2 Materjalid ja meetodid	23
2.2.1 Töös kasutatud hiireliinid	23
2.2.2 Embrüote dissekteerimine	24
2.2.3 Embrüote genotüpiseerimine	24
2.2.4 Parafiinlõikude valmistamine	26
2.2.5 Histoloogiliste preparaatide valmistamine	26
2.2.6 Koelõikude pildistamine	27
2.2.7 Mõõtmiste teostamine koelõikudel	27
2.3 Tulemused	27
2.4 Arutelu	32
KOKKUVÕTE	36
SUMMARY	37
TÄNUSÕNAD	38
KIRJANDUSE LOETELU	39
LIHTLITSENTS	49

KASUTATUD LÜHENDID

A – *anterior*, anterioorne, eesmine

BM – *basement membrane*, basaalmembraan

BMP – *bone morphogenic protein*

BMPR – *bone morphogenic protein receptor*

CDC – *cell division control*, raku jagunemise kontroll

CLO – *cleft lip only*, ainult huulelõhe

CP – *cleft palate*, suulaelõhe

CPO – *cleft palate only*, ainult suulaelõhe

E - embrüonaalne päev

ECE – *endothelin converting enzyme*

EDNRA - *endothelin-1-mediated endothelin A receptor*

EMT – epiteeliaalne-mesenhümaalne üleminek

ET – *endothelin*, endoteliin

FGF– *fibroblast growth factor 10*

FGFR – *fibroblast growth factor receptor 2b*

G α – G-valgu alfa subühik

GAP – *GTPase accelerating protein*, GTPaasi kiirendav valk

GDI – *guanine nucleotide dissociation inhibitor*, guaniini dissotsiatsiooni inhibiitor

GDP – guanosiin difosfaat

GEF - guaniini nukleotiidivahetusfaktor

GPCR – *G-protein coupled receptor*

M – *medial*, keskpidine

MdbP – *mandibular process*, mandibulaarjätke

MNP – *medial nasal process*, mediaalne nasaaljätke

MxP – *maxillary process*, maksillaarjätke

NC – *neural crest*, neuraalhari

NS – *nasal septum*, ninavahesein

Osr2 – *Odd-skipped related 2*

P – postnataalne päev

P (joonisel) – *posterior*, aposterioorne, tagumine

PBS – *phosphate-buffered saline*, soolalahusega fosfaatpuhver

PFA – paraformaldehüüd

PM – *paraxial mesoderm*, paraksiaalne mesoderm

PP – *primary palate*, primaarne suulagi

PS – *palatal shelf*, palataalne jätke

NC – *neural crest*, neuraalhari

R – *rhombomere*, rombomeer

RIC-8 – *resistant to inhibitors of cholinesterase*

S – *scanning electron microscope*

SDF – *stroma cell derived factor*, strooma rakkudest tulenev faktor

SHH – *sonic hedgehog*

SP – *secondary palate*, sekundaarne suulagi

T – *tongue*, keel

TBE – Tris-boraat-EDTA

TGF – *transforming growth factor*, transformatsiooni kasvufaktor

SISSEJUHATUS

Neuraalhari on selgroogseid loomi eristav, vaid embrüonaalse arengu vältel ajutiselt eksisteeriv struktuur, mis tekib epidermise ja neuraaloru vahele. Pärast valmimist migreeruvad neuraalharja rakud üle organismi laiali, et panna alus väga laiale spektrile kudedele ning organitele, näiteks pea silelihased, melanotsüüdid, osa südame sidekoest, neuronid, gliia, spinaalganglionid, pea- ja näokolju luud ja palju muud.

Üks olulisi komponente näokolju moodustavatest luudest on kõva suulagi ja selle arenguline kujunemine (palatogenees) ning korrektne morfogenees. Probleemid palatogeneesis võivad viia mitmesuguste arenguhäireteni. Suulaelõhed ja jänesemokk on Maa läänepoolkera levinuim sündidefekt, esinedes sõltuvalt kohast ja etnilisest päritolust sagedusega 1:500 või 1:2500 lapsest. Siiani on levinumaks palatogeneesi molekulaarsete seoste uurimise mudelorganismiks olnud koduhiir, kellega tehtud eksperimendid on andnud tänuväärset infot kõva suulae arenguprotsesside mõistmiseks ning selle moodustumises osalevate signaalmolekulide ja transkriptsioonifaktorite võrgustikust.

Üheks molekulaarseks võtmekomponendiks mitmetes bioloogilistes protsessides nagu migratsioon, rakujagunemine, adhesioon, gastrulatsioon, signaaliülekanne on G-valkude gunaniinukleotiidivahetusfaktor (GEF) RIC8. See on evolutsiooniliselt konserveerunud valk, mille biokeemiline roll on toimida G-valgu tsaperonina ja GEF-na, aidates kaasa G-valkude biosünteesile ja rakukorteksisse suunamisele ning G-valkude poolt vahendatud signaalide võimendamisele. Mitmed senised teadustööd on näidanud RIC8 rolli migreeruvates rakkudes, muuhulgas ka neuraalharja rakkudes. Kraniaalne neuraalhari, millest kujunevad muuhulgas kõva suulage moodustavad rakud võiks olla huvipakkuv struktuur RIC8 funktsiooni uurimiseks.

Käesoleva bakalaureuse töö eesmärgiks püstitati välja selgitada RIC8 võimalik roll hiire palatogeneesis, kasutades selleks mudelina neuraalsete eellasrakkude spetsiifilisi *Ric8* konditsionaalseid *knockout* (*NestinCre;Ric8^{lacZ/lox}* e. *Ric8^{CKO}*) embrüoid (E12-5-E15.5) ja vastündinud P0 hiiri. Töö eksperimentaalses osas keskendutakse *Ric8^{CKO}* hiirte kõva suulae piirkonna histoloogilisele analüüsile erinevates arengustaadiumites ning analüüsitakse ülevaatlikult ka nende hiirte välist fenotüüpi.

Bakalaureusetöö teoreetilises osas antakse ülevaade neuraalharja rakkude tekkest ning migratsioonist, kõva suulae arengust ja sellega seonduvatest defektidest ning nende problemaatikast inimese kontekstis. Lisaks anti eraldi peatükis ülevaade RIC8 funktsioonidest.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Näokolju areng

1.1.1. Kraniaalne neuraalhari

Neuraalhari (NC, ing k. *neural crest*) on selgroogsetele loomadele iseloomulik ajutine multipotentsetest rakkudest moodustunud struktuur, mis tekib areneva epidermise (pinnaketodermi päritolu struktuur, annab aluse marrasknahale ja ektodermaalsetele plakoodidele) ja neuraalтору (neuroektodermist moodustunud keskne struktuur, millest areneb kesknärvisüsteem) vahele embrüogeneesi käigus. Neuraalharja rakud avastas ja kirjeldas esimesena Šveitsi teadlane Wilhelm His 1868. aastal. His kirjeldas rakkude kogumit (nimetas seda *Zwischenstrang*) areneva tibu neuraalтору ja epidermise vahel, millest kujunevad perifeersesse närvisüsteemi kuuluvad spinaal- ja kranaal ganglionid. (Gilbert, 2006)

Tulevased neuraalharja rakud kujunevad algselt vastusena induktiivsetele signaalidele (BMP signalisatsioon) neuroektodermi päritolu neuraalplaadi ja pinnaektodermi piirile. Järgneva neurulatsiooni käigus, mil moodustub neuraalplaadist sisserullumise ja voltumise tulemusena neuraalтору, eralduvad neuraalharja rakud neuraaltorust. (Milet ja Monsoro-Burq, 2012)

Neuraalharja rakkude tekkimiseks ja funktsionaalsuse saavutamiseks toimub neuraalтору sulgumise ajal ning järel kolm olulist protsessi: 1) Epiteliaalne mesenhümaalne üleminek (EMT), protsess mille käigus toimuvad muutused ja ümberkorraldused epiteliaalsetes rakkudes. Need rakud, mis läbivad EMT, kaotavad epiteelirakkudele iseloomulikud omadused, milleks on näiteks vastupidavus välisele survele, mida põhjustavad epiteeli kihiline struktuur ning rakkude tsütoskelettide vahelised tugevad liidused (Lowe ja Anderson, 2015). Kui rakk muutub mesenhümaalseks, siis tänu ümberkorraldustele tekivad uued omadused, milleks on suurenenud migratsiooni- ja kudedest läbi tungimise võime ning ka suurem vastupidavus apoptoosile (Kalluri ja Weinberg, 2009). Seega EMT võimaldab neuraalharja rakkudel muutuda liikumisvõimeliseks rakuks, et migreeruda läbi arenevate kudede oma õigetesse positsioonidesse (Bronner, 2012). 2) Delamineerumine väiksemateks rakupopulatsioonideks ehk morfogeneetiline liikumine, mille käigus EMT läbinud mesenhümaalsed omadustega neuraalharja rakud väljuvad dorsaalsest neuraalтору piirkonnast ning kaotavad oma epiteliaalse konformatsiooni, et moodustuda väiksemad iseseisvad kolooniad. (Duband, 2006) 3) Neuraalharja rakkude migratsioon oma lõpliku sihtkohta.

Koduhiire (*Mus musculus*) neuraalтору sulgumine algatatakse esimesena rombaju (*rhombencephalon*) piirkonnas E8.5 (embrüonaalne päev 8.5) ning neuraalтору sulgumine

jätkeb seejärel nii anterioorses kui posterioorses suunas progresseeruvalt kuni täieliku sulgumiseni vanuses E10. (Ybot-Gonzalez jt. 2002)

Embrüo peapoolses (kraniaalses) piirkonnas algatatakse neuraalharja rakkude EMT hetkel, mil neuraalatoru pole veel sulgunud. Seejärel hakkavad neuraalharja rakud järjest delamineeruma ning oma sihtkoha suunas migreeruma (Nichols, 1987). Embrüo kehatüves asuvas neuraalharjas, hakkavad EMT, delaminatsioon ja migratsioon toimuma lainena posterioorses suunas. On näidatud, et kere neuraalharja EMT ja delaminatsioon toimuvad osade kaupa n-ö „tilkuval moel“. Nimelt lainena valmivad anterioorsed neuraalharja kogumid hakkavad järjest migreeruma oma sihtmärkide suunas, samas kui posterioorsemas piirkonnas ei ole neuraalharja rakkude EMT või delaminatsioon veel alanudki. NC rakkude migratsioonivalmis saamise tempo on seotud vastava anterio-posterioorse telje piirkonna somiitide (somiit on paraksiaalsest mesodermist moodustunud segmenteerunud struktuur, millest arenevad näiteks skeetilihased, aksiaalskelett ja selja pärisnahk) küpsusastmest. (Sela-Donenfeld ja Kalcheim, 2000)

Neuraalhari jaotatakse asukoha järgi embrüo anterio-posterioorsel teljel neljaks osaks, mille põhjal on määratud ka NC hilisem migratsioon embrüos. Neid neuraalharja regioone nimetatakse vastavalt kraniaalseks (pea), kardiaalseks (südame), kere ja vagaal-sakraalseks (kaela-risitleu) neuraalharjaks. (Bhatt jt., 2013) Erinevad neuraalharja regioonid annavad aluse erinevatele rakutüüpidele, mis omakorda panustavad organite moodustumisse. Kraniaalse e peaneuraalharja mesenhümaalsed rakud on aluseks suurele osale näokolju piirkonna kõhrest, luudest ja sidekoest. Lisaks on kraniaalse NC tekkelised veel pea silelihased, osaliselt melanotsüüdid, kilpnäärme, kõrvalkilpnäärme ja harknäärme rakud, gliiarakud ja osa sensorsete ganglionite neuronitest, kõik kraniaalsed parasümpaatilised neuronid ning neid toetavad Schwanni rakud, hamba odontoblastid (toodavad dentiini) ja keskkõrva kuulmeluukesed (haamer, alasi ja jalus). (Young jt, 2009)

Kardiaalse e südame NC tekkelised on aordi ja pulmonaalarteri vaheline kompleks (vahesein) ning aordikaare silelihased. Lisaks panustab kardiaalne NC ka südame vaheseina ja melanotsüütide, neuronite ja Schwanni rakkude moodustumisse. Vagaal-sakraalse NC tekkelised on südame suuremate väljajuhte teede sidekoeline osa ning seedesüsteemi parasümpaatilised sooleganglionid. (Young jt., 2009)

Kere NC tekkelised on dorsaalsed spinaalganglionid, sümpaatilise närvisüsteemi neuronid, Schwanni rakud, melanotsüüdid ning neerupealiste säsi rakud. (Young jt., 2009)

Selle kohta, kas NC rakkude eristumine vastavateks alampopulatsioonideks (nt neuronid, gliiarakud, melanotsüüdid) on määratud enne või pärast migratsiooni, on pakutud erinevaid arvamusi. On leitud, et NC rakud võivad olla juba varajases arengustaadiumis määratud väga

kitsa valiku derivaatide eellasteks (Henion ja Weston, 1997). On ka vastupidiseid seisukohti, mille ilmekaks näiteks on katse, milles analüüsiti kodukana (*Gallus gallus domesticus*) ja vuti (*Coturnix coturnix*) kimääre. Selleks sisestati eristumata neuraalse eellaskoe rakke vuti embrüost kana embrüosse. Selline katseskeem võimaldas DNA rakusisese paiknemise abil (hajutatult või koondunult) jälgida vuti NC migratsiooni ning läbi selle saadi toetust hüpoteesile, et NC spetsialiseerumine toimub raku funktsionaalses lõppasukohas. Ka antud hüpoteesil on omad piirangud - vuti kere neuraalharja rakud ei olnud võimelised muutuma ümbersiidamisel näopiirkonna mesenhümaalseteks struktuurideks. (Couly ja Le Douarin, 1987) Samuti on näidatud, et rotist eraldatud varajased NC tüvirakud olid võimelised hiljem nii *in vitro* kui ka *in vivo* kana perifeersesse närvisüsteemi lisatuna eristuma nii neuroniteks kui gliiaks kuni P0 (sünd), pakkudes välja hüpoteesi, et mingil määral võib säilida NC tüvirakkude eristumise kuni tiinuse lõpuni. (Morrison jt., 1999) Ajalise perspektiivi avamiseks on leitud, et NC rakkude puhul on tegemist ajas progresseeruva spetsialiseerumisega. Mida lähemale jõuab ajaliselt sihtmärkkoeaks muutumine, seda kitsamaks antud NC liin spetsialiseerub (Luo jt, 2003)

1.1.2 Kraniaalne neuraalhari aju- ja näokolju arengus

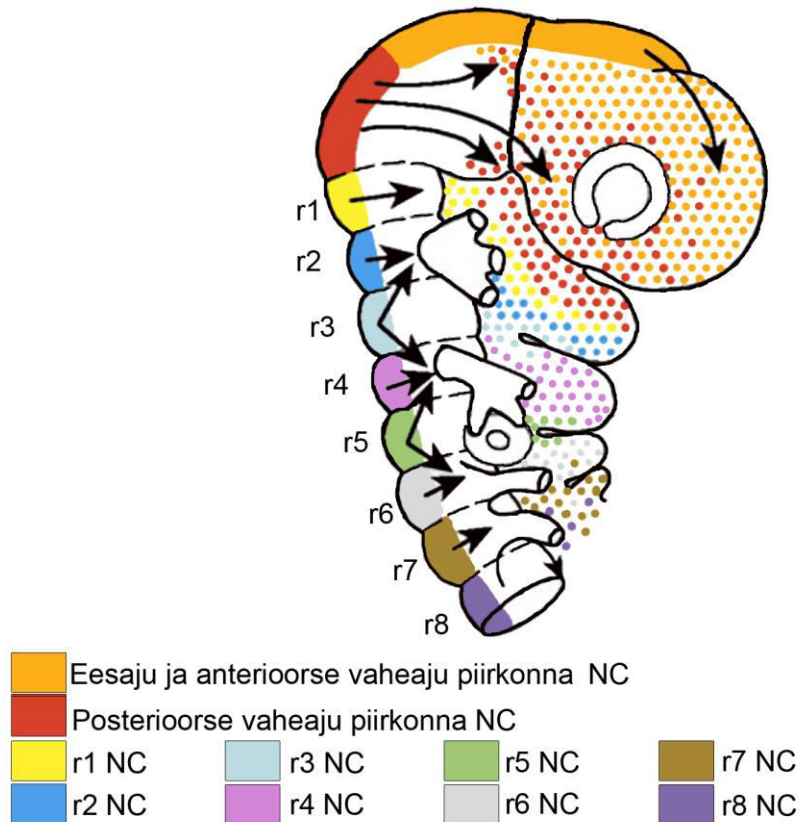
Arenguliselt on ülitähtis, et NC rakud migreeruksid korrektselt oma funktsionaalsesse asukohta. Kraniaalse NC migratsiooni muster on selgroogsetel loomad elutsiooniliselt konserveerunud, varieerudes liigiti vähe. (Minoux ja Rijli, 2010)

Hiire NC märgistamisel on tuvastatud, et kraniaalse NC rakud keskaju (*mesencephalon*) ja eesaju (*prosencephalon*) piirkonnast migreeruvad embrüo frontonasaal-piirkonda (piirkond, millest kujunevad embrüo nina ja näo struktuurid; joonis 1). Eesaju piirkonnast pärinevad NC rakud migreeruvad ventraalselt ühtlase kihina laiali kuni silma vesiikuliteni (neuraaltoru väljasopistunud struktuurid, millest arenevad silmakarikad). Keskaju anteriorsest piirkonnast pärinevad NC rakud migreeruvad hajutatult dorsoventraalses suunas, liikudes migratsiooni vältel lateraalselt läbi keskaju ja ektodermi vahelise mesenhüümi, hõivates silma ja tulevase ülalõua piirkonna. (joonis 1; Serbedzija jt., 1992)

Rombaju piirkonnas tekkinud kraniaalne neuraalhari on jagunenud segmentidesse vastavalt rombaju rombomeeridele r1-r8 (Lumsden ja Keynes, 1989; joonis 1).

