TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

ARENGUBIOLOOGIA ÕPPETOOL

Toomas Jagomäe

Gata3 reguleerib koduhiire (Mus musculus) südame arteriaalse pooluse arengut

Magistritöö

Juhendajad dotsent Raivo Raid

M.Sc. Kaire Tsaro

TARTU 2015

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID 3
SISSEJUHATUS 5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE 6
1.1. Kardiogeense mesodermi kujunemine 6
1.2. Esimene ja teine südameväli 7
1.3. Gata perekonna transkriptsioonifaktorid 11
1.3.1. Transkriptsioonifaktor Gata3 12
2. EKSPERIMENTAALNE OSA 14
2.1. Eksperimentaalse töö eesmärgid 14
2.2. Materjal ja metoodika 14
2.2.1. Kasutatud hiireliin 14
2.2.2. Genotüpiseerimine 14
2.2.3. *lacZ* värvusreaktsioon β-galaktosidaasi ilmestamiseks 15
2.2.4. Immunohistokeemia 15
2.2.5. RNA eraldamine ja kvantitatiivne reaalaja PCR 16
2.2.6. *In situ* hübridisatsioon 17
2.2.7. Mikroskoopia, pildi- ja andmetöötlus 18
3. TULEMUSED 20
3.1. *Gata3* on ekspresseerunud südant moodustavas piirkonnas 20
3.2. Gata3 ja AP-2α koekspressioon 22
3.3. TF AP-2α on *Gata3*^{KO} embrüote VVK endokardiaalse padjandi rakkudes alla reguleeritud 23
3.4. AP-2α^{+} rakkude proliferatsioon on *Gata3*^{KO} embrüotes vähenenud 24
3.5. In situ hübridisatsioon *Fgf8* ja *Isl1* proovidega 25
3.6. SSV markergeenide kvantitatiivsed muutused *Gata3*^{KO} embrüotes 26
4. ARUTELU 27
KOKKUVÕTE 31
SUMMARY 32
TÄNUSÕNAD 33
KASUTATUD KIRJANDUS 34
Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks 43

KASUTATUD LÜHENDID

AP-2α - *Activating enhancer-bindign protein 2α*, transkriptsioonifaktor

ASD - *atrial septal defect*, kodadevahelise seina defekt

Baf60c - *BRG1-associated factor 60C*, kromatiini modifitseeriv valk

BAV - *bicuspid aortic valve*, bikuspidaalne aordiklapp

Bmp - *Bone morphogenic protein*, luu morfogeneetiline valk

cdk4 - *cyclin dependent kinase 4*

DORV - *double outlet from right ventricle*, topelt väljavool paremast vatsakesest

E(6.5) - (6.5) embrüonaalne päev

EMT - epiteliaal-mesenhümaalne transitsioon

Fgf - *Fibroblast growth factor*, fibroblasti kasvufaktor

Gata(4) - *GATA binding protein (4)*, Zn-sõrm perekonna transkriptsioonifaktor

Hand1/2 - *Heart and neural crest derivatives expressed 1/2*, bHLH perekonna TF

Hcn4 - *hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 4*, kaltsiumi kanali valk

Hprt - *hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*, Hprt hüpoksantiin-guaniin fosforibosüültransferaasi

IAA - *interrupted aortic arch*

Isl1 - *ISL LIM homeobox 1*, homeodomeeni sisaldav transkriptsioonifaktor

Mef2c - *Myocyte enhancer factor 2c*, MADS box transkriptsioonifaktor

Mesp1/2 - *Mesoderm posterior 1/2*, bHLH perekonna transkriptsioonifaktorid

miRNA - *micro RNA*

Msx1/2 - *Muscle-segment homeobox 1/2*, homeodomeeni sisaldav TF

NH - neuraalhari

Nkx2.5 - *NK2 homeobox 5*, homeodomeeni sisaldav transkriptsioonifaktor

nls - *nuclear localisation signal/sequence*, tuumalokalisatsiooni signaal

PFA - paraformaldehüüd

pHH3	- *phospho-histone H3*, fosfo-histoon H3
PTA	- *persistent truncus arteriosus*, püsiv aorditüvi
qRT-PCR	- *quantitative real-time PCR*, kvantitatiivne reaalaja PCR
Sema3C	- *Semaphorin 3C*
Shh	- *Sonic hedgehog*
SSV	- sekundaarne südameväli
Tbx(5)	- *T-box (5)*, T-box järjestust seondav transkriptsioonifaktor
TF	- transkriptsioonifaktor
Tgf-β	- *Transforming growth factor β*, transformeeriv kasvufaktor β
TOF	- *Tetralogy of Fallo*t, kaasasündinud südamedefekt
VVK	- väljavoolukulgla
Wnt	- *Wingless Int*
X-gal	- 5-bromo-4-kloro-3-indolüül-β-D-galaktopüranosiid
β-gal	- β-galaktosidaas

SISSEJUHATUS

Südame morfogenees on kompleksne protsess, mis hõlmab mesodermi ja ekto-mesenhümaalsete rakkude spetsifikatsiooni, proliferatsiooni ja diferentseerumist erinevateks rakutüüpideks. Südametoru lingustumisel migreeruvad eellasrakud embrüonaalsesse südamesse ning diferentseerudes moodustuvad peamise osa aordi, kopsuarteri ja vasaku vatsakese rakkudest. Kaasasündinud südamedefektid on põhjustatud nii kardiaalsete kui ka ekstrakardiaalsete rakkude transkriptsiooni- ja signalisatsioonivõrgustiku häiretest. Sellest tulenevalt võimaldab võrgustike selgitamine mõista südamedefektide tekkepõhjusi ning kavandada geeni- ja rakuteraapiat.