Hiire r1-r6 NC rakkude migratsioon jaguneb kolme selgelt eristuvasse migratsioonivoogu. Esimese moodustavad r1-r2 NC rakud, teise r4 NC rakud ja kolmanda r6 NC rakud (joonis 1). R3 ja r5 rombomeeridele vastavaid NC rakkude voogusid ei moodustu. NC rakud, mis vastavad r1-r2 segmentidele täidavad esimese lõpuskaare koos vähesel määral lisanduvate r3

NC rakkudega. Ka posterioorne osa keskajust panustab I lõpuskaarre täitmisesse (Couly jt., 1996). Osaliselt liiguvad r3 NC rakud II lõpuskaarde, liitudes r4 NC rakkude vooga. R5 NC rakud liiguvad osaliselt II ja osaliselt III lõpuskaarde. R6 NC rakkude voog siseneb III lõpuskaarde ja panustab osaliselt IV lõpuskaare täitmisesse. R7 ja r8 piirkonna NC rakud täidavad väga vähesel määral III ning kaudaalsemaid lõpuskaari. (Osumi-Yamashita jt., 1996; Creuzet jt., 2002 ;Trainor jt., 2002)



Joonis 1. Kraniaalse neuraalharja migratsioonikoridorid. R1-r8 kujutavad vastava rombomeeri piirkonna neuraalharja (NC) rakke. Nooled osutavad neuraalharja rakkude migratsiooni suundasid. (Modifitseeritud Le Douarin jt., 2004 järgi)

Pea ja näokolju moodustub suuremas osas kraniaalsest NCst ehkki koljuluude arengusse panustab ka paraksiaalne mesoderm (PM). Hiire lõpuskaartes paiknevad NC rakud on päritolu järgi kuni vanuseni E10.5 selgelt eristuvad, samas kui hiljem näokolju luid moodustades enam mitte. (Trainor ja Tam, 1995)

Näopiirkonna struktuuride tekkimisel moodustuvad selgroogsetel algse suuõõne ümber seitse eenduvat väljakasvu ehk jätket (*prominence, process*): 1) frontonasaalne jätke, millest moodustub otsmik, nina keskmine osa ja esmane suulagi 2) paarilised lateraalnasaalsed, maksillaarsed ja mandibulaarsed jätked, millest arenevad vastavalt näopiirkonnaluud, sekundaarne suulagi ning üla- ja alalõug. Need jätked arengu jooksul pikenevad ja liiguvad

üksteisele lähemale ja kasvavad lõpuks kokku, andes näopiirkonnale iseloomulikud struktuurid (Cordero jt., 2011). Mandibulaarjätked, mis on aluseks alalõualuule, on selgelt I lõpuskaare tekkelised. Maksillaarjätked, millest areneb ülalõualuu ja mis panustavad ka suulae tekkesse, on samuti I lõpuskaare päritolu, ehkki pakutud on ka teisi allikaid. Näiteks kana embrüote puhul on näidatud, et I lõpuskaare rakkudest tekib vaid kõige kaudaalsem osa maksillaarsest jätkest, millest kujuneb hiljem kõige dorsaalsem osa ülalõualuust (Lee jt., 2004). Samas selle uuringu tulemused on hilisemates töödes tugevalt kahtluse alla seatud (Depew ja Simpson, 2006).

Hiire E8.5 embrüote migratsiooni uurimisel on tuvastatud neuraalharja rakkude jõudmine maksillaarsesse jätkesse, mis annab alust arvata, et neuraalharjal on oluline roll kõva suulae moodustumises. (Trainor ja Tam, 1995)

1.1.3 Kõva suulagi ja hiire palatogenees

Imetajate suulagi koosneb kahest osast, milleks on primaarne ja sekundaarne suulagi. Primaarne suulagi on suulae proksimaalsem osa ning ühendub distaalsemalt paikneva sekundaarse suulaega silmhammaste teljel. Sekundaarne suulagi, mis tekib lateraalsete palataalsete eendite kokkukasvu teel, jaguneb anterioorseks kõvaks suulaeks ja posterioorseks pehmeks suulaeks. (Tepper ja Warren, 2010)

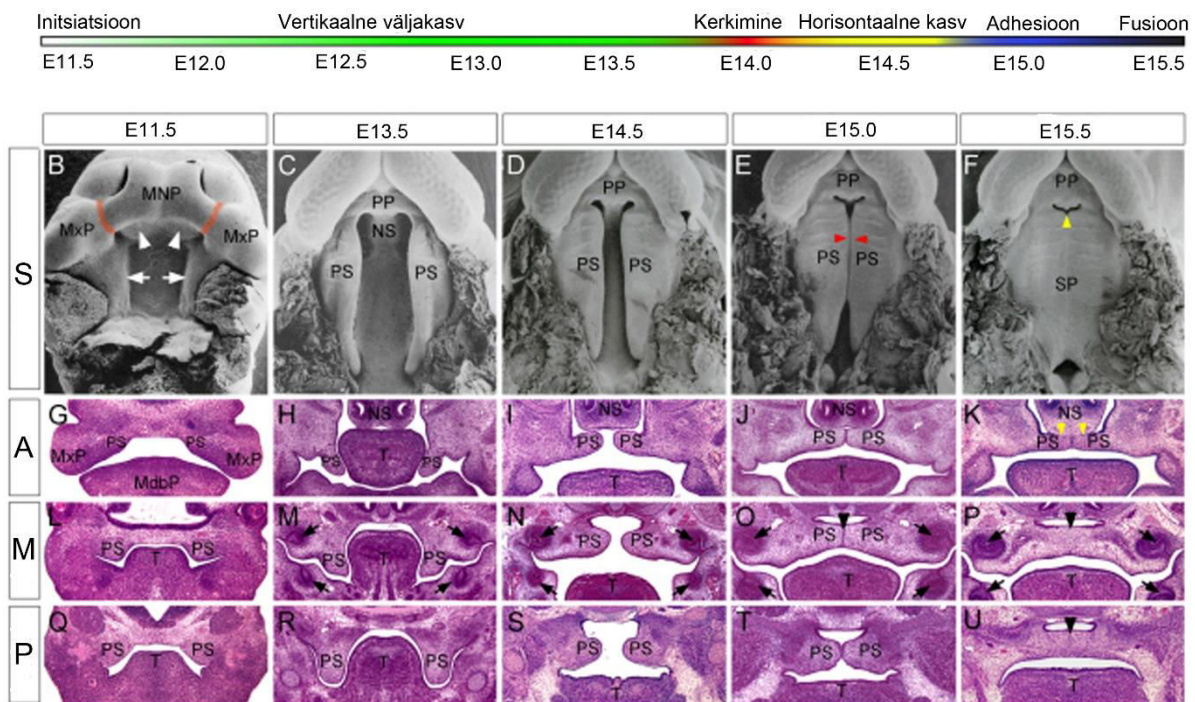
Suulagi eraldab imetajatel ninaõõnt ja suuõõnt, mis ühinevad neelus. Hingamisel on imetajate neel avatud, võimaldades hingamist samaaegselt suu ja nina kaudu. Pehme suulae lihased koordineerivad neelu korrektset liikumist, et eraldada ninaõõs neelamise ajaks suuõõnest. Nii tekib imemiseks vajalik vaakum ning toit ei saa pääseda hingamisteedesse. (Matsuo ja Palmer, 2009)

Kõva suulae olulisus avaldub eelkõige söömises/neelamises ning artikulatsioonis. Söömise ja neelamise käigus surutakse toit keelega vastu kõva suulage, enne kui see neelust alla lükatakse. Selle tegevuse jaoks on äärmiselt oluline õigesti formeerunud kõva suulagi. (Ono jt. 2004)

Kõval suulael on oluline osa suhtluses verbaalseid häälotsusi kasutavate imetajate jaoks. Taani 3-aastaste laste peal teostatud katses selgus, et varasema suulae sulgumisega lastel tuli kaashäälikute artikuleerimine välja edukamalt kui hilisema suulae sulgumisega lastel. (Willadsen jt., 2018)

Hiire palatogenees algab pärast lateraalnasaal ning maksillaarjätkede kokku sulandumist (fusioon), mille käigus tekib ülahuul. Palataaljätkede (PS, ing. k. *palatal shelf*) välja ulatumist on võimalik detekteerida hiirel vanuses E11.5 (joonis 2B, G, L, Q). PS kasvavad alguses

suuõõne põhja suunas kuni vanuseni E13.5 (joonis 2C, H, M, R), misjärel hakkavad kerkima ning jõuavad horisontaalasendisse embrüonaalses vanuses E14.5 (joonis 2D, I, N, S). Palataaljätke kerkimine algab uue väljaulatuva osa väljakasvuga palataaljätke mediaalsest osast horisontaalses suunas ning vertikaalasendis olnud tipu kokku tõmbamisega tulevaseks suulae suuõõne poolseks pinnaks, muutes täielikult palataaljätke morfoloogiat (Yu ja Ornitz, 2011). PS-d jätakavad kasvuga horisontaalses suunas, kuni puutuvad kokku E15.0, millele järgneb PS kokkusulandumine E15.5 (joonis 2E ja F). Seejuures toimuvad kõik protsessid suunas anteroorne-posteroorne ning täpne ajastus iga protsessi toimumiseks sõltub asukohast proksimaal-distaalsel teljel. (Ito jt., 2003, Bush ja Jiang, 2012)



Joonis 2. Hiire palatogeneesi ajatelg. (B–F) Hiire arenev suulae piirkond vaadelduna ventraalselt skanneeriva elektron mikroskoobiga. (G–K) Hiire suuõõne frontaallõigete anteroorne osa. (L–P) Hiire suuõõne frontaallõigete mediaalne osa. (Q–U) Hiire suuõõne frontaallõigete posteroorne osa. Valged nooled – palataalse jätke kasvu initsiatsiooni kohad. Valged noolepead – primaarse suulae algne väljakasv. Punased noolepead – adhesiooni ja fusiooni esmatoimumise kohad. Kollased noolepead – tühimikud, mis kaovad aja jooksul adhesiooni ja fusiooni käigus. Must noolepea – keskjoone epiteelõmbluse (ing. k. *midline epithelial seam*) moodustumine. Mustad nooled – pesad millest hiljem hakkavad välja kasvama hambad. Lühendid: A – anteroorne telg, M – mediaalne telg, MdbP – mandibulaarjätke, MNP – mediaalne nasaaljätke, MxP – maksillaarjätke, NS – ninaõõs, P – posteroorne telg, PP – primaarne suulagi, PS – palataalne jätke, S – skanneeriva elektronmikroskoobi vaade, SP – sekundaarne suulagi, T – keel. (Modifitseeritud Bush ja Jiang, 2012 järgi)

1.4 Suulaelõhed ja sellega seonduv problemaatika

Lõhed suulaes (CP, ing. k. *cleft palate*) ja näos on üks inimese levinumaid sünnidefekte, esinedes keskmiselt sagedusega ühel elussünnil seitsmesajast. (Mossey, 2009) Sõltuvalt piirkonnast ja etnilisest kuuluvusest võib sagedus varieeruda vahemikus 1:500–1:2500 elusalt sündinud lapsest. Levinuimad versioonid on huule- ja suulaelõhe (CLP, ing. k. *cleft lip and palate*), huulelõhe ilma suulaelõheta (CLO, ing. k. *cleft lip only*) ning suulaelõhe ilma huulelõheta (CPO, ing. k. *cleft palate only*). (Wehby ja Cassell, 2010) Need esinevad ilma teiste sündroomideta 70% juhtudest (Dixon jt., 2011).

CP saab esineda kas unilateraalse või bilateraalse fenotüübina ehk vastavalt ühepoolset või kahepoolset esineva defektina. Esinevaid fenotüüpe on palju, millest levinuimad variandid inimestel on mikroformne CLO, ühepoolne CLO, ühepoolne CLP, kahepoolne CLP, van der Woude sündroom, mille puhul kaasnevad ühe- või kahepoolse CLP-ga veel sälgud huules ning CPO pehmes/kõvas suulaes. (Dixon jt., 2011)

CLP, CLO ja CPO erinevate esinemissageduste ning eraldiseisvalt esinemise tõttu arvati kaua aega, et suulae- ning huulelõhed on erinevad defektid, mis tihti esinevad koos. Praeguseks on suudetud näidata, et huulelõhe ja suulaelõhe esinevad statistiliselt liiga tihti koos, et neid eraldiseisvateks defektideks lugeda. (Harville jt., 2005)

Suulaelõhedega kaasneb valik probleeme. CP laste suurimaks probleemiks, mis on oma sisus üle kantav kõigile imetajatele, on probleemid toitumisel (Nackashi jt., 2002). CLP ja CPO defektiga patsientidel (ei kehti CLO patsientide kohta) esineb seetõttu mahajäämus kasvus. Inimestel on leitud, et kuni 6. kuuni kestvad häired toitumisel toovad kaasa märkimisväärse mahajäämuse kaalukasvust võrreldes eakaaslastega. Pärast seda teostatakse CP kõrvaldamine operatsiooni teel. (Pandya ja Boorman, 2001)

CP on inimestel ultraheli abiga diagnoositav raseduse 16. nädalal (Shaikh jt., 2001). CLO ravi on küllaltki lihtsalt teostatav ning esimene kirjalik allikas kokku õmmeldud ülahuulest pärineb juba aastast 390 eKr. Esimene sekundaarse suulae kokku opereerimine pärineb aastast 1816 (Perko, 1986). Vaatamata pikale kogemusele CP ravis pole tänase päevani eriala spetsialistide seas 100% ühtset arusaama, milline on parim operatsioonijärgne raviplaan. Vaid operatsioonide ajastuse osas ühtib suurema osa kirurgide praktika. Huule kokku õmblemine toimub harilikult lapse 12. sünnijärgsel nädalal (Arosarena, 2007). Sekundaarse suulae opereerimist teostab enamik arste (96%) 6.–12. elukuu vahemikus, sest varasem opereerimine kannab endas riski imiku suulae väärastumiseks. (Katzel jt., 2009) Enamik USA organisatsiooni Cleft Palate-Craniofacial Association liikmetest, kes osalesid küsitluses, milles uuriti nende praktikaid CP ravil, vastasid, et teostavad kõva ja pehme suulae kokku

õmblemise üheetapilise operatsioonina. Selline lähenemine võimaldab parimat ravi ning patsiendi taastusravile saatmist juba 24–48 tunni jooksul pärast operatsiooni. (Katzel jt., 2009) 1999. aastal alguse saanud rahvusvaheline projekt Smile Train on viinud kõrgekvaliteedilise CP ravi ning kohalike spetsialistide väljaõppe arengumaadesse, et võimaldada professionaalset abi ka väljaspool kõrgelt arenenud riike. Eduloo osa on üle miljoni ravijuhtumi ning kümned tuhanded välja õpetatud spetsialistid. (Louis jt., 2018)

Vaatamata juba 19. sajandisse ulatuvale ravile, on CP defektiga inimestel oodatav eluiga lühem kui tervetel inimestel. Taanis 1943–1987 CP-ga sündinud inimeste (n = 5331) seas oli enne 55. eluaastat suremus suurem kui üldkogumis keskmiselt – meestel 1,4 korda kõrgem ja naistel 1,8 korda kõrgem. Kui rasketesse haigustesse suremuse näitaja oli vaid veidi kõrgem üldkogumi keskmisest, siis tuntavalt kõrgem (1.6 korda) oli enesetappude hulk CP-ga inimeste seas. Suurem suremus kordaja võrreldes üldkogumi keskmisega, jäi samasse suurusjärku kõikides vanusegruppides (1-aastaste, 1–17-aastaste kui ka 17–55-aastaste seas) (Christensen jt., 2004). Lisaks tekitavad püsivalt näos nähtavad armid inimestes ebakindlust. Seda võimendab kiusamine CP põhjustatud kõnedefekti pärast, mida on kogunud paljud ravitud CP-ga noored. (Turner jt., 1997).

1.1.5 Defektid hiire palatogeneesis

Hiir on imetajate (sh inimese) bioloogiliste funktsioonide uurimiseks hea mudelorganism. Enamik teadusartikleid, mis käsitlevad imetajate näokolju ning kõva suulae arengut ning neis osalevaid molekulaarseid faktoreid, on mudelina kasutatud erinevaid hiireliine. Suulae arengulisi defekte esineb kõikides palatogeneesi etappides (nii lateraalnasaal- kui ka maksillaarjätmete väljakasv, palataaljätmete väljakasv, kerkimine, kokkukasvamine, ning adhesioon ja fuseerumine).

Silmapaistev hulk töid on avaldatud erinevate signaalradade rolli kohta hiire kõva suulae formeerumisel. Suulae mesenhüümi kasvu ja arengu seisukohalt on väga oluline sekreteeritav signaalmolekul *Shh* (*Sonic hedgehog*) ja selle poolt aktiveeritud signaalid (Rice jt., 2006). SHH vahendatud signaalid aitavad reguleerida mitmete suulae mesenhüümi proliferatsiooniks ja arenguks oluliste kasvufaktorite, FGF10 (*Fibroblast growth factor 10*), BMP2/BMP4 (*Bone morphogenic protein 2/4*) ja FGFR2b (*Fibroblast growth factor receptor 2b*) ekspressiooni. *Shh* signaalraja välja lülitamine põhjustab hiirtel erineva raskusastmega suulae arengudefekte, mida on seostatud suulae mesenhüümi proliferatsiooni häiretega, mis omakorda võib kahjustada palataalsete jätmete formeerumist. (Rice jt., 2004; Lan ja Jiang, 2009)

Bmp4 täielik väljalülitamine hiirtes on embrüonaalselt letaalne, samas kui *Bmp4* konditsionaalne väljalülitamine spetsiifiliselt suulae mesenhüümis põhjustab huulelõhe ilma suulaelõheta (CLO; Liu jt., 2005). BMP retseptori *Bmpr1a* (*Bone morphogenic protein receptor 1a*) konditsionaalne välja lülitamine kraniaalses NC-s toob kaasa suulae anteriorse osa väärarengu (Li jt., 2011). Sarnase fenotüübiga on hiired, kellel on *Bmpr1a* välja lülitatud suulae mesenhüümist. Neil katseloomadel tekkisid primaarse suulae mesenhüümi proliferatsiooni häired ning lisaks oli ka *Shh* ekspressioon nii sekundaarses kui primaarses suulaes muutunud võrreldes kontrollhiirtega (Baek jt., 2011). Kokkuvõtvalt on nii BMP kui ka SHH signaaliradade korrektne toimimine ja regulatsioon äärmiselt oluline kogu organismi arengule ja kitsamalt ka korrektse suulae moodustumiseks. Muutused neis radades võivad viia tõsiste häireteni nii suulage moodustavate jätkete kujunemisel kui ka kokkukasvamisel.

Oluline etapp kõva suulae arengus on palataalsete jätkete kerkimine horisontaalsesse asendisse. Muutused selles täpselt koordineeritud protsessis võivad põhjustada erinevaid suulae arengudefekte. Üks olulisi jätkete kerkimise eest vastutavaid signaalsüsteeme on FGF/FGFR2 vahendatud sündmused jada. FGFR2 puudulikkus võib põhjustada Crouzoni sündroomi, mida esineb 12.5 sündival inimesel miljonist ning millega kaasnevad mitmed CP ja näokolju defektid. Erinevalt *Bmp*-st ja *Shh*-st, ekspresseerub *Fgfr2* suulae posterioorses osas, mistõttu FGFR2 puudulikkus põhjustab häireid jätkete kerkimisel oma õigetesse positsioonidesse suulae kujunemisel. (Snyder-Warwick jt., 2010) Mittesündroomsetest CP-dest võivad FGF ja FGFR perekonna geenid põhjustada hinnanguliselt kuni 5% (Riley jt., 2007). *Osr2* (ing k. *Odd-skipped related 2*) knockout mudelil jälgitud väljakasvu ning kerkimise defektide katsetes näidati, et E12.5 hiirtel pole mutantide ja pesakonnakaaslaste vahel olulisi morfoloogilisi erinevusi. Erinevused nagu asümmeetriline väljakasv ning kerkimine avaldusid vahemikus E14-E14.5 mis ajaks peaksid normaalsetel hiirtel olema palataaljätked kerkinud horisontaalsesse asendisse. (Lan jt., 2004)

Suulae moodustumise üks viimaseid etappe on palataalsete jätkete adhesioon ja fusioon. Adhesioonihäired palataalsete jätkete vahel on oluline CP põhjustaja. See tähendab, et läbi horisontaalse kerkimise oma positsioonidesse jõudnud palataalsed jätked ei suuda üksteisega ühineda ning fusiooni ehk kokku sulandumist ei saa toimuda, mis omakorda viib CP tekkeni. Üheks oluliseks signaalmolekuliks suulae moodustumisel adhesiooni/fusiooni protsessis on kasvufaktor TGF- β (*Transforming growth factor beta*). *Tgf- β 3^{-/-}* embrüotel on adhesioonimolekulide, E-kadheriini ja α -kateniini ekspressioon mediaalse serva epiteel (ing k. *medial edge epithelia*) ehk palataalsete jätkete esimesena kokku puutuv ning kleepumist ja kokkukasvu põhjustav osa puudulik, mistõttu esinevad selles piirkonnas adhesioonihäired. Kadheriinid asuvad *wild-type* embrüos raku membraanis, olles otseselt seotud rakk-rakk

adhesiooni tekkega. $Tgf-\beta 3^{-/-}$ embrüotel on kadheriin koondunud ebaloomulikult tsütoplasmasse (Tudela jt., 2002).

Kadheriinide vahendatud adhesiooni tekkeks on vajalik nii raku liikumine (oluline seos aktiini tsütoskeletiga) kui ka ühenduste teke rakkude vahel. TGF- $\beta 3$ indutseerib väikese GTPaasi CDC42 (*Cell division control 42*) aktiivsust, mis omakorda on raku filopoodide tekke ja läbi selle migratsiooni eest vastutav. $Tgf-\beta 3^{-/-}$ embrüotel esineb CP, mis näitab rakkude migratsiooni ja kinnitumise olulisust adhesioonil ning adhesiooni olulisust kõva suulae moodustumisel (Taya jt., 1999).

Imetajate näokolju ja suulae arengus on lisaks eespool nimetatud signaalmolekulidele ja kasvufaktoritele ja nende retseptoritele olulised veel mitmed teised faktorid, nt transkriptsioonifaktorid, tsütokiini retseptorid jne. (Funato jt., 2015). Üks tähtis signaalvalkude perekond mitmetes arenguprotsessides on heterotrimeersed G valgud ja läbi nende retseptorite vahendatud signaalid. Näiteks kraniaalse neuraalharja rakkude spetsiifilised $G\alpha_s$ (G-valgu α subühiku s alamühik) *knockout* hiired sünnivad elujõulistena, aga neil on raskusi rinnapiima imemisega ning nad surevad esimeste tundide jooksul pärast sündi. $G\alpha_s^{-/-}$ hiirtel on olulised näokolju arengu defektid nagu näiteks paisunud ajukolju, lühenenud üla-/alalõualuu ning neil esinevad CP ja teised näokolju arengudefektid. Tõenäoliselt põhjuseks neile arenguanomaaliatele peetakse osteokondrogeenilise differentseerumise liiga varajast algust, mille tõttu luustuvad koed liiga vara. (Lei jt., 2016)

Endoteliini (vererõhku reguleerivad lipiidid) retseptorid käituvad G-valguga seonduvate retseptoritena (GPCR, ingl. k. *G-protein coupled receptor*) ja signaalid on seetõttu vahendatud $G\alpha_q$, $G\alpha_i$ ja $G\alpha_s$ klasside poolt. Endoteliin-A deletsioonid võivad kaasa tuua CP ja näokolju arengu defekte (Clouthier jt., 1998). Sama kehtib ka tema ligandide ET-1 (Endoteliin-1) ja ECE-1 (endoteliini teisendav ensüüm-1) deletsioonide kohta (Kurihara jt., 1994; Yanagisawa jt., 1998). Sarnaseid defekte on märgatud ka $G\alpha_q/G\alpha_{11}$ deletsioonide korral, sest nad vahendavad ET-1 signaalrada lõpuskaarte mesenhüümis. (Dettlaff-Swiercz jt., 2005)

1.2 RIC8

1.2.1 G-valgud

G-valgud (*guanine nucleotide-binding proteins*) on GTP (aktiivne vorm) - GDP (inaktiivne vorm) seoselised valgud, mis toimivad mitmetes signaalradades rakuvälise signaali edasi kandmisel rakku. GTP-seoselisest GDP-seoseliseks muutub aktiveeritud G-valk pärast signaali edasi andmist GTP hüdrolyüüsi teel. (Tall jt., 2003) G-valgud jagunevad α -, β - ja γ -subühikuteks, mis moodustavad koos heterotrimeerse G-valgu. G-valgu α -subühikut nimetatakse ka väikeseks subühikuks. (Purves jt., 2001)

G-valkude signaalrada mõjutab peamiselt 3 tüüpi regulaatorvalke: GAP-d (ing.k. *GTPase accelerating protein*), mis vaigistavad aktiveeritud G-valgu signaali enneaegse inaktiveerimise teel, GEF-id (ing. k. *Guanine nucleotide exchange factor*), mis stimuleerivad inaktiivset G-valku vabastama GDP, et liita GTP ja signaal taasaktiveerida, ning GDI-d (ing. k. *Guanine nucleotide dissociation inhibitor*), mis seostub G-valgu inaktiveeritud vormiga, et takistada GDP-GTP vahetust signaali aktivatsiooniks. (Siderovski ja Willard, 2005)

GPCR on intermembraanne retseptor, mis koosneb 7 membraani läbivast domeenist. GPCR seondub ekstratsellulaarsest maatriksist (ing k. *extracellular matrix*) pärineva ligandiga, mis edastab teatavat ekstratsellulaarset signaali. Ligandi seostumine toob endaga kaasa GPCR konformatsiooni muutuse, mis muudab $G\alpha$ GTP seoseliseks ehk aktiivseks vormiks ning vabaneb GDP. Aktiveeritud $G\alpha$ on seejärel valmis olema vahendajaks, võimendajaks või inhibeerijaks valikule erinevatele signaalradadele, sõltuvalt sellest, mis tüüpi $G\alpha$ on tegu. (Kroeze jt., 2003)

1.2.2 RIC8 üldisloomustus

Geen *Ric8* (*Resistant to inhibitors of cholinesterase 8*), kodeerib evolutsiooniliselt konserveerunud RIC8 nimelist valku, molekulmassiga 63 kDa (Miller jt., 2000). RIC8 identifitseeriti esmakordselt *Caenorhabditis elegans*'i mutantide sõeluuringus, mille käigus osad mutandid (muuhulgas ka *Ric8* mutantsed) osutusid resistentseks kemikaalile Aldicarb, mille eesmärk oli inhibeerida sünaptsites koliinesteraasi (Miller jt., 1996). Järgnevad tööd nematoodist mudelorganismiga *C. elegans* näitasid, et RIC8 reguleerib positiivselt kolme G-valgu (G_q , $G_{i/o}$ ja G_s) poolt vahendatud signaalirada aidates reguleerida nii sünaptilist signaaliülekanne kui ka rakkude asümmeetrilist jagunemist embrüonaalses arengus (sellest ka RIC8 varasem nimetus Synembryn). (Afshar jt., 2004; Couwenbergs jt., 2004; Reynolds jt.,

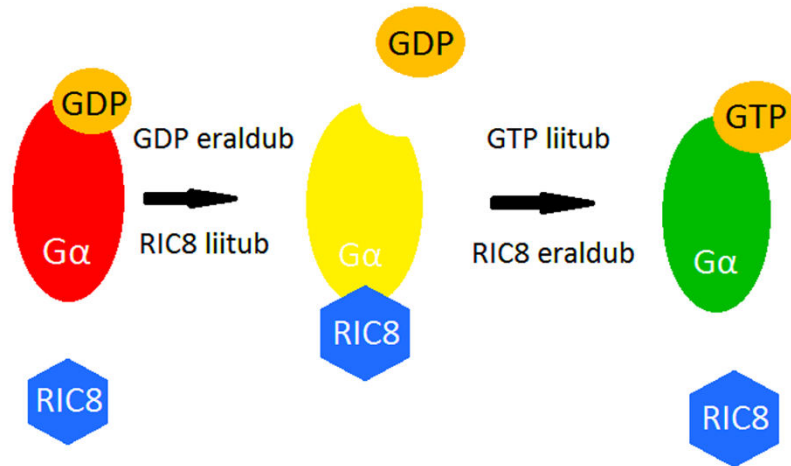
2005; Schade jt., 2005) Selgrootutel loomadel, nagu näiteks nematoodid ja kärbsed, eksisteerib üks *Ric8* geen. Selgroogsetel loomadel, nagu imetajad, kalad ja konnad, esineb kaks erinevat *Ric8* geeni: *Ric8a* ja *Ric8b*. (Mendoza jt., 2014) RIC8A aktiivsus seondub eelkõige $G\alpha_{o/i}$, $G\alpha_{q/11}$ ja $G\alpha_{12/13}$ subühikutega ja RIC8B aktiivsus $G\alpha_{q/11}$, $G\alpha_{olf}$ ja $G\alpha_s$ subühikutega. (Papasergi jt., 2015; Tall jt., 2003)

1.2.3 RIC8 biokeemiline roll

RIC8 üheks peamiseks biokeemiliseks funktsiooniks imetaja rakkudes on toimida G-valkude tšaperonina. Biokeemiliste katsetega on näidatud, et RIC8 aitab juhtida ribosoomides valmivaid $G\alpha$ subühikuid (G-valgu α subühikute) vastavasse pakkimiskompleksi (ing. k. *The cytosolic chaperonin-containing t-complex*). RIC8 jääb $G\alpha$ subühikutega pakkimise järel seotuks ning viib läbi nende transpordi tsütoplasma võrgustikuni (ER, ing. k. *endoplasmatic reticulum*), kus $G\alpha$:RIC8 kompleks seotakse dokkimissaidile. Seal indutseeritakse $G\alpha$:GTP seotud vormi teke, millele järgneb GTP hüdrolyüs GDP-ks, ehk passiivseks vormiks. $G\alpha$:GDP on valmis ühinema $G\beta\gamma$ subühikutega, et moodustada heterotrimeerne G-valk. Heterotrimeerne G-valk seondub membraanseoselise GPCR-iga (ing. k. *G-protein coupled receptor*). (Gabay jt., 2011)

Ric8 knockout rakkude puhul on näidatud, et värskelt toodetud $G\alpha$ subühikute normaalne membraanseostumine on häiritud, mistõttu suunatakse need degradatsiooni. (Gabay jt., 2011) Rakuvabades translatsioonisüsteemides RIC8 puudumisel esineb probleeme $G\alpha$ subühikute voltimisega, mis viivad samuti $G\alpha$ lagundamiseni. (Chan jt., 2013)

Teine oluline biokeemiline funktsioon, mida RIC8 puhul on näidatud, on toimida G-valkude guaniini nukleotiidvahetusfaktorina (GEF, ing. k. *guanine nucleotide exchange factor*) mittekanoniliseks signaalirajas. RIC8 aitab aktiveeritud $G\alpha$ subühikute poolt vahendatud signaali võimendada ja pikendada läbi GEF aktiivsuse. Kui monomeerne $G\alpha$:GTP subühik on andnud signaali edasi efektorile, vahetub tavaliselt GTP $G\alpha$ subühikul GDP vastu ning ühineb $G\beta\gamma$ -ga tagasi heterotrimeerseks kompleksiks. RIC8 interakteerub inaktiivse $G\alpha$:GDP kompleksiga stimuleerides GDP vabanemist (GEF aktiivsus) ning stabiliseerides nukleotiidivaba $G\alpha$ kuni GTP seandumiseni kompleksiga, et $G\alpha$ saaks sama signaali efektorile veel korra anda. (Tall jt., 2003; joonis 3)



Joonis 3. Nukleotiidivahetusfaktor RIC8 mittekanoonilises G valkude signaaliülekanes. Pärast signaali edastamist on $G\alpha$ subühik inaktiivne GDP seoseline (punane). Selleks, et inaktiivse $G\alpha$ signaali taasaktiveerida liitub sellega GEF RIC8 ning moodustub stabiilne nukleotiidivaba vaheühend (kollane), mis võimaldab liituda GTP kompleksiga ja muutuda $G\alpha$ taas aktiivseks vormiks (roheline) ning anda sama signaali oma efektorile veel korra, võimendades signaali.