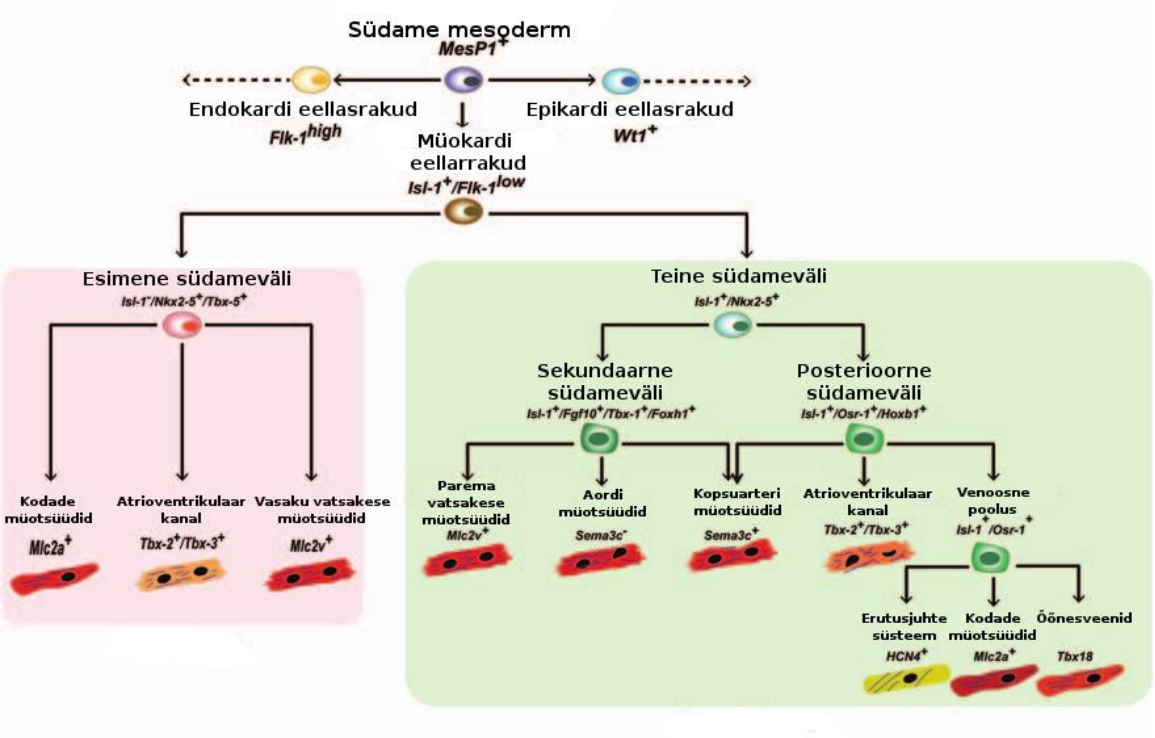
Gata3'e suhtes null-mutantsetel hiirtel (*Mus musculus*) esinevad mitmed südame arengudefektid: vatsakeste vaheseina defekt, persistentne aorditüvi ja topelt väljavool paremast vatsakesest. Nende väärarengute põhjuseks arvatakse olevat väljavoolukulgla hüpoplaasia ning häired südame lingustumisel. Lisaks on transkriptsioonifaktor Gata3 oluline regulaator sisekõrva, neerude, närvisüsteemi, neerupealiste, kilpnäärme ja tüümuse arengus. Inimsestel põhjustab GATA3'e haplopuudulikkus sensorineuraalset kurtust, neeru arenguhäireid, hüpoparatüreoidismi ning mõningatel juhtudel ka vatsakeste vaheseina defekte.

Käesolevas magistritöös analüüsitakse *Gata3-nls-lacZ* ajalis-ruumilist ekspressiooni südame varases arengus südametoru moodustumisel. Edasi näidatakse transgeeni kolokatsiooni migreeruvates südame neuraalharja markeritega rakkudes, mis osalevad aordi, kopsutüve ja aordikaare arterite morfogeneesil. Analüüsitakse *Gata3*^{KO} embrüotes neuraalharja rakkudega toimunud muutusi ning kirjeldatakse *in situ* hübridisatsiooni ja qRT-PCR abil ekstrakardiaalsete rakkude migratsiooni, proliferatsiooni ja diferentseerumisel osalevate faktorite ekspressiooni muutusi *Gata3*^{KO} embrüotes.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

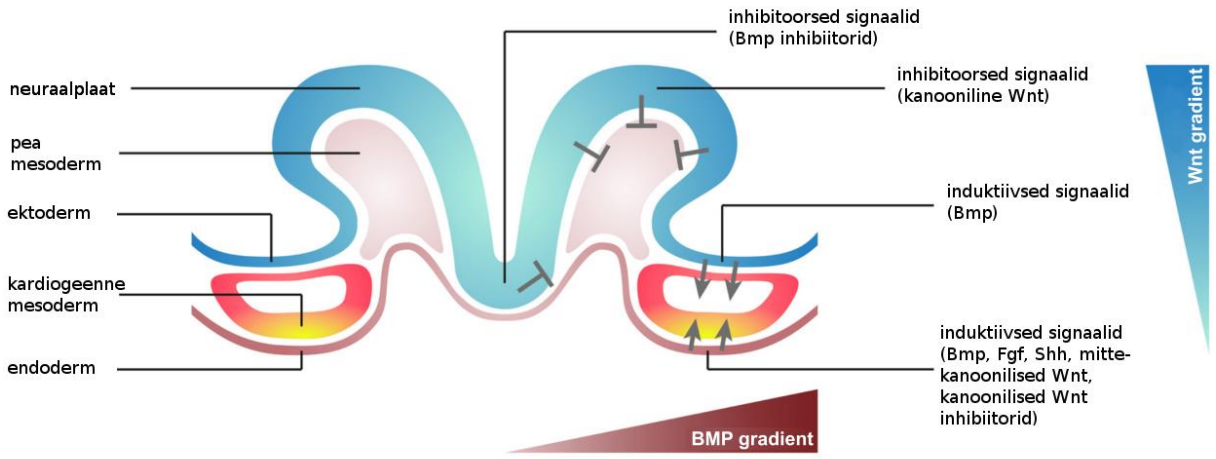
1.1. Kardiogeense mesodermi kujunemine

Kardiogeensed eellasrakud migreeruvad gastrulatsiooni käigus (6.5 embrüonaalsel päeval, E6.5) läbi ürgjuti lateraalplaadi mesodermi, mis lõhenemisel moodustadab splanhnilise ja somaatilise lestme (Saga jt, 1996; Saga jt, 1999). Peamisteks markeriteks, mis tähistavad läbi ürgjuti migreeruvaid presumtiivse südame mesodermi rakke on bHLH (*basic Helix Loop Helix*) perekonda kuuluvad Mesp1 ja Mesp2 (*Mesoderm posterior 1/2*) transkriptsioonifaktorid (TF'id) (Bondue ja Blanpain, 2010; Kitajima jt, 2000). *Mesp1/2 knock-out* hiirtes pole südame mesodermi rakud võimelised migreeruma ja südame mesodermi ei moodustu (Kitajima jt, 2000). Bondue jt (2008) näitasid, et Mesp1 aktiveerib otseselt südame mesodermi arengul keskseid kardiogeense välja markerfaktoreid *Nkx2.5*, *Gata4/6* ja *Tbx3* ning inhibeerib pluripotentsuse säilumisel osalevate faktorite ekspressiooni. Eellasrakkude migratsiooni juhivad lisaks Mesp1/2 TF'idele ka Fgf8 (*Fibroblast growth factor 8*), kanoonilised ja mitte-kanoonilised Wnt signaalid (Ciruna ja Rossant, 2001; Yue jt, 2008). Migratsiooni järgselt reguleeritakse Mesp1/2 TF'ide ekspressioon lateraalplaadis alla ning südame mesoderm on erinevate TF'ide ja signaalimolekulide ekspressiooni järgi lahknenud mitmeks eellasrakkude populatsiooniks (Joonis 1) (Cai jt, 2003; Ilagan jt, 2006; Später jt, 2013; Watanabe jt, 2010).



Joonis 1. Südame eellasrakkude populatsioonid ja neid kirjeldavad markerid. (Van Vliet jt, 2012 järgi).

Kuigi embrüonaalsetes tüvirakkudes on Mesp1/2 signalisatsioon piisav mesodermaalsete eellasrakkude diferentseerumiseks epi-, endo- ja müokardiaalseteks rakutüüpideks, on *in vivo* südame areng kontrollitud ka ümbritsevatest kudedest pärinevate signaalide poolt (Bondue jt, 2008). Edasine mesodermi diferentseerumine indutseeritakse piirkonnas kus on madal Wnt, Shh (*Sonic hedgehog*) ja kõrge Fgf ning Bmp (*Bone morphogenetic protein*) signaalide tase (Joonis 2) (Van Vliet jt, 2012). Ka ekto- ja endodermist pärinevad induktiivsed Fgf2/4/8, Shh, mitte-kanoonilised Wnt ja Bmp signaalid ning kanooniliste Wnt signaalide antagonistid (Joonis 2) mõjutavad kardiogeensete rakkude varajast arengut. Somaatilisest mesodermist, neuraalplaadist ning seljakeelikust pärinevad kanoonilised Wnt signaalid ning Bmp antagonistid aga omavad inhibeerivad mõju südame edasisele diferentseerumisele (Joonis 2) (Brand, 2003; Evans jt, 2010; Tirosh-Finkel jt, 2010; Zaffran ja Kelly, 2012).



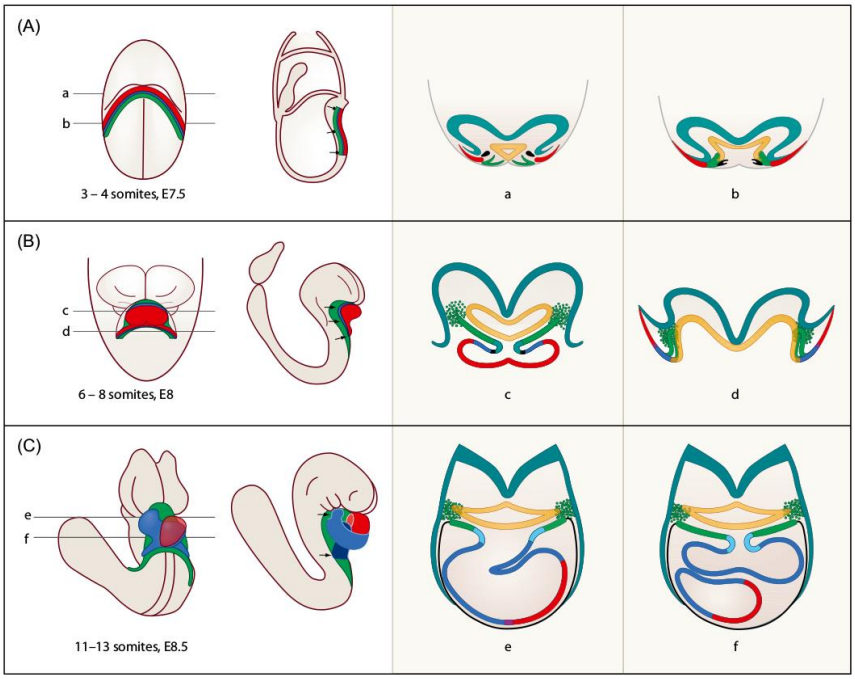
Joonis 2. Kardiogeense mesodermi kujunemisel osalevad signaalid. Joonisel on kujutatud embrüo ristlõik, millel on näidatud induktiivsed (nooled) ja inhibitoorsed (tähistatud T-ga) signaalid, mis osalevad kardiogeense mesodermi kujunemisel (tähistatud kollaselt) (Cyganek jt, 2013 järgi).