1.2.4 RIC8 bioloogiline roll

RIC8 osaleb mitmes tähtsas bioloogilises protsessis. Katsetes *Ric8* mutantsete äädikakärbeste (*Drosophila melanogaster*), ümarusside (*Caenorhabditis elegans*) ning hiirtega (*Mus musculus*) on näidatud, et RIC8 on oluline faktor gastrulatsioonis ja rakkude asümmeetrilise ning mitootilise jagunemise regulatsioonis. (Afshar jt., 2004; David jt., 2005; Hampoelz jt., 2005; Wang jt., 2004; Woodard jt., 2010)

Äädikakärbse *Ric8* mutantidel degradeeritakse RIC8 juba tsütoplasmas, mistõttu ei jõua RIC8 rakukorteksisse. See omakorda põhjustab äädikakärbse neuroblastide jagunemisel (normaalselt tegemist asümmeetrilise jagunemisega) vigase apikobasaalse polaarsuse, mitoosikävide vigase orientatsiooni ning lõpptulemusena võrdse suurusega tütararakud. (David jt., 2005; Hampoelz jt., 2005; Wang jt., 2005)

C. elegans’i mitoosikävi orientatsioon ja tõmbejõu genereerimine asümmeetrilisel jagunemisel on samuti tugevalt seotud RIC8-ga. Mitoosikävi suunamise mehhanism on loomariigis konserveerunud, olles seotud RIC8 interaktsioonides tuuma mitootilise aparadi valguga (NuMA), imetajate GoLoco domeeni sisaldava valguga LGN ja $G\alpha_i$:GDP kolmikkompleksiga. Hea mudelsüsteem nematoodi asümmeetrilise jagunemise kujunemisel on sügoodi I lõigustumine (mitootiline jagunemine, mil üks tütarakk on suurem kui teine). Katsetes *Ric8* mutantsete *C. elegans*’i embrüotega on näidatud, RIC8 aitab kaasa koostöös

eelpool märgitud komikkompleksi valkudega piisava tõmbejõu genereerimisele astraalsetel mikrotoubulitel (mikrotoubulite grupp, mis eksisteerib ainult mitoosi vältel ning kinnitub otsaga kinetohoori asemel rakukorteksile) ning mitoosikävi orientatsiooni regulatsioonis. (Ashfar jt., 2004; Couwenbergs jt., 2004; Hess jt., 2004)

Imetajate RIC8 panustab sarnaselt nematoodi RIC8 ja äädikakärbse RIC8-le rakkude mitootilise jagunemise kujunemisse, aidates reguleerida ja suunata mitoosikävi orientatsiooni. Nimelt on eksperimentaalselt tõestatud, et RIC8 seondumisel NuMa:LGN: $G\alpha_i$:GDP kolmikkompleksiga RIC8 (GEF-aktiivsus) aktiveerib kompleksi nukleotiidivahetusega GTP-ks, võimaldades NuMA vabanemise $G\alpha_i$:GDP/GoLoco kompleksist, eesmärgiga reguleerida kävi tõmbejõudu mitoosil. (Tall ja Gilman, 2005)

Katsetes RIC8 defitsiitsete rakkudega on leitud, et nendel rakkudel on mitoosiprotsess aeglustunud, neil esineb juhuslikke mitoosi häireid ja lisaks on märgatavalt vähenenud ka kävi liikumine enne oma õige positsiooni saavutamist (Woodard jt., 2010).

RIC8 puudumine varases embrüogeneesis on letaalne. Seda on näidatud nii ümarussidel (Miller ja Rand, 2000), putukatel (Hampoelz jt., 2005) kui ka imetajatel (Tõnissoo jt., 2006, 2010). Hiire *Ric8^{-/-}* embrüod olid oma normaalsetest pesakonnakaaslastest arenguliselt märgatavalt maha jäänud (seda tõestati ilmekalt ka vastavate markergeenide, nt *Bmp*-ekstra-embrüonaalne ektoderm; *Nodal* – epiblast; *T* – ürgjutt/mesoderm jpm, ajalis-ruumilise ekspresioonianalüüsiga) ja lisaks oli neil raskusi gastrulatsiooni algatamise ja läbimisega ning gastrulatsiooniaegsete struktuuride moodustumisega (Tõnissoo jt., 2010). Näiteks esinevad *Ric8^{-/-}* embrüotel basaalmembraani defektid, neil on lootelehtede formeerumine, migratsioon ja diferentseerumine häiritud, ebanormaalne õõnsuste teke e kavitatsioon, kehatelgede vale paiknemine emaka suhtes, vistseraalse endodermi defektid, amnioni ja allantoiisi moodustumise häired jpm (Tõnissoo jt., 2010). Muutused varajases embrüogeneesis viivad selleni, et *Ric8^{-/-}* embrüod ei olnud suutelised gastrulatsiooni läbima ning algatama organogeneesi, mistõttu hukuvad varases embrüonaalse arengu faasis E6.5-E8.5. (Tõnissoo jt., 2006, 2010; Gabay jt., 2011)

1.2.5 RIC8 närvisüsteemis

RIC8 on oluline komponent närvisüsteemis sünaptilise signaaliülekanne regulatsioonis. Ümarussil *C. elegans* kontrollib RIC8 koostöös $G\alpha_q$ diatsüülglütserooli (DAG) tootmist ja kasutamist, eesmärgiga reguleerida neurotransmitterite vabanemist sünapsites. (Miller jt., 2000). Lisaks on näidatud, et RIC8 osaleb $G\alpha_s$ ja $G\alpha_q$ vahendatud signaalrajas, mis mõjutab

positiivselt *C. elegans* närvisüsteemis sünapsite täidetust sünaptiliste vesiikulitega sünaptilises signaalvõrgustikus (Reynolds jt., 2005)

Imetajatel ekspresseerub RIC8 nii arenevas kui täiskasvanud närvisüsteemis. Hiire embrüo varases organogeneesis vanuses E9.5–E12 on RIC8 ekspressioon valdavalt närvisüsteemi spetsiifiline (*Ric8* avaldub nii kesknärvisüsteemi kui perifeersesse närvisüsteemi kuuluvates struktuurides). Täiskasvanud hiire peaaegu ekspresseerub RIC8 mitmetes käitumuslikult olulistes regioonides nagu näiteks hipokampus, neokorteks, väikeajus jne. (Tõnissoo jt., 2003; 2006). *Ric8*^{+/-} haplodefitsiitsetel loomadel on *wild-type* isenditega võrreldes rohkem ärevushäireid. Samuti esinevad neil häired ruumilises mälus ning taasõppimise protsessides, mis võib olla märk RIC8 olulisusest imetajate mälu- ning käitumuslike omaduste kujunemisel. (Tõnissoo jt., 2006)

Ric8 välja lülitamine hiire postmitootilistest neuronitest põhjustab hiirtel postnataalset letaalsust (P3-P6), sellised vastündinud on tugeva neuromuskulaarse fenotüübiga. Neuromuskulaarne fenotüüp avaldus kõverdatud kehahoiakus, võimetuses keha asendit muuta, lihasspasmides ning mandunud motoorses võimekuses, lisaks esines probleeme südame töövõime, löögi intensiivsuse ning adaptatsiooniga pingutusele (Ruisu jt., 2013).

Väikeaju arengus on RIC8 rolli näidatud basaalmembraani (BM, õhuke sidekoeline membraan mis eraldab erinevate elundite sise ja väliskeskkonda) ning Bergmanni gliia ühendumises. Bergmanni gliia on väikeajule spetsiifiline nimetus radiaalgliia kohta. Bergmanni gliia omab embüonaalses arengus juhtetee ülesannet, mida mööda teised närvirakud migreeruvad diferentseerudes hiljem tavalisteks närvirakkudeks. RIC8 on Bergmanni gliias vajalik ajukurdude moodustumise protsessis, korrektseks rakk-membraan seondumiseks, korrektseks rakkude organiseerumiseks ning basaalmembraani moodustumiseks. RIC8 puudumisel väikeajus esinevad hiirtel rakk-BM ühendumise probleemid, BM defektid ning väikeaju kurdude moodustumine on häiritud. (Ma jt., 2012)

Sarnaselt on näidatud, et RIC8A puudus hiire arenevas otsaju korteksis põhjustab häireid aju pehmekesta (*pia mater*) basaalmembraani terviklikuse säilimisel ning normaalse neurogeneesi kujunemisel. (Kask jt., 2015) Viimaste tööde käigus on näidatud tüüp II lissentsefaalia (rakkude ülemigratsioon, mille käigus neuronid ja gliia migreeruvad läbi pehmekesta basaalmembraani läbimurrete) esinemine *Ric8* närvisüsteemi konditsionaalsetel *knockout* hiirtel. (Kask jt., 2018)

1.2.6 RIC8 neuraalharja migratsioonis

RIC8 on äärmiselt oluline molekulaarne faktor neuraalharja rakkude suunatud migratsioonis, sest G-valkude ja GPCR signaalrada on vastutav mitmes olulises migratsiooni läbi viivas funktsioonis. GPCR-id on *in vivo* seotud selliste protsessidega nagu liikumise kontakthinhibitsioon (ing. k. *Contact inhibition of locomotion*; seisneb soovis vältida liikumisel kokkupõrget naaberrakkudega, mistõttu muudab liikumise suunda) ning kemotaksis (ing. k. *Chemotaxis*; seisneb soovis liikuda keemilise meelitaja suunas). (Carmona-Fontaine jt., 2008; Theveneau jt., 2010) RIC8 tõenäoline roll kraniaalse neuraalharja migratsioonis seisneb adhesiivsete omaduste reguleerimises ning kemotaksise kontrollis. RIC8 funktsiooni rakkude migratsioonis on näidatud ilmekalt erinevate rakukultuuri katsetega. (Fuentealba jt., 2013; Ruisu jt., 2017; Xing jt., 2013)

GEF RIC8 omab rolli $G\alpha_i$ and $G\alpha_{12/13}$ vahendatud signaalide poolt adhesiooni esile kutsutvate signaalide võimendamises. See tähendab võimendatud signaali liiduste loomiseks migratsioonivoo paiknevate rakkude vahel ning migratsioonivoo *leading-edge* (eesti k. esirinnas paiknevad) rakkude fokaalsete adhesioonikomplekside loomiseks ekstratsellulaarse maatriksiga. (Fuentealba jt., 2013)

Migratsiooniks vajaliku kemotaksise puhul kemokiini retseptor 4 (ing. k. *chemokine receptor 4*) käitub G-valgu seoselise retseptorina, mistõttu kemoatraktant SDF1 (*Stroma cell derived factor-1*) seondumisest saadud signaali võimendamiseks on RIC8 GEF roll äärmiselt oluline. Katsed on näidanud, et migratsioonivoo *leading-edge* rakkudes on RIC8 koondunud polariseeritult plasmamembraani alla, toetades adhesiooni ning kemoatraktsiooni. Näiteks kannuskonna *Xenopus laevis* ja väikese kannuskonna *Xenopus tropicalis* RIC8 funktsioonikaotusega (ing. k. *loss-of-function*) mutantidel on täheldatud kraniaalse neuraalharja migratsioonis olulisi defekte. (Fuentealba jt., 2013)

$G\alpha_{12/13}$ on täiendavalt lisaks GPCR-ile näidatud seondumas adhesioonimolekulide rühmale – integriinidele. Integriinid on plasma membraanil paiknevad molekulid, mis vahendavad raku adhesiooni ekstratsellulaarsele maatriksile ja migratsiooni ekstratsellulaarsel maatriksil. (Gong jt., 2010)

Ric8^{-/-} hiire embrüonaalsetel tüvirakkudel (mES, ing. k. *mouse embryonic stem cells*) ja embrüonaalsetel fibroblastidel (MEF, ing. k. *mouse embryonic fibroblasts*) on säilinud võime kinnituda erinevatele ekstratsellulaarse maatriksi komponentidele. Vaatamata sellele on rakkude hajumine substraadil, migratsioon ning võime moodustada stressikiude ning fokaalse adhesiooni komplekse defektne ning häiritud. (Ruisu jt., 2017) Selline häire võib olla põhjustatud RhoA (väikeste GTPaaside perekonda kuuluvad valgud) langenud aktiivsusest.

(Ruisu jt., 2017) RhoA omakorda vastutab aktiini stressikiudude moodustamise eest ning $G\alpha_{13}$ vähenemise eest (RIC8A interaktsioonipartner), mis stimuleerib RhoA enda aktiivsust selles protsessis. (Ridley ja Hall, 1992). $G\alpha_{13}$ vahendatud RhoA regulatsiooniga seotud integriinid ($\beta 1$ ja $\beta 3$ subühikud) kannavad *inside-out* (seest-välja-suunalises) signaalrajas RhoA-d inhibeerivat rolli. Seega on RIC8 oluline kahepoelses RhoA regulatsioonis ning läbi selle aktiini tsütoskeleti moodustumises. (Ruisu jt., 2017)

2. EKSPERIMENTAALNE TÖÖ

2.1 Töö eesmärk

Analüüsida *NestinCre;Ric8^{lacZ/lox}* embrüote kõva suulae moodustumist võrreldes kontrollhiirte/pesakonnakaaslastega.

2.2 Materjalid ja meetodid

2.2.1. Töös kasutatud hiireliinid

Tegevus bakalaureusetöös kasutatud katseloomadega on kooskõlas Euroopa Liidus kehtestatud eeskirjadega. Loomadega tegelesid ja neid ohverdasid vastavalt EL-i direktiivile 2010/63/EU koolituse läbinud ja loomkatse luba omavad isikud. Kõiki eksperimendis kasutatud hiiri hoiti standardsetes laboritingimustes, kus neile oli võimaldatud ööpäevaringselt kättesaadav söök ja jook *ad libitum*. Katseloomi hoiti standardsetes valgusetingimustes, kus vaheldusid 12-tunnised valguse- ja pimedusetsüklid.

Kõik katsetes kasutatud hiireliinid olid isogeense C57Bl6/J geneetilise taustaga. *Ric8* neurospetsiifilise konditsionaalse hiireliini *NestinCre;Ric8^{lacZ/lox}* (*Nestin;Ric8^{-/-}*) saamiseks kasutati järgmisi hiireliine:

1. *NestinCre^{+/-}* (*NestinCre*) – transgeenne hiireliin, milles Cre-rekombinaasi ekspressioon on viidud hiire *Nestin* promootori (neuraalsete eellasrakkude spetsiifilise) kontrolli alla (Tronche jt., 1999).
2. *Ric8^{F/F}* – transgeenne hiireliin, milles märklaudgeeni (*Ric8*) 1–4 ekson on asetatud loxP järjestuste vahele, mille tunneb ära koospetsiifiline Cre-rekombinaas (Ruisu jt., 2013).
3. *Ric8^{lacZ/+}* – lacZ *knock-in* hiireliin, milles *Ric8* geeni ühes alleelis 5 esimest eksonit on asendatud reportergeeniga *lacZ*, millelt sünteesitava β -galaktosidaasi ekspressioon jälgendab *Ric8* ekspressiooni (Tõnissoo jt., 2006).

Emaseid $Ric8^{F/F}$ hiiri ristati topeltheterosügootsete $NestinCre^{+/-}; Ric8^{lacZ/+}$ isastega (♂ $NestinCre$ ja ♀ $Ric8^{lacZ/+}$ ristamisel saadud loomad), mille tulemusena saadi $NestinCre^{+/-}; Ric8^{lacZ/F}$ ($Nestin; Ric8^{-/-}$) embrüod ning kontrollidena kasutatud pesakonnaaaslased (genotüübid vastavalt $NestinCre^{+/-}; Ric8a^{F/+}$; $NestinCre^{-/-}; Ric8a^{lacZ/F}$; $NestinCre^{-/-}; Ric8a^{F/+}$).

Neuraalsete eellasrakkude spetsiifilise $NestinCre$ transgeeni aktiivsuse iseloomustamiseks hiire embrüotel E13.5 kasutati reporterliinina B6.129S7-GT-ROSA26 (ROSA) hiireliini, mis sisaldab ROSA26 lookuses paiknevat $loxP-STOP-loxP-lacZ$ konstrukti. Kui ristata uuritavat Cre-liini ROSA-liini hiirtega, siis lõigatakse Cre-rekombinaasi ekspresseerudes loxP järjestuste vaheline lõik Cre-spetsiifiliselt neuroni eellasrakkudest välja, võimaldades ROSA26 promootoril käivitada $lacZ$ ekspressiooni (Zambrowicz jt., 1997; Soriano, 1999).

Valdav osa kasutatud embrüonaalset ja postnataalset materjalist oli varasemate tööde käigus kogutud ja sisestatud parafiiniblokkidesse.

2.2.2. Embrüote dissekteerimine

Antud töös kasutatud hiireembrüod olid vanustes E12.5, E14.5, E15,5 ning P0. Pesakonna vanuse arvestamisel lähtuti emaslooma suguteedes tekkiva limakorgi moodustumise (kopulatsioonakti toimumise indikaator hiirtel) avastamise päevast ning see loeti vanuseks E0.5.

Embrüote kätte saamiseks dissekteeriti eelnevalt ohverdatud tiine hiire emakasarved koos embrüotega ning asetati jääle ühekordse soolalahusega fosfaatpuhvrisse (PBS, ing. k. *phosphate-buffered saline*). Järgnevalt eemaldati binokulaari (Leica) all emakast embrüod koos lootekestadega (platsenta, rebukott, amnion) ning seejärel eraldati embrüo lootekestadest ning pesti külma 1xPBS-iga. Edasi asetati embrüod 12h fiksaatorisse (4% paraformaldehüüdi (PFA)/PBS lahus). Embrüote genotüpiseerimiseks võeti dissekteerimise käigus rebukotist koeproov.