1.2. Esimene ja teine südameväli

E7.5 on bilateraalselt paiknev esimene südameväli defineeritud Gata4 (*GATA binding protein 4*), Tbx5 (*T-box 5*) TF'ide ja kromatiini modifitseerivate valkude Baf60c (*BRG1-associated factor 60C*) ekspressiooni kaudu (Bruneau jt, 2013; Evans jt, 2010; McCulley ja Black, 2012). Edasi moodustavad esimese südamevälja rakud saarekesi, milledes ekspresseeritakse keskseid TF'e Nkx2.5 (*NK2 homeobox 5*), Hand1 (*Heart and neural crest derivatives expressed 1*) ning südamelihase spetsiifilisi valke kodeerivaid geene nt *Hcn4* (*hyperpolarization activated cyclic*

nucleotide-gated potassium channel 4), *cardiac actin* ja *myosin light chain 2a* (Bruneau jt, 2001; Dodou jt, 2004; McCulley ja Black, 2012; Später jt, 2013; Zhang jt, 2014). Arengu kulgedes saarekesed liituvad ning moodustavad eraldatud endokardiaalsed väädid (*cardiogenic cords*), mis E8 ventraalse voltumise käigus ühinevad (Buckingham jt, 2005). Siiani paralleelselt arenenud veresoonkond (lõpusekaare arterid ja rebu-veenid) liitub südametoru arteriaalse ja venoosse poolusega ning algab ühtne embrüonaalne vereringe. Südametoru vooderdab seest endokard ja katab müoepikardiaalne mantel (Buckingham jt, 2005). Müoepikardi poolt toodetud ekstratsellulaarsesse maatriksisse e südame tarrendisse migreeruvad hiljem epiteliaal-mesenhümaalse transitsiooni läbinud endokardi ja ektomesenhümaalset päritolu neuraalharja rakud (Phillips jt, 2013). Esimesest südamevälja Tbx5 ja Nkx2.5 positiivsetest rakkudest moodustub enamus vasaku vatsakese ja kodade müokardist (Van Vliet jt, 2012).

Teine eellasrakkude populatsioon, mis paikneb südamesirbi suhtes dorso-mediaalselt, on kirjeldatud Isl1 (*ISL LIM homeobox 1*), Mef2c (*Myocyte enhancer factor 2c*), Tbx1, Nkx2.5 ja Gata4 TF'ide ekspressiooniga (Joonis 3) (Cai jt, 2003; Prall jt, 2007; Zhang jt, 2014). Neist moodustuvad väljavoolukulgla (VVK), parema vatsakese ja osa kodade müokardist (Cai jt, 2003). VVK'st moodustuva aordi ja kopsutüve proksimaalse osa lihaskest pärineb teise südamevälja rakkude alam-populatsioonist, mida nimetatakse sekundaarseks või anterioorseks südameväljaks (Waldo jt, 2001).



Joonis 3. Esimene ja teine südameväli. **(A)** Südamesirbi staadiumis E7.5 paiknevad teise südamevälja rakud (roheline) diferentseerunud esimese südamevälja rakkude (punane) suhtes mediaalselt moodustades pideva

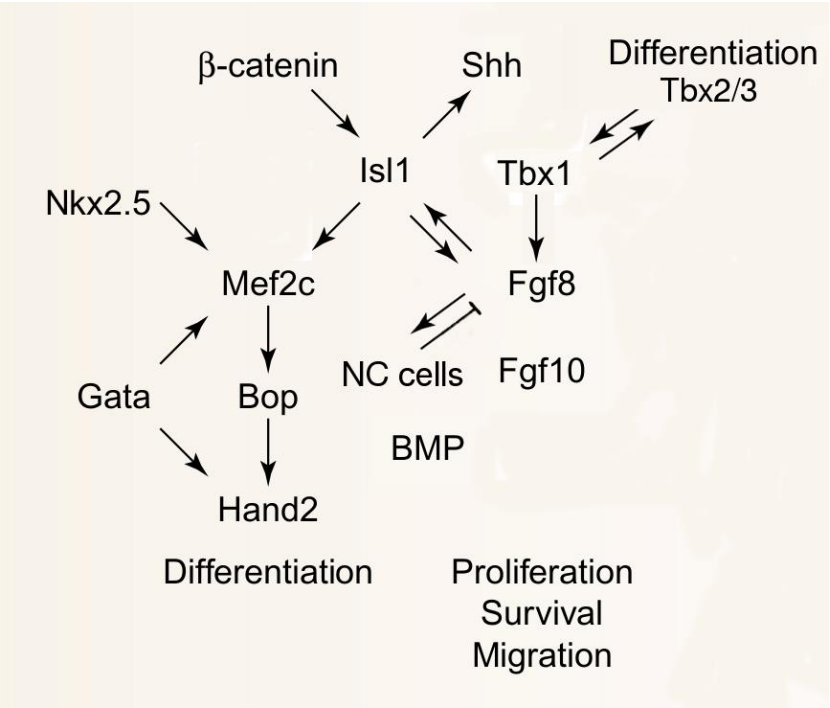
rakkude populatsiooni. **(B)** Embrüo ventraalsel voltumisel E8 moodustunud südametoru suhtes paiknevad teise südamevälja rakud neelu endodermi (kollane) suhtes. **(C)** Südametoru lingustumisel, pikenemisel ja edasisel arengul vanuses E8.5 lisatakse teise südamevälja rakke nii arteriaalsesse kui ka venoossesse südametoru poolusele (sinine). Joonis Cai jt, 2003 järgi.

Embrüo ventraalsel voltumisel paigutuvad teise südamevälja rakud neelu mesenhüümi, asudes nüüd südame suhtes anterioorselt ja dorsaalselt (Buckingham jt, 2005). E8.5 algab südametoru kiire kasv, mis toimub ennekõike rakkude lisandumise tulemusena nii arteriaalsesse kui ka venoossesse poolusesse (Joonis 3) (van den Berg jt, 2009). Paralleelselt rakkude proliferatsiooni, migratsiooni ja diferentseerumisega toimub südametoru lingustumine, kus definitiivsed südame struktuurid paigutuvad oma kohtadele (Buckingham jt, 2005).

Rakkude diferentseerumisel kardiomüotsüütideks jagunemine aeglustub, mistõttu on normaalseks organogeneesiks oluline piisav eellasrakkude hulk (van den Berg jt, 2009). Teise südamevälja rakkude proliferatsioon on otseselt reguleeritud Tbx1, Nkx2.5 ja Isl1 TF'ide poolt (Cai jt, 2003; Chen jt, 2009; Prall jt, 2007). *Isl1* ekspresseerivad eellasrakud paiknevad splanhnilises mesenhüümis ja ventraalselt neelu endodermis ning nende puudumisel tekivad häired südametoru lingustumisel ning parema vatsakese ja VVK aplaasia (Cai jt, 2003). *Isl1* ekspressioon on vajalik teise südamevälja rakkude hoidmiseks proliferatiivses seisundis ning nende diferentseerumise inhibitsiooniks (Cai jt, 2003; Yang jt, 2006). *Tbx1* puudumisel toimub eellasrakkude enneaegne diferentseerumine ning tulemusena esinevad VVK ning lõpusekaare arengudefektid (Zhang jt, 2006). Hiljem on näidatud, et Isl1'e ja Tbx1'e poolt vahendatud neelu mesenhüümi rakkude proliferatsioon ja migratsioon toimib läbi Fgf8/10 signalisatsiooni (Joonis 4) (Chen jt, 2009; Ilagan jt, 2006; Park jt, 2006; Rochais jt, 2009; Watanabe jt, 2010). *Fgf8* suhtes null-mutantsed embrüod surevad gastrulatsioonis, ent konditsionaalse knock-out tehnoloogia abil on näidatud, et mesodermaalsel *Fgf8/10* puudumisel esinevad lisaks VVK ja parema vatsakese hüpoplaasiale ka aordikaare arterite anomaaliad (Park jt, 2006; Watanabe jt, 2010). Sarnased defektid südame anterioorsel poolusel esinevad ka kanoonilise *Wnt* signalisatsiooni puudumisel, mis otseselt reguleerib Fgf signaalide vahendatud Isl1 positiivsete rakkude proliferatsiooni (Cohen jt, 2007).

Südame lingustumisel algab neuraalharja päritolu rakkude migratsioon mööda arenevate lõpusekaare arteritega külgnevat mesenhüümi. Neuraalharjast (NH) pärinevad rakud osalevad südamest lähtuvate peamiste arterite, VVK, poolkuuklappide, parasümpaatiliste ganglionite ja pärgarterite arengul (Arima jt, 2012; Phillips jt, 2013; Tian jt, 2013; Tomita jt, 2005).

Varasemalt on näidatud, et pärast NH ablatsiooni tekib hüpoplastiline VVK, mis põhjustab häireid südametoru lingustumisel (Yelbuz jt, 2002). Hutson jt (2006) näitasid, et südame NH eemaldamisel Fgf8 konsentratsioon neelu mesenhüümis tõuseb ning tekivad üleprolifereerunud teise südamevälja rakud. Südame arengudefektid on NH ablatsiooniga ning konditsionaalsetes *Tbx1* ja *Isl1 knock-out* embrüotes fenotüübilt sarnased. Regulatsiooni häireid ühendavaks lüliks näib olevat *Fgf8*, sest nii teise südamevälja kui ka NH rakkude migratsioon ja proliferatsioon on tundlikud Fgf8 taseme suhtes (Hutson jt, 2006; Zaffran ja Kelly, 2012).



Joonis 4. Sekundaarse südamevälja arengut reguleerivad TF'id ja signaalimolekulid. Joonis modifitseeritud kujul Rochais jt, 2009 järgi.

Neelu endodermist pärinevad Fgf8 signaalid mõjutavad nii sekundaarse südamevälja kui ka neuraalharja rakkude proliferatsiooni (Ilagan jt, 2006; Park jt, 2006). Lisaks Fgf8'le on ka endodermaalsed Shh signaalid vajalikud elumuseks rakkudele, mis osalevad VVK pikenemisel ja eraldumisel aordiks ja kopsutüveks (Goddeeris jt, 2007). Järgnevalt on näidatud, et Shh signaalid indutseerivad mesenhüümist rakkude migratsiooni südame arteriaalsesse ja venoossesse poolusesse (Hoffmann jt, 2009).

Rakkude migratsioonil südame arteriaalsesse poolusesse reguleeritakse Isl1 ja Tbx1 ekspressioon alla ning rakud suunatase diferentseeruma (Prall jt, 2007; Y. Watanabe jt, 2012; Yang jt, 2006). Müokardi diferentseerumist ja lingustumist reguleerib Tbx1, Tbx2 ja Tbx3 TF'ide võrgustik (Joonis 4). Tbx1 aktiveerib otseselt Tbx2/3 ekspressiooni, mis omakorda indutseerivad Bmp4 ning müokardi spetsiifiliste geenide ekspressiooni (Chen jt, 2009;

Mesbah jt, 2012). Bmp4 signaalide toimel ekspresseeritakse miRNA'd (*micro RNA*), mis suruvad alla proliferatsioonil osalevate faktorite transkriptsiooni (Wang jt, 2010). Samuti aktiveerivad Bmp signaalid diferentseerumisel osalevate TF'ide ekspressiooni (Liu jt, 2004; Tirosh-Finkel jt, 2010; Wang jt, 2010). Bmp signaalide vahendatud diferentseerumist vahendavad Msx1/2 (*Muscle-segment homeobox 1/2*) TF'id, mis inhibeerivad neelu mesenhüümis proliferatsiooniga seotud Fgf8 signaale (Chen jt, 2007; Tirosh-Finkel jt, 2010). Signaalimolekulidest suunavad rakke diferentseeruma ka mitte-kanoonilised Wnt signaalid, mis inhibeerivad teise südamevälja derivaatides kanoonilist Wnt signaalirada (Cohen jt, 2012).

Lisaks osalevad kardiomüotsüütide diferentseerumisel ja südame morfogeneesil ka Isl1, Hand2, Nkx2.5, Mef2c ja Gata4/6 TF'ide võrgustik (Joonis 4) (Prall jt, 2007; Waldo jt, 2001). Südame mesodermist konditsionaalne *Nkx2.5* eemaldamine põhjustab hüpoplastilist VVK'd ning südametoru lingustumise defekte, mis on otseselt seotud vähenenud proliferatsiooni ja kõrgenenud Bmp2 signaalidega neelu mesenhüümis (Prall jt, 2007). Nkx2.5, Isl1 ja Gata perekonna TF'id aktiveerivad südame arteriaarsel poolusel Mef2c ekspressiooni, mis on vajalik südame kontraktsiooni eest vastutavate valkude ekspressiooniks (Clark jt, 2013; Dodou jt, 2004). Normaalseks VVK ja parema vatsakese morfogeneesiks on vajalik ka Mef2c transkriptsioonilise märklaua Bop ekspressioon (Phan jt, 2005). Bop geenilt kodeeritakse kromatiini modifitseeriv valk, mis koos Gata4'ga aktiveerivad Hand2 ekspressiooni (Joonis 4) (Dodou jt, 2004; Gottlieb jt, 2002; Phan jt, 2005; Zeisberg jt, 2005). Hand2, Mef2c ning Bmp otsesed märklauad Gata4/6 aktiveerivad neelu mesodermi derivaatides diferentseerunud müokardile omaste markerite ekspressiooni (Zhao jt, 2008).