2.2.3. Embrüote genotüpiseerimine

Embrüote genotüpiseerimiseks kasutati embrüotelt eraldatud rebukoti materjali, millele kanti peale 100 µl lüüsilahust. Lüüsilahus koosnes kümnekordsest lüüsipuhvrst Buffer B (10 mM Tris-HCl (pH 7.5 37 °C juures), 10 mM $MgCl_2$, 0.1 mg/ml veiseseerumi albumiin), proteinaas K-st (10µg/ml) ja ddH₂O-st. Koematerjali ja lüüsilahuse segu segati Vortexil ning asetati 56 °C juurde üleöö inkubeerima. Proteinaas K inaktiveeriti järgmisel päeval 20 minuti

jooksul 96 °C juures ning tsentrifugiti 10 min vältel 13000 p/min (Heraeus Instruments Biofuge Pico, Rotor w/ClickSeal lid), et eraldada lüüsumata osa ja DNA lüsaat. Sellele järgnes embrüote genotüübi määramine alleelspetsiifilise polümeraasi ahelreaktsioon.

PCR teostati 3 erineva lähtekoostisega, mille erinevus seisnes kasutatavates alleelspetsiifilistes praimerites. Iga eraldiseisev PCR reaktsioonisegu maht oli 10 µl, mis sisaldas järgnevaid standardseid koostisosi: 1 µl Buffer B puhvrit, 1 µl dNTP, 0.8 µl MgCl₂, 0.1 µl Taq polümeraasi ning 1 µl vastavat DNA lüsaati. Igale reaktsioonisegule lisati vastavad alleelspetsiifilised praimerid järgnevat kogustes:

1) 0,25 µl NestinCre 1 ja 0,25 µl NestinCre 2.

2) 0,3 µl LacZ300, 0,5 µl Ric8PTGgenoF ja 0,2 µl PTGin1rew

3) 0,25 µl RicCreGenoF ning 0,25 µl RicCreGenoR

PCR-i reaktsioonisegudes kasutati alljärgnevaid alleelspetsiifilisi primereid:

Genotüüp: *NestinCre*

NestinCre1 5' – AGGTGTAGAGAAGGCACTTAGC – 3'

NestinCre2 5' – CTAATCGCCATCTTCCAGCAGG – 3'

Genotüüp: *Ric8^{LacZ/+}*

LacZ300 5' – CGCATCGTAACCGTGCATCT – 3'

Ric8PTGgenoF 5' – CTCTCCCAGCATCCCTCAC – 3'

PTGin1rew 5' – CACACCCCAGCCGAGTTG – 3'

Genotüüp: *Ric8^{F/F}*

RicCreGenoF 5' – GGTAGGGCTCAATGTTGG – 3'

RicCreGenoR 5' – GCCAAACAATCTCTCGAACC – 3'

PCR teostati masinal Biometra Thermocycler.

PCR ajaline kestvus:

95 °C 5 minutit

95 °C 30 sekundit

58 °C 40 sekundit

72 °C 1 minut

72 °C 10 minutit

4 °C hoidmine

} 32 tsükli

PCR-iga paljundatud DNA produktide suurust analüüsiti geelelektroforeesil. Proovid kanti läbi jooksutamiseks 1.5% TBE (Tris-boraat-EDTA) agarosgeelile, kuhu oli segatud sisse 0,001% etiidiumbromiidi.. Võrdluseks kasutati 100kb DNA *ladder* pikkusmarkerit.

2.2.4. Parafiinlõikude valmistamine

Embrüotest lõikude valmistamiseks sisestati need parafiini. Selleks dehüdreeriti embrüod alkoholireas 50%, 60%, 70%, 80% 12h tsüklitega ning 90%, 96% ja 100% 24h tsüklitega. Sellele järgnes hoidmine ksüloolis 2 x 1,5 tundi.

Parafiini sisestamine toimus kolmes etapis:

- 1)Esimeses parafiinis inkubeerimine 60 °C juures (1 h);
 - 2)Teises parafiinis inkubeerimine 60 °C juures (1,5 h);
 - 3)Kolmandasse parafiini sisestamine parafiniseerimise aparaadil (Microm AP280).
- Katseloomadest preparaate valmistamiseks teostati parafiini sisestatud embrüotest lõikude valmistamine. Embrüoid sisaldavatest parafiinblokkidest lõigati mikroomiga (Thermo Scientific Microm HM 355S) sõltuvalt embrüo vanusest 6- või 8- μ m seerialõigud. Lõigud asetati adhesiivsetele alusklaasidele (Kaltek KolorFrost Plus ning Thermo Scientific Polysine Slides) ja lasti kuivada ning kinnituda 37 °C juures 24 tundi. Parafiinlõigud säilitati edasisteks katseteks 4 °C juures.

2.2.5. Histoloogiliste preparaate valmistamine

Histoloogiliste preparaate valmistamiseks teostati hematoksülin-eosiin värvimine. Esmalt inkubeeriti preparaate 30 minutit 60 °C juures, et lõigud kinnituksid alusklaasile kindlalt. Sellele järgnevalt kaeti preparaadid 3 x 5 minutiks ksülooliga, et lõigud deparafiniseerida. Preparaate rehüdreerimiseks teostati preparaate katmine alkoholireaga, kus lõigud kaeti 2 x 3 minutiks 100% etanooliga ning seejärel kanti preparaatele järjest 96%, 90%, 70%, 60%, 50% 2 x 1 minutiks. Alkoholirea lõpus kanti otse 50% etanooliga kaetud lõigud 1 minutiks ddH₂O (MQ) Siis algas värvimine. Alustuseks värviti rakutuomad 5 min jooksul hematoksüliiniga sinakaks. Pärast värvingut loputati lõikudelt kraaniveega üleliigne hematoksüliin maha ning asetati kinnitumiseks 10 minutiks kraanivee vanni. Teises värvimise osas kaeti lõigud 3 minutiks eosiniga, et raku tsütoplasma värvuks. Taas loputati üliigne värv ning paigutati lõigud kraanivee vanni 10 minutiks fikseeruma. Sellele järgnes dehüdreerimine kasvava alkoholireaga. Alustuseks lisati üleliigse eosini loputamiseks lõikudele 70% etanool,

mille jätkuks tehti lühike alkoholirida 96% 2 x 1 minutit, 100% 2 x 3 minutit ning lõpuks taas ksülool 3 x 5 minutit. Dehüdreeritud preparaadid sulundati Pertexiga ning kaeti ettevaatlikult katteklaasiga.

2.2.6. Koelõikude pildistamine

Histoloogilisi preparaate vaadeldi ning analüüsiti kasutades mikroskoopi Olympus BX51 Quantum. Preparaatide pildistamiseks kasutati mikroskoobi külge integreeritud kaamerat Olympus DP71. Preparaatidest tehtud fotode järeltöötlus teostati, kasutades programmi Adobe Photoshop CS4.

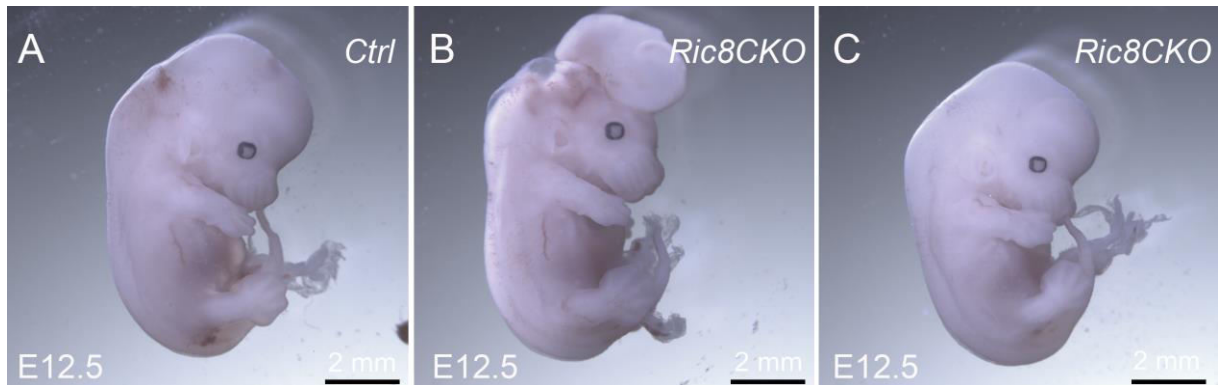
2.2.7. Mõõtmiste teostamine koelõikudel

Analüüsitud koepreparaatidest tehtud fotodele kalibreeritud mõõtkava lisamiseks ning kudede mõõtmiste teostamiseks kasutati spetsiaalset mõõtkava klaasi (graduateering 1 mm, väikseim ühik 10 µm), mis pildistati sisse sama suurenduse ning sama resolutsiooniga kui preparaadid. Seejärel teostati kõva suulae paksuse mõõtmine näokolju anteriorse osa (see piirkond oli uuritud preparaatidel kõige terviklikumalt, kudede protsessimisel (parafiniseerimisest valmis histoloogiliste preparaateni) säilinud, võimaldades kõige täpsemaid/võrreldavamaid mõõtmisi) frontaallõikudel kasutades programmi Adobe Photoshop CS4. Mõõtmiste tulemused saadi igal lõigul sama piirkonna 3 mõõtmise keskmisena. P väärtuste välja selgitamiseks kasutati Microsoft Excel funktsiooni Two sample T-test.

2.3 Tulemused

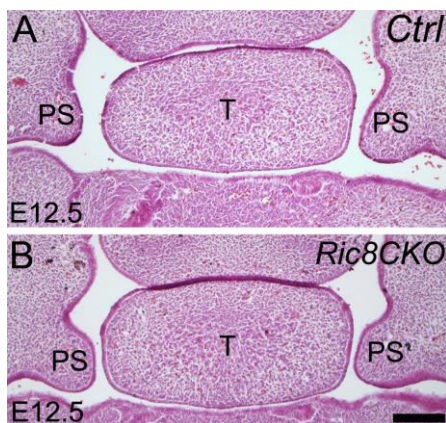
Varasemalt oli teada, et neuraalsete eellasrakkude spetsiifilistel *Ric8 knockout* (*NestinCre;Ric8^{lacZ/lox}*) embrüotel vanuses E10.5 esinevad ca 40 % ulatuslikud neuraalsete arenguhäired ja kraniofastsikulaarsed defektid (Kask jt., 2015). Iseloomustamaks RIC8 rolli hiire palatogeneesis kasutati *NestinCre;Ric8^{lacZ/lox}* (edaspidi *Ric8^{cko}*) embrüoid vanustes E12.5 (n=2), E14.5 (n=6), E15.5 (n=3) ja vastsündinud P0 loomi (n=2). Kontroll-loomadena kasutati vastavate *Ric8^{cko}* loomade pesakonnakaaslast, E12.5 (n=3), E14.5 (n=7), E15.5 (n=4), P0 (n=2), kellel ei ole varasemalt märgatud märkimisväärseid anatoomilisi-morfoloogilisi kõrvalekaldeid (Kask jt., 2015). Igal loomal analüüsiti võimalusel ristlõikeid 3 erinevas tasapinnas – anteriorises, mediaalses ja posterioorses osas.

E12.5 embrüote esmane fenotüübi analüüs näitas, et kahest genotüüpiseeritud *Ric8^{CKO}*-st (3 embrüot oli dissekteerimisel resorbeerunud, mistõttu ei saanud genotüüpi tuvastada), ühel esines tõsine neuraalne arenguhäire – eksentsefaalia (sündroom, mille puhul peaju paikneb väljaspool koljut) (joonis 4B), samas kui teine *Ric8^{CKO}* embrüo (joonis 4C) sarnanes fenotüübilt kontroll-pesakonnakaaslastega (joonis 4A). Näokolju piirkonnas väliselt märkimisväärseid kõrvalekaldeid *Ric8^{CKO}* ja kontrollembrüote puhul ei täheldatud (joonis 4A, B).



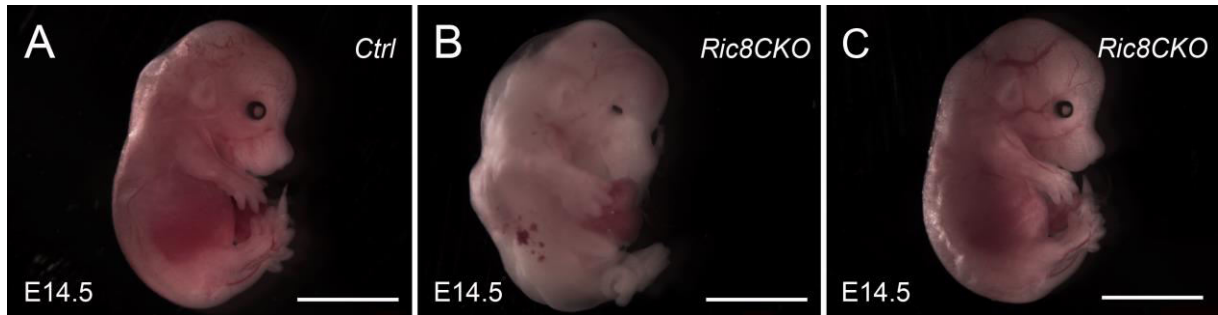
Joonis 4. E12.5 embrüote fenotüübi analüüs. (A) Kontroll pesakonnakaaslane ja (B-C) *Ric8^{CKO}* embrüo. Pildil B on nähtav silmatorkava eksentsefaaliaga embrüo. Mõõtkava 2mm.

Järgnevalt teostati detailne morfoloogilis/histoloogiline analüüs areneva suulae piirkonnast. Embrüotest tehti suulae piirkonna suhtes frontaallõikes parafiinlõigud, millele teostati hematoksüliin-eosiin värving. Analüüsi tulemusena selgus, et uuritud E12.5 *Ric8^{CKO}* (n=2) embrüotel on sarnaselt kontroll-embrüotega (n=3) moodustunud külgedele palataaljätked, mis on võimelised migreerima suuõõne põhja suunas (joonis 5A, B) .



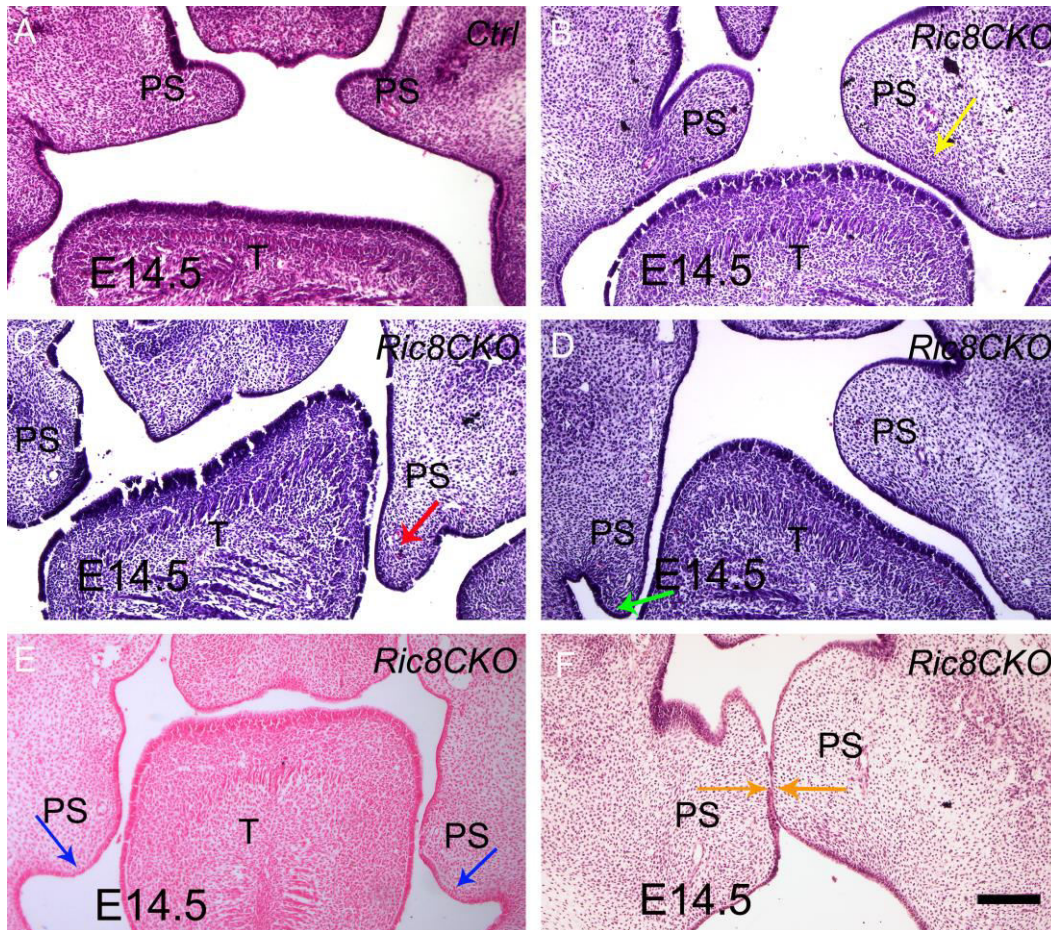
Joonis 5. E12.5 embrüote suulae histoloogiline analüüs. (A) Kontrollembrüo ja (B) *Ric8^{CKO}* embrüo näokolju anterioorse osa frontaallõik. Pildil B on nähtav eksentsefaaliaga embrüo näokolju lõik., PS – palataalne jätke, T – keel . Mõõtkava 200 µm

Järgmine uuritud vanus oli E14.5. Väline fenotüübiline analüüs näitas, et *Ric8^{CKO}* (n=6) embrüotel esinesid võrreldes kontrollembrüotega erinevad fenotüübid. Ühel uuritud *Ric8^{CKO}* embrüol oli selgesti eristuv fenotüüp, tugevad neuuraaloru arenguhäired, silma ja väliskõrva, jäsemete ja ka kraniofastsikulaaarsed arengudefektid (otsmiku- ja koonupiirkond) (joonis 6B). Samas valdav osa *Ric8^{CKO}* (n=5) embrüotest sarnanesid fenotüübilt oma kontroll-pesakonnakaaslastega (joonis 6A, C).