1.3. Gata perekonna transkriptsioonifaktorid

Gata valguperekond koosneb kuuest konserveerunud (Gata1 – 6) tsink-sõrm motiivi sisaldavast transkriptsioonifaktoritst, mis seonduvad [A/T]GATA[A/G] promootor järjestustele, reguleerides mitmete kudede diferentseerumist, proliferatsiooni ja apoptoosi (Lowry ja Atchley, 2000). Gata faktorite märklaudgeenid on osati kattuvad ja võivad üksteise funktsioone kompenseerida. Samuti võivad Gata TF'id transkriptsiooni regulatsioonil moodustada homo- ja heterodimeere, mis muudab regulatsioonimehhanismide uurimise veelgi kompleksemaks (Bates jt, 2008). Enamjaolt on *Gata* geenide null-mutatsioonid letaalsed va *Gata5*, mille puudumisel esineb bikuspidaalne aordiklapp (Laforest jt, 2011). Gata1/2/3 on ekspresseerunud laialdaselt hematopoeetilises süsteemis. Gata1 osaleb

megakarüotsüütide, erütrotsüütide ja eosinofiilide diferentseerumisel ning Gata2 hematopoeetiliste tüvirakkude proliferatsioonil (Harigae, 2006). Gata4/5/6 reguleerivad otseselt südame eellasrakkude spetsifikatsiooni ja diferentseerumisega seotud geenide ekspressiooni (Kodo jt, 2009; Watt jt, 2004).

Gata4 suhtes null-mutantsed embrüotel esinevad häired südametoru moodustumisel ja rakkude proliferatsioonil, kus Gata4 aktiveerib otseselt rakutsükli regulaatoreid nagu *cyclin D3* ja cdk4 (*cyclin dependent kinase 4*) (Rojas jt, 2008). Haplopuudulikkus *GATA4* geeni suhtes põhjustavad inimestel kaasasündinud südamedefekte, millest levinumad on kodade-, vatsakeste ja kodade-vatsakeste vahelise seina defektid (Nemer jt, 2006). *Gata4* ja *Gata6* suhtes homosügootsetel null-mutantsetel hiirtel pole kardiomüotsüüdid võimelised diferentseeruma ning süda ei moodustu (Zhao jt, 2008). Laforest ja Nemer (2011) kirjeldasid *Gata4/5* ja *Gata5/6* topelt heterosügootsetes embrüotes mitmeid teise südamevälja rakkude arenguhäiretega seotud defekte, millest 6/7 esines topelt-väljavool paremast vatsakesest (*double outlet from right ventricle*, DORV). Seega on erinevad Gata faktorid võimelised tekitama kooperatiivseid defekte (Laforest ja Nemer, 2011; Singh jt, 2010). *Gata6* konditsionaalne eemaldamine NH päritolu rakkudest põhjustab aordikaare arterite anomaaliaid, püsivat aorditüve (*persistent truncus arteriosus*, PTA) ja kodadevahelise seina defekte (*atrial septal defect*, ASD), rekapituleerides mitmeid kaasasündinud südamedefekte inimestel (Kodo jt, 2009; Wang jt, 2012).

1.3.1. Transkriptsioonifaktor Gata3

Täiskasvanud organismis on Gata3 ekspresseerunud T-lümfotsüütides osaledes T *helper* rakkude spetsifikatsioonil ja diferentseerumisel (Ho jt, 2009). Embrüogeneesis kontrollib Gata3 sisekõrva ganglionite, Corti organi diferentseerumist, elumust ja innervatsiooni ning kattub *vestibulocohlear* gangilonis Gata2 ekspressiooniga (Appler jt, 2013; Lilleväli jt, 2004). Gata3 reguleerib otseselt Wnt/β-catenin vahendatud rakkude diferentseerumise sisekõrvas (Alvarado jt, 2009). Arenevas neeru juha rakkudes osaleb Gata3 kanoonilises Wnt signalisatsioonirajas, hoides ära enneaegse eellasrakkude diferentseerumist ja aidates säilitada eellasraku seisundit (Grote jt, 2008). Gata2 ja 3 on ainukesed Gata perekonna TF'id, mis on ekspresseerunud kesknärvisüsteemis ja osalevad taga- ja seljaaju arengul (Nardelli jt, 1999; Pata jt, 1999). Gata3 ekspressioonist sõltub mitmete neuraalharja päritolu struktuuride areng nt sümpaatilised ganglionid, neerupealised, kilpnääre ja tüümus (George jt, 1994; Lieuw jt, 1997; Manaia jt, 2000). Sümpaatiliste ganglionite neuronid *Gata3* puudumisel moodustuvad, ent arengu jätkudes kärbuvad (Lim jt, 2000). Hiljem on näidatud, et neuronites on pro-

apoptootilised üles ja anti-apoptootilised geenid alla reguleeritud, mis oletatavasti viivad rakud apoptoosi (Tsarovina jt, 2010). Inimestel põhjustab *GATA3* haplopuudulikkus Barakat'i sündroomi, mis hõlmab sensorineuraalset kurtust, neeruhaigusi, hüpoparatüreoidismi ja vatsakeste vaheseina defekte (Muroya jt, 2001). Südame südame arengus on Gata3 ekspresseerunud endokardiaalsetes padjandites, neelu mesenhüümis ning VVK distaalse osa müokardis (Raid jt, 2009). *Gata3* suhtes null-mutantsed homosügootsed hiired surevad E11.5 – E12 noradrenaliini defitsiidi tõttu (Lim jt, 2000; Pandolfi jt, 1995). Jootes tiinetele *Gata3* heterosügootsetele emasloomadele katehoolamiidide sünteesiraja intermediaate või agoniste on võimalik embrüote eluiga pikendada. Raid jt (2009) näitasid päästetud embrüotel mitmeid südamedefekte nagu VSD, DORV, aordikaare arterite anomaaliaid (*interrupted aortic arch*, IAA) ja PTA. Defetide põhjuseks peetakse hüpoplastilist VVK'd ning aorditüve rotatsiooni häireid südametoru lingustumisel (Raid jt, 2009).