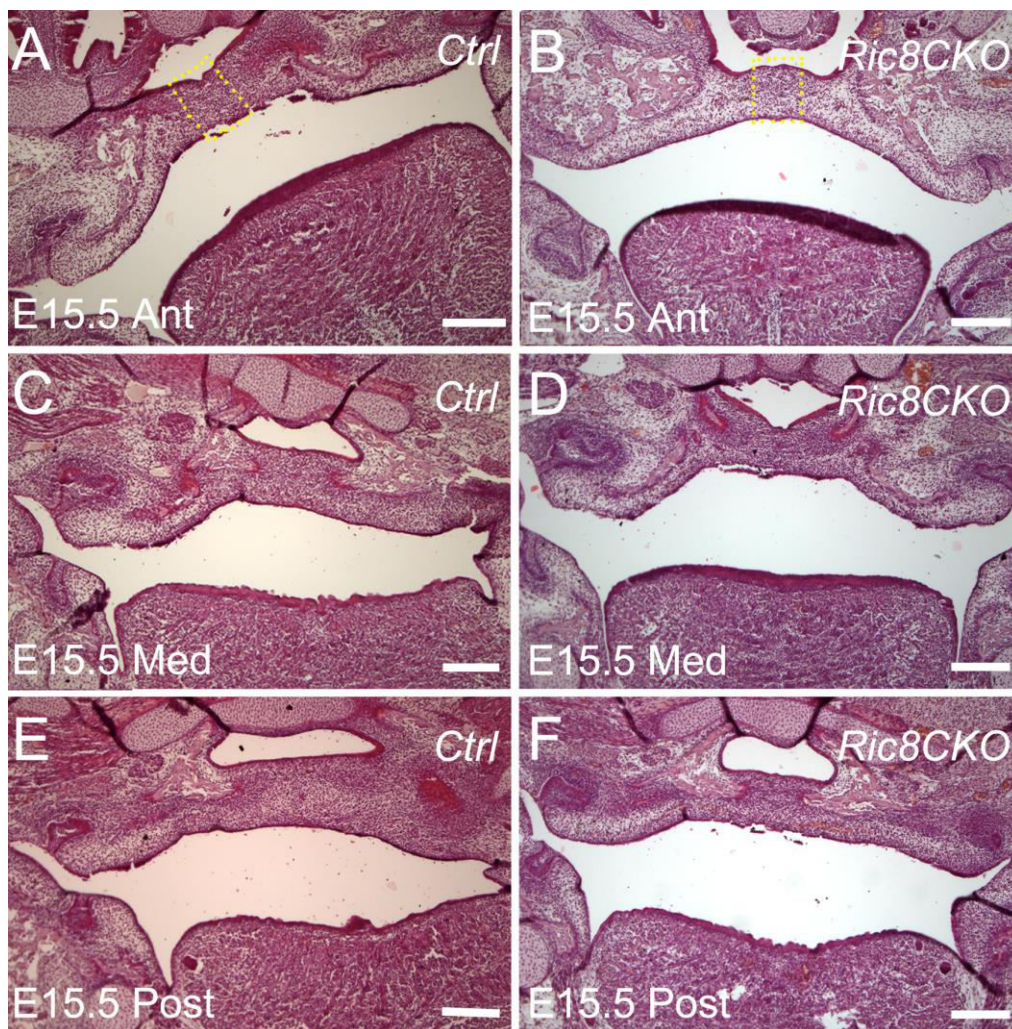
Joonis 6. E14.5 embrüote fenotüübi analüüs. (A) Kontroll pesakonnakaaslane ja (B-C) *Ric8^{CKO}* embrüod. (B) Tugevate arenguanomaaliatega (neuuraaloru arenguhäired, silma-, väliskõrva ja koonupiirkonna häired) *Ric8^{CKO}* embrüo. (C). Fenotüübilt kontroll-embrüoga sarnase fenotüübiga *Ric8^{CKO}*. Mõõtkava 2mm.

Järgnev detailne näokolju piirkonna frontaallõikude analüüs näitas, et *Ric8^{CKO}* embrüotel esinesid erinevad kõva suulae arenguhäired. Kerge viide palataaljätke kerkimises esines 1 *Ric8^{CKO}* embrüol (joonis 7B, kollane nool). Ühel *Ric8^{CKO}* loomal esines tugev unilateraalne kerkimisdefekt koos teise palataalse jätke kasvuhäirega (joonis 7C, punane nool) ning 1 *Ric8^{CKO}* esines vaid tugev unilateraalne kerkimisdefekt (joonis 7D, roheline nool). Üks *Ric8^{CKO}* embrüo oli ca 2-päevase palatogeneesi mahajäämusega (joonis 6B, joonis 7E) – toimunud oli väljakasv aga kontrollist (joonis 7A) vähem ning kerkimine ei olnud veel alanud (joonis 7E). 1 *Ric8^{CKO}* oli võrreldes kontrollidega ca 0.5 päeva ees, olles jõudnud jätkete kokkupuuteni, ent adhereerunud piirkonnad olid üksteise suhtes mõnevõrra nihkes (joonis 7F).



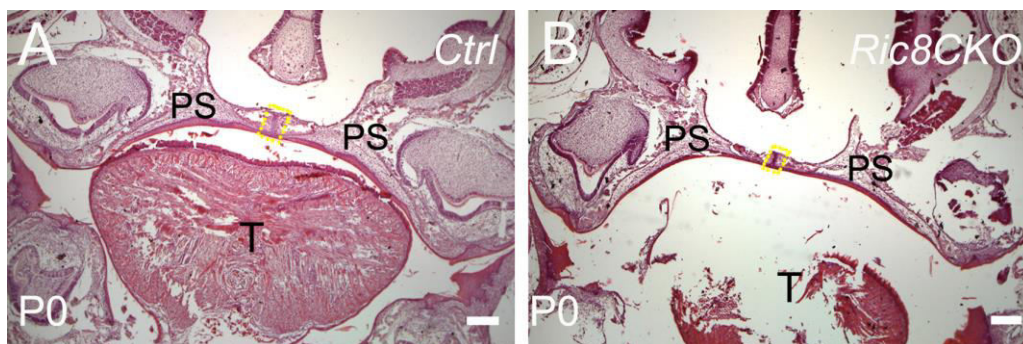
Joonis 7. E14.5 embrüote suulae histoloogiline analüüs. (A) Kontrollembrüo ja (B-F) *Ric8^{CKO}* embrüote näokolju anteriorse osa frontaallõigud. (B) Kollane nool – palataalse jätke kerkimine viitega, (C) punane nool – kerkimata palataalne jätke ning normaalsest vähesem kasv teisel palataalsel jätkel (D) roheline nool – unilateraalselt kerkimata palataalne jätke, (E) sinised nooled – ebapiisavalt kasvanud palataalsed jätked, (F) oranžid nooled – erinevatest kohtadest toimunud adhesioon. PS – palataalne jätke, T – keel. Mõõtkava 200 μm

Üks päev hiljem, vanuses E15.5 analüüsitud *Ric8^{CKO}* (n=3) embrüotel võrrelduna kontrollpeskonnakaaslastega (n=3) kõva suulae arenghäireid ei täheldatud (joonis 8). *Ric8^{CKO}* loomadel oli sarnaselt kontrollidega palataalsed jätked migreerunud horisontaalseks ja adhereerunud ning sulandunud omavahel. Siiski oli suulae paksus *Ric8^{CKO}* embrüotel oluliselt (T-test; $p < 0,05$ ($p = 0,0088$)) õhem kui kontrollhiirtel. Kontrollhiirte suulae paksus anteriorse osas oli keskmiselt (kollane punktiirkast, Joonis 8A) 186,25 μm , samas kui *Ric8^{CKO}* loomade suulae keskmine paksus oli 156,67 μm (Joonis 8B), SEM = $\pm 6,72 \mu\text{m}$ (ing k. *standard error of the mean*).



Joonis 8. E15.5 embrüote suulae histoloogiline analüüs. (A, C, E) Kontrollembrüo ja (B, D, F) Ric8^{CKO} embrüo näokolju anteriorse osa frontaallõik. Anterioorsete lõikude kollase punktiiriga ümbritsetud piirkonnast teostati mõõtmised suulae jämeduse välja selgitamiseks. Lühendid: Ant - anteriorne; Med- mediaalne; Post- posterioorne. Mõõtkava 200 µm

Lisaks analüüsiti ka vastsündinud loomadel suulae piirkonda frontaallõikudel. Analüüsitud Ric8^{CKO} (n=2) loomade ja kontrollloomade (n=2) suulagi oli võrreldavalt välja kujunenud. Samas sarnaselt E15.5 vanusele oli suurimaks erinevuseks suulae paksus, mis kontrollhiirtel (n=2) oli anteriorises osas 158 µm ning Ric8^{CKO} (n=2) 110 µm (joonis 9A, B; kollane punktiirkast).



Joonis 9. P0 vastsündinud hiirte suulae histoloogiline analüüs. (A) Kontrollisend ja (B) *Ric8^{CKO}* looma näokolju anteriorse osa frontaallõik. Kollase punktiiriga ümbritsetud piirkonnast teostati mõõtmised suulae paksuse välja selgitamiseks. PS – palataalne jätke, T – keel . Mõõtkava 200 μ m.

2.4 Arutelu

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli uurida G-valkude guaniin-nukleotiidivahetusfaktor (GEF) RIC8 võimalikku rolli imetajate palatogeneesis kasutades mudelina neuraalsete eellasrakkude spetsiifilisi *Ric8 knockout* hiiri (*NestinCre; Ric8^{lacZ/lox}*, edaspidi *Ric8^{CKO}*). Antud hiireliinile on iseloomulikud mitmed neuraalsed arenguhäired nagu defektne kortikogenees, neuraalse migratsiooni häired, neuromuskulaarsed häired, ajukelmete arenguhäired jpm (Kask jt., 2015, 2018; Ma jt., 2012, 2017). Lisaks on näidatud, et neil hiirtel on häiritud ka peaaegu veresoonte areng (Ma jt., 2017), silmade ja südame areng (Kask jt., 2018). Oluline aspekt on ka see, et imetajate *Ric8* on ekspresseerunud nii arenevates kui täiskasvanud kesknärvisüsteemis ja perifeerses närvisüsteemis (Tõnissoo jt., 2003, 2006;). Neuraalharja derivaatides (nt perifeerse närvisüsteemi neuronid, osad aju pehmekesta – *pia mater* - moodustavad rakud, südame vaheseina moodustavad rakud) on näidatud samuti RIC8 ekspressiooni (Tõnissoo jt 2003, Kask jt 2018). Mudelorganismi kannuskonna (*Xenopus laevis*) peal on näidatud, et xRic8 mängib olulist rolli kraniaalse neuraalharja rakkude migratsioonil ja kraniofastikulaarsete struktuuride moodustumisel (Fuentealba jt., 2013). Imetajate näopiirkonna arengu uurimisel on ilmekalt hiire embrüote peal tõestatud, et kraniaalse neuraalharja rakud migreeruvad maksillaarsesse jätkesse, andes aluse suulae moodustumisele (Trainor ja Tam, 1995). Kuna imetajate kõva suulae arengus on peamine roll kraniaalsel neuraalharjal, siis on oluline teada millised molekulaarsed faktorid mõjutavad neuraalharja rakkude moodustumist, migratsiooni ja diferentseerumist kõva suulae struktuurideks. Antud töös uuritud GEF RIC8 ekspressiooni/lokalisatsiooni imetajate suulae arenevates struktuurides pole tänaseni näidatud. Arengubioloogia õppetoolis varasemalt tehtud histoloogilistest preparaatidest, kus oli kasutatud X-gal värvinguga *Ric8^{lacZ}* (*Ric8* geeni

ühes alleelis 5 esimest eksonit on asendatud reportergeeniga *lacZ*, millelt sünteesitava β -galaktosidaasi ekspressioon jälgendab *Ric8* ekspressiooni (Tõnissoo jt., 2006)) E13.5 embrüote frontaallõike, oli võimalik tuvastada X-gal positiivseid rakke erinevates neuraalharja derivaatides, muuhulgas arenevas suulae piirkonnas (Tõnissoo avaldamata andmed). Samuti oli võimalik tuvastada *NestinCre* transgeeni aktiivsust hiire neuraalharja derivaatides, kaasa arvatud arenevas suulaes (E13.5) X-gal töödeldud *NestinCre;ROSA26* (ROSA26 on Cre-reporterliin B6;129-*Gt(Rosa)26Sortm1Sho/J*; Soriano, 1999) embrüotest tehtud frontaallõikudel (Tõnissoo avaldamata andmed). Seega võis eeldada, et *Ric8^{CKO}* loomadel on kraniaalse neuraalharja päritolu rakkudes RIC8 puudus, ehkki seda oleks vaja edaspidi kontrollida erinevate meetoditega (nt *real-time* PCR, Western blot, immuunohistokeemiline analüüs).

Ric8^{CKO} loomade fenotüübi analüüs kattus varasemalt näidatud andmetega (Kask jt., 2015), et valdav enamus uuritud *Ric8^{CKO}* embrüoid sarnanesid välisel vaatlusel oma normaalsete pesakonnakaaslastega. Samas esines selgelt eristuvaid tugevate arenguanomaaliatega *Ric8^{CKO}* genotüübiga indiviide ja absorbeerunud embrüoid (ilmselt tugevate väärarengute tõttu hukkunud varasematel arengupäevadel) keda ei olnud võimalik genotüpiseerida. Statistiline analüüs on näidanud, et selliste embrüote osakaal on *ca* 20% *Ric8^{CKO}* loomadest (Kask jt., 2015). Lisaks on Kask jt., 2015 viidanud, et nendel 20% *Ric8^{CKO}* loomadel esinevad kraniofastsikulaarsed häired (alaarenenud üla/alalõua piirkond), mis annab alust arvata, et ka normaalne palatogenees ehk kõva suulae areng on häiritud. Lisaks on ka neil *Ric8^{CKO}* loomadel, kes suudavad elada sünnini (Kask jt., 2015, Ma jt., 2017) koonuosa mõnevõrra lühem kui kontroll-pesakonnakaaslastel (Kask jt., 2015). Täpsem histoloogiline analüüs erinevates embrüoloogilistes vanustes ning vastsündinud *Ric8^{CKO}* hiirtel näitas, et tulemused on küllaltki varieeruvad nii pesakondade, vanuste kui kui üksikute isendite kaupa. E12.5 hiirtel, kelle seas oli ühel *Ric8^{CKO}* embrüöl fenotüübiliselt üks kõige silmatorkavamaid väärarenguid – eksentsefaalia – ei esinenud kõva suulae arengus märgatavaid väärarenguid. Kõigil uuritud E12.5 *Ric8^{CKO}* embrüotel kui ka nende pesakonnakaaslastel oli kasvanud suuõõne põhja suunas välja korrektselt asetunud palataaljätked. Ilmselt ekstreemsemaid fenotüüpe ja suulae arenguhäireid oleks tuvastatud nende 3 embrüo seast, kes kahjuks selleks hetkeks olid resorbeerunud. Vanuses E14.5 hiirtel seevastu esines olulisi suulae moodustumise defekte 5 *Ric8^{CKO}* embrüöl 6st, mille hulgas oli nii palataaljätkede kerkimishäireid, asümmeetrilist kokkukasvu kui ka väljakasvu defekte. Sarnaseid defekte on näidatud näiteks *Osr2^{-/-}* (ing k. *odd-skipped-related 2*) hiire embrüote puhul, kellel tekkisid hilisemates vanustes palataalsete jätkede kerkimis- ning väljakasvu defektid, samas kui

vanuses E12.5 olid *Osr2*^{-/-} loomad veel kontrollhiirtest eristamatud (Lan jt., 2004). Seega võib selline ajaline komponent olla hiirte palatogeneesi mehhanismidest tulenev eripära.