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1. Eksperimentaalse töö eesmärgid

Käesoleva magistritöö eesmärkideks oli seatud:

- analüüsida *Gata3-nls-lacZ* ajalis-ruumilist ekspressiooni varajases arengus südametoru moodustumisel;
- iseloomustada $Gata3^{KO}$ E10.5 südame neuraalharja markeri AP-2α positiivsete rakkudega toimunud muutusi rakkude proliferatsioonis ja markeri ekspressioonis;
- kirjeldada *in situ* hübridisatsiooni ja qRT-PCR abil $Gata3^{KO}$ embrüote sekundaarse südamevälja markerite geeniekspressiooni

2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1. Kasutatud hiireliin

Töös kasutati C57BL/6J taustal konstrueeritud transgeenset hiireliini, kus hiire *Gata3* geeni esimesed kaks eksonit on asendatud tuumalokalisatsiooni signaali (*nuclear localisation signal/sequence, nls*) ja β-galaktosidaasi kodeeriva järjestusega (*lacZ*), mille tulemusena on geenilt kodeeritud valk mittefunktsionaalne. Gata3 mutatsiooni suhtes homosügootsed hiired ($Gata3^{KO}$) surevad embrüonaalses eas (E11.5 – E12) noradrenaliini defitsiidi tõttu (Lim jt, 2000; Pandolfi jt, 1995). Heterosügootsed hiired ($Gata3^{nlslacZ/+}$) paistavad normaalsed ja on viljakad. Heterosügootsete hiirte ristamisel saadud embrüote ligikaudse vanuse määramiseks vaadeldi kopulatsioonil tekkivat limakorki, mille olemasolul arvestati embrüod E0.5 päeva vanusteks, täpsema embrüonaalse vanuse määramiseks loendati somiitide arvu (Kaufman, 1992). Eksperimentaalses töös kasutatud hiired hoiti standardsetes tingimustes, kus neil oli võimaldatud puhas söök ja jook. Hiired surmati vastavalt Euroopa Liidus kehtestatud eeskirjadele.

2.2.2. Genotüpiseerimine

Embrüod vanuses E9.5 – E11.5 dissekteeriti emakasarvedest fosfaatpuhvris (PBS) ning eemaldadi lootekestadest, milledest rebukotti kasutati genotüpiseerimiseks. Lüüsimiseks kasutati lahust, mis sisaldas 25 mM NaOH ja 0.2 mM EDTA (pH 12.0) ning

neutraliseerimiseks 40 mM Tris-HCl (pH 5.0) puhvrit. PCR (*polymerase chain reaction*) meetodiga genotüpiseerimiseks kasutati järgmisi praimereid: G3ex2-F 5'-CCT CCG ACG GCA GGA GTC-3'; G3ex2-R 5'-ACC GTA GCC CTG ACG GAG-3'; LacZ-R1 5'-ACG GC G GAT TGA CCG TAA TG-3'. PCR segu sisaldas 1X Buffer B (Solis BioDyne); 1.5 mM MgCl2, 0.2 mM dNTP (Invitrogen), 2.5 mM G3ex2-F, 1 mM G3ex2-R, 1.5 mM LacZ-R1, 0.05 U · μl^{-1} Taq polümeraasi ja 1 µl lüüsimisel saadud lahust. PCR programm koosnes järgmistest etappidest: 1) 95ºC 5 minutit; 2) 95ºC 30 sekundit; 3) 60ºC 40 sekundit; 4) 72ºC 40 sekundit; 5) 72ºC 5 minutit. Etappe 2 – 4 korrati tsüklina 32 korda. Saadud produkt kanti 1% agaroos/TAE (Tris-atsetaat-EDTA) elektroforeesi geelile (w/v) ning voolutati 170 V juures (200 mA) 25 min.

2.2.3. *lacZ* värvusreaktsioon β-galaktosidaasi ilmestamiseks

Embrüod vanuses E8 – E10.5 dissekteeriti emakasarvedest ning fikseeriti ühe tunni jooksul 4% PFA/PBS lahuses toatemperatuuril. Fiksaator pesti välja 3 korda 10 minutit PBS lahusega ning asendati puhver *lacZ* värvilahusega, mis sisaldas lõppkonsentratsioonis 5 mM kaalium ferritsüaniidi ($K_3Fe(CN)_6$), 5 mM kaalium ferrotsüaniidi ($K_4Fe(CN)_6$) ning 1 mg · ml^{-1} X-Gal (Fermentas) PBS'is. Embrüoid inkubeeriti *lacZ* värvilahuses toatemperatuuril kuni saavutati soovitud värvuse intensiivsus. Üleliigne lahus pesti välja PBS'iga ning järelfikseeriti 4% PFA/PBS lahuses. Pärast embrüote sisestamist parafiini, lõikamist ning rehüdreerimist (vt 2.2.4) värviti tsütoplasma 10 sekundit eosiiniga. Seejärel lõigud dehüdreeriti kasvava etanooli konsentratsiooniga vesilahustes: 50%; 70%; 96%; veevaba etanool (Naxo) ning viimaks ksüleenis ja sulundati Kanada palsamisse.