Üheks suulaelõhede põhjuseks võib olla viga palataaljätke kerkimise protsessis, mis algab rakkude läbimurrete (ing. k. *protrusion*) moodustumisega palataaljätke mediaalsest osast, et kasvada välja horisontaalses suunas. Seejärel migreeruvad palataaljätke olevad rakud ümber keele külgedelt keele kohale ning endine palataaljätke ventraalne tipp kerkib tulevaseks suulaeks. (Yu ja Ornitz, 2011) Erinevates rakukultuuri katsetes on näidatud RIC8 koondumine migreeruvate rakkude nn *leading-edge* piirkonda, mis vihjab RIC8 olulisusele raku adhesiivsete omaduste tekkes. Heterotrimeersete G-valkude signaalsatsioon, mille võimendamise eest on vastutav ka RIC8, vahendab Rho GTPaaside kaudu rakkude polarisatsiooni, mis võimaldab migreeruvate rakkude *leading-edge* ees kasvatada adhesiivseid omadusi määravaid filopoodide ja lamellipoodide (Fuentealba jt., 2013; Xing jt., 2013; Ruisu jt., 2017) Seega võib RIC8 omada olulist rolli mitte ainult kraniaalse neuraalharja rakkude migratsioonis maksillaarjätke piirkonda, vaid võib olla elutähtis ka teiste rakkude migratsioonil, näiteks palataaljätke kerkimisel ehk valminud suulae rakkude übermigreerumisel eesmärgiga muuta palataaljätke asendit suus. Palataaljätke kerkimisdefekte esines antud töös unilateraalselt E14.5 vanuste *Ric8*^{CKO} embrüotel. Samas arvestades, et enamiku *Ric8*^{CKO} hiirte suulae defekt on pigem kergema loomuga (peamiselt arenguline mahajäämus pesakonnakaaslastest), jõuavad neuraalharja rakud ikkagi tõenäoliselt suulakke, küll aga võib see mõjutada palatogeneesi käigus toimuvat rakkude liikumist ning arvestades palataaljätke kerkimise kiiret iseloomu (0.5 kuni 1 päeva) (Yu ja Ornitz, 2011), võib RIC8 defitsiidi mõju olla kõige tõsisem just selles protsessis.

Suulae arengudefektide põhjuseks *NestinRic8*^{CKO} loomadel võib olla ka suulage moodustavate rakkude proliferatsioonihäired, mis võivad kaasa tuua palataaljätke ebapiisava või asümmeetrilise väljakasvamise. Uuritud E14.5 *Ric8*^{CKO} embrüotest (n=6) esines ühel sümmeetriliselt jaotunud tugev väljakasvu häire (väliselt oli tugevate arenguhäiretega embrüo) ning ühel *Ric8*^{CKO} embrüöl ühepoolne väljakasvu häire, mis võivad olla põhjustatud ebapiisavast või valesti koordineeritud proliferatsioonist. Üheks oluliseks mitoosikävi orientatsiooni ja sümmeetrilise/asümmeetrilise raku jagunemise kujunemist kontrollivaks kompleksiks on loomariigis küllaltki konserveerunud kolmikkompleks NuMa: LGN: Gα_i: GDP, mille aktiveerimisega kontrollib GEF RIC8 mitoosikävi orientatsiooni ja tõmbejõu tugevust. (Tall ja Gilman, 2005) *Ric8* mutantsete *C. elegans*'i embrüote peal on näidatud, et RIC8 vastutab, koostöös eelpool märgitud komikkompleksi valkudega, astraalsete mikrotuubulite piisava tõmbejõu genereerimise ning mitoosikävi orientatsiooni reguleerimise eest. (Ashfar jt., 2004; Couwenbergs jt., 2004; Hess jt., 2004)

Vähendatud RIC8 ekspressiooni korral HeLa rakukultuuris on näidatud rakkude mitootilise aktiivsuse vähenemist, mitoosiareste ning vähenenud käävide liikumist enne mitoosi (Woodard jt., 2010). Madalam mitoosiaktiivsus võib vähendada lõpliku rakkude hulka või tekitada ajalise mahajäämuse RIC8 defitsiidiga palatogeneesis. Arengulist mahajäämust on kirjeldatud ka *Ric8^{-/-}* gastrilatsioonistaadiumis embrüotel (Tõnissoo jt., 2010).

Üheks huvitavaks arengubioloogiliseks leiuks oli E15.5 *Ric8^{CKO}* ning vastsündinud (P0) *Ric8^{CKO}* hiirte suulae piirkonna märkimisväärne erinevus suulae paksuses võrrelduna kontroll-pesakonnakaaslastega, ehkki palataalsed jätked olid õigesse positsiooni migreerunud, adhereerunud ja fuseerunud. E15.5 *NestinRic8^{CKO}* (n=3) kõva suulagi oli keskmiselt 15.9% õhem kui kontrollidel ja P0 vanuseks oli selline anomaalia veelgi süvenenud (ca 30.4% õhem kui kontrollidel). See võib osutada nii proliferatsiooni kui osteogeneesi häiretele hiire suulae moodustumise protsessis.

Palatogeneesi häireid võivad põhjustada probleeme toitumisel ja seetõttu ka kehamassi kasvatamisel, mis inimestel kestavad kuni defekti kõrvaldava operatsioonini (Pandya ja Boorman, 2001). Varasemates *Ric8^{CKO}* hiirte uuringutes on täheldatud *Ric8^{CKO}* võimetust emapiima imeda (maos puudub piim) (Kask jt., 2015). Vastsündinud *Ric8^{CKO}* loomadel on põhjuseks tõenäoliselt pigem tugev neuromuskulaarne defekt (Kask jt., 2015), mis lihaste tööd ja koordinatsiooni raskendab. Samas postmitootiliste neuronite spetsiifilised *Ric8* konditsionaalsed *knockout* loomad (*Synapsin;Ric8^{CKO}*) suudavad esimeste päevade jooksul emapiima imeda, ehkki on samuti tugevate neuromuskulaarsete arenguhäiretega (Ruisu jt., 2013), mis näitab, et neuraalsete eellasrakkude spetsiifilisel *Ric8^{CKO}* loomadel on märksa laiem spektriga anomaalne fenotüüp, mis mõjutab ka esmaset rinnapiima kätte saamist. Kuna aga terve suulaeta ei saa tekkida imemiseks vajaliku vaakumit (Matsuo ja Palmer, 2009), võib toitumishäires olla oma osa ka võimalikel suulae arenguhäiretel.

Kokkuvõtvalt võib öelda, et antud töösse kaasatud kitsas valim embrüonaalset materjali seadis mõningad piirangud tehtavatele üldistustele, küll aga andis positiivseid suuniseid võimalikeks edasisteks töödeks. Edaspidi oleks otstarbekas suurendada valimit, kaasata uuringutesse ka varasemaid vanuseid (alates E8.5), mil hakkab moodustuma neuraalhari. Lisaks peaks iseloomustama ajalis-ruumiliselt detailselt *Ric8* ekspressiooni (nii valgu kui mRNA tasemel) nii kraniaalses neuraalharjas kui selle derivaatides (lisaks suulaele ka nt alalõualuu, hamba odontoblastid, keskkõrva kuulmeluukesed), mis annaks paremaid vihjeid millist piirkonda peaks fookusesse võtma. Teiseks oluliseks muudatuseks võiks olla palatogeneesi uuringuteks sobivama *Ric8* konditsionaalse hiireliini tekitamine/kaasamine. Näiteks kasutada mõnda neuraalharja/kraniaalse neuraalharja/suulae spetsiifilist Cre liini vastavate mudelite loomisel.

KOKKUVÕTE

Hiire palatogenees algab vanuses E11.5 väljakasvu initsiatsiooniga, millele järgneb vertikaalne väljakasv, kerkimine horisontaalasendisse, kokkukasv, adhesioon ja lõppeb fusiooniga, mis toimub vanuses E15.5. Palatogeneesi etappide mitmekülgsuse tõttu on selle käigus võimalusi kõikvõimalike defektide tekkeks. Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida, kas RIC8 mängib rolli imetajate suulae arengus ehk palatogeneesis. Selleks kasutati *NestinCre;Ric8^{lacZ/lox}* hiiremudelit, mille E12.5, E14.5, E15.5 ja P0 vanustest katseloomadest tehti histoloogilised preparaadid ning analüüsiti võimalikke kõrvalekaldeid normaalsest suulae arengust.

Bakalaureusetöös tehti järgmised järeldused:

- E12.5 *Ric8^{CKO}* embrüote suulae arengus märgatavaid arenguanomaaliaid ei tuvastatud.
- E14.5 *Ric8^{CKO}* embrüotel esinevad mitmesugused palataalsed arengudefektid (arenguline mahajäämus, palataalsete väljakasvude osaline/täielik kerkimishäire, adhesioonihäire).
- E15.5 ja P0 *Ric8^{CKO}* hiirtel oli võrreldes kontrollhiirtega märkimisväärselt õhem kõva suulagi.

Impact of neural progenitor specific RIC-8 deficit to the development of hard palate.

Mihkel Veski

Summary

Neural crest is a temporary structure of multipotents cells which exists during embryonic development between epidermis and neural tube. After maturation the neural crest cells migrate around organism and become wide array of derivatives such as muscles of the head, melanocytes, parts of heart, neurons, glia, spinal ganglions and craniofacial bones etc.

Formation of hard palate - an important craniofacial tissue – is often accompanied by problems, such as cleft lip and palate, which is the most common birth defect in western hemisphere, happening with frequency of 1:500 to 1:2500 born infants. Mouse is a good palatogenesis sample organism which palatogenesis starts with initiation in E11.5, continues with outgrowth, elevation, adhesion and ending with fusion in E15.5.

RIC8 a protein conserved in evolution has two important biochemical functions which are it's role as a G-protein chaperon and it's role as a G-protein guanine nucleotide exchange factor (GEF), due to which it boosts signals transducted by $G\alpha$ subunits. Because of these biochemical functions it is responsible for many biological mechanisms such as mitotic spindle control, nervous system developmental control and control of adhesive properties which allow cell migration.

Many current works have unfolded RIC8's role and localisation in migrating cells. As neural crest cells need to migrate in order to reach their functional destination, the aim of this undergraduate thesis is to show the impact of neural progenitor specific RIC8 deficit to the formation of hard palate.

Histological assay of hard palate on NestinCre;Ric8^{lacZ/lox} mice in embryonal ages of E12.5, E14.5, E15.5 and a newborn pup was carried out.

The experiments show that Ric8^{CKO} embryos in E12.5 do not exhibit serious defects in palatogenesis, unlike E14.5 mutants which exhibit variety of defects. These abnormalities are probably caused by inadequate proliferation, which disturbs the outgrowth of palatal shelves and inadequate migration which disturbs the elevation of palatal shelves. It was also shown that E15.5 embryos and P0 pups had a thinner hard palate when compared to their control littermates.

TÄNUSÕNAD

Soovin tänada oma juhendajat Tambet Tõnissood, kes kogu töö protsessi juures kannatlikult aitas, toetas ja nõustas. Eksperimentaalse osa läbiviimise juures oli väga palju abi kogu arengubioloogia labori kollektiivist. Abi eest keelekorrektuuri läbi viimisel soovin tänada õde Liisit.

Lisaks soovin tänada oma vanemaid, kes minu bakalaureuseõpinguid toetasid.

KIRJANDUSE LOETELU

Artiklid:

Afshar, K., Willard, F.S., Colombo, K., Johnston, C.A., McCudden, C.R., Siderovski, D.P., Gönczy, P. (2004). RIC-8 is required for GPR-1/2-dependent Galpha function during asymmetric division of *C. elegans* embryos. *Cell* 119:219–230.

Arosarena, O. A. (2007). Cleft Lip and Palate. *Otolaryngologic Clinics of North America*. 40(1): 27-60.

Baek, J. A., Lan, Y., Liu, H., Maltby, K. M., Mishina, Y., Jiang, R. (2011). *Bmpr1a* signaling plays critical roles in palatal shelf growth and palatal bone formation. *Dev. Biol.* 350, 520-531.

Bhatt, S., Diaz, R., Trainor, P. A. (2013). Signals and Switches in Mammalian Neural Crest Cell Differentiation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(2).

Bronner, M. E. (2012). Formation and migration of neural crest cells in the vertebrate embryo. *Histochem Cell.* 138(2): 179–186.

Bush, J. O., Jiang, R. (2012). Palatogenesis: morphogenetic and molecular mechanisms of secondary palate development. *Development.* 139(2): 231–243.

Carmona-Fontaine, C., Matthews, H.K., Kuriyama, S., Moreno, M., Dunn, GA., Parsons, M., Stern, C., Mayor, R. (2008). Contact inhibition of locomotion in vivo controls neural crest directional migration. *Nature.* 456: 957–961.

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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 110(10): 3794–3799.

Christensen, K., Juel, K., Herskind, A. M., Murray, J. C. (2004). Long term follow up study of survival associated with cleft lip and palate at birth. *British Medical Journal*, 328(7453): 1405.

Clouthier, D. E., Hosoda, K., Richardson, J. A., ...Yanagisawa, H. (1998). Cranial and cardiac neural crest defects in endothelin-A receptor-deficient mice. *Development.* 125: 813–824.

- Cordero, D. R., Brugmann, S., Chu, Y., Bajpai, R., Jame, M., Helms, J. A. (2011). CRANIAL NEURAL CREST CELLS ON THE MOVE: THEIR ROLES IN CRANIOFACIAL DEVELOPMENT. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 155(2), 270–279.
- Couly G, Le Douarin N. (1987). Mapping of the early neural primordium in quail-chick chimeras. II. The prosencephalic neural plate and neural folds: implications for the genesis of cephalic human congenital abnormalities. *Dev Biol.* 120:198–214.
- Couly, G., Grapin-Botton, A., Coltey, P. and le Douarin, N. M. (1996). The regeneration of the cephalic neural crest, a problem revisited: The regenerating cells originate from the contralateral or from the anterior and posterior neural fold. *Development* 122, 3393-3407.
- Couwenbergs, C., Spilker, A. C., Gotta, M. (2004). Control of embryonic spindle positioning and Galpha activity by *C. elegans* RIC-8. *Curr Biol.*14(20):1871-1876.
- Creuzet, S., Couly, G., Vincent, C., Le Douarin, N. M. (2002). Negative effect of Hox gene expression on the development of the neural crest-derived facial skeleton. *Development* 129: 4301-4313.
- David, N.B., Martin, C.A., Segalen, M., Rosenfeld, F., Schweisguth, F., Bellaïche, Y. (2005). *Drosophila* Ric-8 regulates Galphai cortical localization to promote Galphai-dependent planar orientation of the mitotic spindle during asymmetric cell division. *Nat Cell Biol* 7:1083–1090.
- Depew, M. J., Simpson, C. A. (2006), 21st Century neontology and the comparative development of the vertebrate skull. *Dev. Dyn.*, 235: 1256–1291.
- Dettlaff-Swiercz, D.A., Wettschureck, N., Moers, A., Huber, K., Offermanns, S. (2005). Characteristic defects in neural crest cell-specific Galphaq/Galphi1- and Galphi2/Galphi3-deficient mice. *Dev Biol.* 282: 174–182.
- Dixon, M. J., Marazita, M. L., Beaty, T. H., Murray, J.C. (2011) Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. *Nature Reviews Genetics* 12: 167–178.
- Fuentealba, J., Toro-Tapia, G., Arriagada, C., ...Torrejón, M. (2013). Ric-8A, a guanine nucleotide exchange factor for heterotrimeric G proteins, is critical for cranial neural crest cell migration. *Dev. Biol.* 378(2):74-82.

- Funato, N., Nakamura, M., Yanagisawa, H. (2015). Molecular basis of cleft palates in mice. *World Journal of Biological Chemistry*, 6(3), 121–138.
- Gabay, M., Pinter, M. E., Wright, F., ... Tall, G. G. (2011). Ric-8 Proteins Are Molecular Chaperones That Direct Nascent G Protein α Subunit Membrane Association. *Science Signaling*, 4(200).
- Gong, H., Shen, B., Flevaris, P., Chow, C., Lam, S. C.-T., Voyno-Yasenetskaya, T. A., T. Kozasa, T., Du, X. (2010). G protein subunit Galpha13 binds to integrin alphaIIbeta3 and mediates integrin “outside-in” signaling. *Science*. 327: 340-343.
- Hampoelz B., Hoeller O., Bowman S. K., Dunican D., Knoblich J. A. (2005). Drosophila Ric-8 is essential for plasmamembrane localization of heterotrimeric G proteins. *Nat Cell Biol*. 7: 1099–1105.
- Harville, E. W., Wilcox, A. J., Lie, R. T., Vindenes, H., Åbyholm, F. (2005). Cleft Lip and Palate versus Cleft Lip Only: Are They Distinct Defects?, *American Journal of Epidemiology*. 162(5): 448–453.
- Henion, P. D. and Weston, J. A. (1997). Timing and pattern of cell fate restrictions in the neural crest lineage. *Development* 124, 4351 -4359.
- Hess, H. A., Röper, J.-S., Grill, S.W., Koelle, M.R. (2004). RGS-7 Completes a Receptor-Independent Heterotrimeric G Protein Cycle to Asymmetrically Regulate Mitotic Spindle Positioning in *C. Elegans*. *Cell*. 119: 209–218.
- Ito Y., Yeo J. Y., Chytil A., Han J., Bringas P., Jr, Nakajima A., Shuler C. F., Moses H. L., Chai Y. (2003). Conditional inactivation of *Tgfb β 2* in cranial neural crest causes cleft palate and calvaria defects. *Development*. 130: 5269-5280.
- Jiang, X., Iseki, S., Maxson, R. E., Sucov, H. M., Morriss-Kay, G. M. (2002). Tissue Origins and Interactions in the Mammalian Skull Vault. *Developmental Biology* 241 (1): 106-116.
- Kalluri, R., Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Clinical Investigation*. 119(6): 1420–1428.
- 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. *Devel. Neurobio*. 75: 984–1002.

- Kask, K. , Tikker, L. , Ruisu, K. , Lulla, S. , Oja, E. , Meier, R. , Raid, R. , Velling, T. , Tõnissoo, T., Pooga, M. (2018). Targeted deletion of RIC8A in mouse neural precursor cells interferes with the development of the brain, eyes, and muscles. *Devel Neurobio.* 78: 374-390.
- Katzel, E. B., Basile, P., Koltz, P. F., J. Marcus, J. R., Giroto, J. A. (2009). Current surgical practices in cleft care: cleft palate repair techniques and postoperative care. *Plastic and Reconstructive Surgery*, vol. 124(3): 899–900.
- Kroeze, W. K., Sheffler, D. J., Roth, B. L. (2003) G-protein-coupled receptors at a glance. *Journal of Cell Science.* 116: 4867-4869.
- Kurihara, Y., Kurihara, H., Suzuki, H., ...Maemura. K. (1994). Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1. *Nature* 368: 703–710.
- Lan Y., Ovitt C. E., Cho E. S., Maltby K. M., Wang Q., Jiang R. (2004). Odd-skipped related 2 (*Osr2*) encodes a key intrinsic regulator of secondary palate growth and morphogenesis. *Development.* 131:3207-3216.
- Lan, Y., Jiang, R. (2009). Sonic hedgehog signaling regulates reciprocal epithelial-mesenchymal interactions controlling palatal growth. *Development.* 136(8): 1387-96.
- Le Douarin, N.M. (2004). The avian embryo as a model to study the development of the neural crest: a long and still ongoing story. *Mechanisms of Development.* 121 (9):1089-1102.
- Lee, S. , Bedard, O. , Buchtova, M. , Fub, K. , Richman, J. M. (2004). A new origin for the maxillary jaw. *Developmental Biology.* 276: 207 – 224.
- Lei, R., Zhang, K., Wei, Y., ..., Li, H. (2016). G-Protein α -Subunit $G\alpha$ Is Required for Craniofacial Morphogenesis. *PLoS ONE*, 11(2).
- Li, L., Lin, M., Wang, Y., Cserjesi, P., Chen, Z., Chen, Y. (2011). *Bmpr1a* is required in mesenchymal tissue and has limited redundant function with *Bmpr1b* in tooth and palate development. *Developmental Biology.* 349:451-461.
- Liu, W., Sun, X., Braut, A., Mishina, Y., Behringer, R. R., Mina, M., Martin, J. F. (2005). Distinct functions for Bmp signaling in lip and palate fusion in mice. *Development.* 132: 1453-1461.

- Louis, M., Dickey, R. M., Hollier jr., L. H. (2018). Smile Train: Making the Grade in Global Cleft Care. *Craniofacial Trauma Reconstr.* 11(1):1-5.
- Lumsden, A., Keynes, R. (1989). Segmental patterns of neuronal development in the chick hindbrain. *Nature* 337: 424-428.
- Luo, R., Gao, J., Wehrle-Haller, B., Henion, P. D. (2003). Molecular identification of distinct neurogenic and melanogenic neural crest sublineages. *Development* 2003 130: 321-330.
- 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: 14979-14993.
- Ma, S., Santhosh, D., Peeyush Kumar, T., Huang, Z. (2017). A brain region-specific neural pathway regulating germinal matrix angiogenesis. *Developmental Cell.* 41(4): 366–381.
- Matsuo, K., Palmer, J. B. (2009). Coordination of Mastication, Swallowing and Breathing. *The Japanese Dental Science Review*, 45(1), 31–40.
- Mendoza de, A., Sebé-Pedrós, A., Ruiz-Trillo, I. (2014). The Evolution of the GPCR Signaling System in Eukaryotes: Modularity, Conservation, and the Transition to Metazoan Multicellularity. *Genome Biology and Evolution*, 6(3), 606–619.
- Milet, C., Monsoro-Burq, A. H. (2012). Neural crest induction at the neural plate border in vertebrates. *Developmental Biology.* 366 (1): 22-33.
- Miller, K. G., Alfonso, A., Nguyen, M., Crowell, J. A., Johnson, C. D., Rand, J. B. (1996). A genetic selection for *Caenorhabditis elegans* synaptic transmission mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 93(22):12593–12598.
- Miller, K. G., Emerson, M. D., McManus, J. R., Rand, J. B. (2000). RIC-8 (Synembryn): A Novel Conserved Protein that Is Required for Gq α Signaling in the *C. elegans* Nervous System. *Neuron*, 27(2): 289–299.
- Miller, K. G., Rand, J. B. (2000). A role for RIC-8 (Synembryn) and GOA-1 (G(o)alpha) in regulating a subset of centrosome movements during early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* 156(4): 1649–1660.

- Minoux, M., Rijli, F. M. (2010) Molecular mechanisms of cranial neural crest cell migration and patterning in craniofacial development. *Development* 137: 2605-2621.
- Morrison, S.J., White, P. M., Zock, C., Anderson, D. J. (1999). Prospective Identification, Isolation by Flow Cytometry, and In Vivo Self-Renewal of Multipotent Mammalian Neural Crest Stem Cells. *Cell*. 96(5): 737-749.
- Mossey, P., Little, J., Munger, R. G., Dixon, M. J., Shaw, W. C. (2009). Cleft lip and palate. *Lancet*. 374: 1773–1785.
- Nichols, D.H. 1987. Ultrastructure of neural crest formation in the midbrain/rostral hindbrain and preotic hindbrain regions of the mouse embryo. *Am. J. Anat.* 179: 143–154
- Ono, T., Hori, K., Nokubi, T. (2004). Pattern of tongue pressure on hard palate during swallowing. *Dysphagia*. 19(4): 259-64.
- Osumi- Yamashita, N. , Ninomiya, Y. , Doi, H. and Eto, K. (1996). Rhombomere formation and hind- brain crest cell migration from prorrhombomeric origins in mouse embryos. *Development, Growth & Differentiation*, 38: 107-118.
- Pandya A. N., Boorman, J. G. (2001). Failure to thrive in babies with cleft lip and palate. *British Journal of Plastic Surgery*. 54 (6): 471-475.
- Papasergi, M. M., Patel, B. R., Tall, G. G. (2015). The G Protein α Chaperone Ric-8 as a Potential Therapeutic Target. *Molecular Pharmacology*. 87(1): 52–63.
- Perko, M. (1986). The history of treatment of cleft lip and palate. *Prog Pediatr Surg*. 20:238-51.
- Reynolds, N.K., Schade, M.A. , Miller, K.G. (2005). Convergent, RIC-8-dependent Galpha signaling pathways in the *Caenorhabditis elegans* synaptic signaling network. *Genetics*. 169: 651–670.
- Rice, R., Connor, E., Rice, D.P.C.(2006). Expression patterns of Hedgehog signalling pathway members during mouse palate development. *Gene Expression Patterns*. 6(2): 206-212.

- Rice, R., Spencer-Dene, B., Connor, E. C., Gritli-Linde, A., McMahon, A. P., Dickson, C., Thesleff, I., Rice, D. P. (2004). Disruption of Fgf10/Fgfr2b coordinated epithelial-mesenchymal interactions causes cleft palate. *J. Clin. Invest.* 113, 1692-1700.
- Ridley, A. J., Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*, 70: 389-399.
- Riley, B. M., Mansilla, M. A., Ma, J., Daack-Hirsch, S., Maher, B. S., Raffensperger, L. M., Murray, J. C. (2007). Impaired FGF signaling contributes to cleft lip and palate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(11), 4512–4517.
- Ruisu, K., Kask, K., Meier, R., Saare, M., Raid, R., Veraksitš, A., Karis, A., Tõnissoo, T., Pooga, M. (2013). Ablation of RIC8 function in mouse neurons leads to a severe neuromuscular phenotype and postnatal death. *PLoS ONE*. 8 (8).
- Ruisu, K., Meier, R., Kask, K., Tõnissoo, T., Velling, T., Pooga, M. (2017). RIC8A is essential for the organisation of actin cytoskeleton and cell-matrix interaction. *Experimental Cell Research*. 357(2):181-191.
- Schade, M. A., Reynolds, N. K., Dollins, C. M., Miller, K.G. (2005). Mutations That Rescue the Paralysis of *Caenorhabditis elegans ric-8* (Synembryn) Mutants Activate the $G\alpha_s$ Pathway and Define a Third Major Branch of the Synaptic Signaling Network. *Genetics*. 169(2): 631-649.
- Sela-Donenfeld, D., Kalcheim, C. (2000). Inhibition of noggin expression in the dorsal neural tube by somitogenesis: a mechanism for coordinating the timing of neural crest emigration. *Development* 127: 4845–4854.
- Serbedzija G, Fraser S, Bronner-Fraser M. (1992). Vital dye analysis of cranial neural crest cell migration in the mouse embryo. *Development*. 116:297–307.
- Shaikh, D., Mercer, N. S., Sohan, K., Kyle, P., Soothill, P. (2001). Prenatal diagnosis of cleft lip and palate. *British Journal of Plastic Surgery*. 54(4):288-289.
- Siderovski, D. P., Willard, F. S. (2005). The GAPs, GEFs, and GDIs of heterotrimeric G-protein alpha subunits. *International Journal of Biological Sciences*. 1(2): 51–66.
- Snyder-Warwick, A. K., Perlyn, C. A., Pan, J., Yu, K., Zhang, L., Ornitz, D. M. (2010). Analysis of a gain-of-function FGFR2 Crouzon mutation provides evidence of loss of

function activity in the etiology of cleft palate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107(6): 2515–2520.

Soriano, P. (1999). Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nature Genetics*. 21: 70–71

Zambrowicz, B. P., Imamoto, A., Fiering, S., Herzenberg, L. A., Kerr, W. G., Soriano, P. (1997). Disruption of overlapping transcripts in the ROSA β geo 26 gene trap strain leads to widespread expression of β -galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94(8): 3789–3794.

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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102(46): 16584–16589.

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: 8356-8362.

Taya, Y., O’Kane, S., Ferguson, M. W. J. (1999). Pathogenesis of cleft palate in TGF β 3 knockout mice. *Development* 126: 3869-3879.

Theveneau, E., Marchant, L., Kuriyama, S., Gull, M., Moepps, B., Parsons, M., Mayor, R. (2010). Collective chemotaxis requires contact-dependent cell polarity. *Dev. Cell*. 19: 39–53.

Trainor, P. A., Sobieszczuk, D., Wilkinson, D., Krumlauf, R. (2002). Signalling between the hindbrain and paraxial tissues dictates neural crest migration pathways. *Development* 129: 433-442.

Trainor, P. A., Tam, P. P. (1995) Cranial paraxial mesoderm and neural crest cells of the mouse embryo: co-distribution in the craniofacial mesenchyme but distinct segregation in branchial arches. *Development* 1995 121: 2569-2582.

Tronche, F., Kellendonk, C., Kretz, O., Gass, P., Anlag, K., Orban, P. C., Bock, R., Klein, Schütz, R. G. (1999). Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nat. Genet.*, 23: 99-103

Tudela, C., Formoso, M-A., Martines T. ,Perez, T., Aparicio, M., Maestro, C.,Del Rio, A., Martinez, E., Ferguson, M., and Martinez-Alvarez, C. (2002). TGF- β 3 is required for the adhesion and intercalation of medial edge epithelial cells during palate fusion. *Int. J. Dev. Biol.* 46: 333-336.

Turner, S. R., Thomas, P. W. N., Dowell, T., Rumsey, N., Sandy, J. R. (1997). Psychological outcomes amongst cleft patients and their families. *British Journal of Plastic Surgery.* 50 (1): 1-9.

Tõnissoo, T., Meier R., Talts, K., Plaas, M., Karis, A. (2003). Expression of ric-8 (synembryn) gene in the nervous system of developing and adult mouse. *Gene Expression Patterns.* 3(5): 591-594.

Tõnissoo, T., Kõks, S., Meier, R., Raud, S., Plaas, M., Vasar, E., Karis, A. (2006). Heterozygous mice with Ric-8 mutation exhibit impaired spatial memory and decreased anxiety. *Behavioural Brain Research.* 167(1): 42-48.

Tõnissoo, T. , Lulla, S. , Meier, R. , Saare, M. , Ruisu, K. , Pooga, M., Karis, A. (2010). Nucleotide exchange factor RIC-8 is indispensable in mammalian early development. *Dev. Dyn.* 239: 3404-3415.

Wang, H., Ng, K.H., Qian, H., Siderovski, D.P., Chia, W., Yu, F. (2005). Ric-8 controls *Drosophila* neural progenitor asymmetric division by regulating heterotrimeric G proteins. *Nat Cell Biol* 7:1091–1098.

Wehby, G., Cassell, C. H. (2010). The Impact of Orofacial Clefts on Quality of Life and Health Care Use and Costs. *Oral Diseases*, 16(1): 3–10.

Willadsen, E., Boers, M., Schöps, A., Kisling-Møller, M., Nielsen, J. B., Jørgensen, L. D., Andersen, M., Bolund, S. and Andersen, H. S. (2018). Influence of timing of delayed hard palate closure on articulation skills in 3-year-old Danish children with unilateral cleft lip and palate. *International Journal of Language & Communication Disorders*, 53: 130–143.

Woodard, G. E., Huang, N.-N., Cho, H., Miki, T., Tall, G. G., Kehrl, J. H. (2010). Ric-8A and $G_{i\alpha}$ Recruit LGN, NuMA, and Dynein to the Cell Cortex To Help Orient the Mitotic Spindle . *Molecular and Cellular Biology.* 30(14): 3519–3530.

Xing, B., Wang, L., Guo, D., ... Huang, X.-Y. (2013). Atypical Protein Kinase C λ Is Critical for Growth Factor Receptor-induced Dorsal Ruffle Turnover and Cell Migration. *The Journal of Biological Chemistry*. 288(46), 32827–32836.

Yanagisawa, H., Yanagisawa, M., Kapur, R. P., ..., Williams, S.C. (1998). Dual genetic pathways of endothelin-mediated intercellular signaling revealed by targeted disruption of endothelin converting enzyme-1 gene. *Development*. 125: 825–836.

Ybot-Gonzalez, P., Cogram, P., Gerrelli, D., Copp A. J. (2002). Sonic hedgehog and the molecular regulation of mouse neural tube closure. *Development* 2002 129: 2507-2517.

Yu, K., Ornitz, D. M. (2011). Histomorphological study of palatal shelf elevation during murine secondary palate formation. *Developmental Dynamics*, 240(7): 1737–1744.

Raamatud:

Duband, J. L. 2006. Neural Crest Delamination and Migration. In: Saint-Jeannet JP. (eds) Neural Crest Induction and Differentiation. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 589. Springer, Boston, MA

Gilbert, S. F. 2006. *Developmental biology*, p. 407-409. 8th ed, Sinauer Associates, Inc, Publishers Sunderland, Massachusetts.

Lowe, J.S., Anderson, P. G. 2015. *Stevens & Lowe's Human Histology (4th Edition)*., p. 37–54. Mosby, Maryland Heights, Missouri.

Nackashi, J.A., Dedlow Rosellen, E., Dixon-Wood, V. 2002. Health care for children with cleft lip and palate: comprehensive services and infant feeding. In: Wyszynski, DF., editor. *Cleft Lip and Palate from Origin to Treatment*. New York: Oxford University Press. 127-158

Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D. (2001). *Neuroscience*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; *G-Proteins and Their Molecular Targets*.

Tepper, O. M., Warren, S. M. 2010. *Plastic Surgery Secrets Plus (2nd Edition)*. p. 139-145. Mosby, Maryland Heights, Missouri.

Young, H. M., Anderson, R.B., Newgreen, D.F. 2009. *Encyclopedia of Neuroscience*. p. 123-133. Springer, Berlin, Heidelberg.

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Mihkel Veski (sünnikuupäev: 20. aprill 1994),

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

Neuraalsete eellasrakkude spetsiifilise RIC-8 defitsiidi mõju hiire kõva suulae arengule

mille juhendaja on 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 **25.05.2018** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

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

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

Tartus, 25.05.2018