2.2.4. Immunohistokeemia

Parafiinlõikude valmistamiseks C57BL/6J, *Gata3*$^{nlslacZ/+}$ ja *Gata3*^{KO} hiirte embrüod dissekteeriti PBS lahuses ning fikseeriti 1 h 4% paraformaldehüüd (PFA, Sigma Aldrich)/PBS lahuses toatemperatuuril. Fiksaator pesti välja 10 min jooksul PBS'iga ning seejärel dehüdreeriti 30 min iga etapp kasvava konsentratsiooniga etanoolli vesilahustes: 50%; 60%; 70%; 80%; 90%; 96%; veevaba etanool (Naxo) ja viimaks kaks korda 30 min ksüleenis (Sigma Aldrich). Edasi sisestati materjal parafiini (PlastiWax, Kaltek). 10 µm paksuste lõikude tegemiseks kasutati Microm HM355S mikrotoomi (Thermo Fisher Scientific). Saadud lõigud kinnitati alusklaasidele (Polysine Slides, Thermo Scientific). Esmalt töödeldi parafiinlõigud 3 korda 3 min ksüleenis (Sigma Aldrich), seejärel rehüdreeriti 3 min igas etapis

kahaneva konsentratsiooniga etanooli vesilahustes: veevaba etanool (Naxo); 96%; 90%; 80%; 70%; 60%; 50% ning viimaks 5 min puhtas vees. Antigeensuse taastamiseks inkubeeriti lõike 30 min 95°C juures 10 mM Na-tsitraatpuhvris (pH 6.0), mis sisaldas 0.01% Tween20'. Materjali permeabiliseerimiseks töödeldi lõike 10 min 0.01% Triton X-100 (Sigma Aldrich)/PBS lahusega. Primaarsete antikehade ebaspetsiifilise seondumise vältimiseks kasutati 1% veise seerumi albumiini (*bovin serum albumine*, BSA; Sigma Aldrich)/5% normaal kitse seerum/PBS lahust, mida hoiti lõikudel 30 min. Primaarsed antikehad ja nende lahjendused 1% BSA/PBS'is on toodud Tabelis 1. Üleöö 4°C juures toimunud immunohistokeemilise reaktsiooni järgselt pesti lõike seondumata antikehade eemaldamiseks 2 korda 10 min PBT'ga (0.05% Tween 20 lahus PBS'is). Fluorofooriga konjugeeritud 1% BSA/PBS'is lahjendatud sekunaarsete antikehadega (lahjendus märgitud Tabelis 1) viidi reaktsioon läbi niisutuskambris 2 h toatemperatuuril. Mitteseondunud antikehade välja pesemiseks töödeldi lõike 2 korda 10 min PBT's. DNA visualiseerimiseks kasutati fluorestseeruvat värvainet DAPI (4, 6-diamidino-2-fenüülindool, Sigma Aldrich) lahjendusega 1:1000 PBT's, mida hoiti lõikudel 2 min ning seejärel pesti PBS'iga. Preparaatide sulundamiseks kasutati mittefluorestseeruvat sulundusvedelikku Fluoromount G (Electron Microscopy Sciences) ja 0.17 mm paksusega katteklaase (Deltalab).

Tabel 1. Töös kasutatud primaarsed ning sekundaarsed antikehad ning nende lahjendused. Kolmandas veerus toodud vastavad tootjad.

rabbit anti β-Gal	1:600	Abcam
mouse anti AP-2α	2 μg · ml^{-1}	Santa Cruz Biotechnology
rabbit anti pH3	1:600	Abcam
goat anti mouse Alexa Fluor 555	1:600	Invitrogen
goat anti rabbit Alexa Fluor 488	1:600	Invitrogen

2.2.5. RNA eraldamine ja kvantitatiivne reaalaja PCR

Totaalne RNA eraldati E9.5 *Gata3*^{KO} (n=4) ja C57BL/6J (n=4) embrüote dissekteeritud keha tüveosast, mis jäi antorioposterioorselt kõrvavesiikuli ja kolmanda somiidi kaudaalse osa vahele ning dorsaalsemalt südame välja- ja sissevoolukulglast (Joonis 10 A, lk 26). RNA eraldamiseks kasutati TRIzol® Reagent'i (Life Technologies) vastavalt tootja protokollile ning saadud RNA konsentratsioon mõõdeti spektrofotomeetriga Nanodrop ND1000. cDNA (complementary DNA) sünteesiks lisati 450 ng totaalsele RNA'le oligo(dT)17 praimereid

(lõppkonsentratsiooniga 2.5 µM) ja dNTP'sid (0.5 µM). Praimerite seondumiseks inkubeeriti lahust 65ºC juures 5 minutit ning jahutati 1 minuti jooksul jääl. Edasi lisati proovidele First Strand puhvrit (50 mM Tris-HCl pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl2), 5 mM MgCl2, 10 mM DTT (ditiotreitool), 2 U · μl^{-1} RnaseOUT™ ja 10 U · μl^{-1} SuperScript™ III pöördtranskriptaasi (Life Technologies). cDNA süntees viidi läbi 50 minuti jooksul 50ºC juures ja reaktsiooni peatati inkubeerides lahust 5 minutit 85ºC juures. Seejärel jahutati proovid jääl ning säilitati -20ºC juures edasisteks eksperimentideks.

Kvantitatiivne reaalaja PCR (quantitative PCR, qPCR) viidi läbi StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) masina ja StepOne Software v2.0 tarkvara abil. Reaktsioonilahus sisaldas 1X HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (ROX) (Solis BioDyne) (HOT FIREPol DNA polümeraas; 5X Evagreen qPCR puhver; 12.5mM $MgCl_2$; dNTP-d; EvaGreen värv; ROX värv) 0.2 µM praimereid (toodud Tabelis 1), 1 µl sünteesitud cDNA'd ning mQ vett. Referents-geenina kasutati hüpoksantiin-guaniin fosforibosüültransferaasi (*hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*, Hprt). Proovid kanti plaadile (Applied Biosystems) kolmes korduses ning sooritati vähemalt kaks sõltumatut eksperimenti. qPCR'i programm koosnes järgmistest etappidest: 1) 95ºC 12 minutit; 2) 95ºC 15 sekundit; 3) 60ºC 60 sekundit; Etappe 2 – 3 korrati tsüklina 40 korda. Suhtelise mRNA ekspressioonitaseme määramiseks kasutati $2^{-\Delta\Delta CT}$ meetodit (Livak ja Schmittgen, 2001).

Tabel 2. qPCR'il kasutatud praimerite nukleotiidsed järjestused. Tabelis toodud vastavate geenide (esimene veerg) praimerite pärisuunalised (teine veerg) ja vastassuunalised (kolmas veerg) järjestused on võetud järgnevatest artikklitest: (Heallen jt, 2011; Johnson ja Martin, 2011; Mariani jt, 2008).

Fgf8	5′-TCTCCAGCACGATCTCTGTGAA-3′	5′-GGAAGCTAATTGCCAAGAGCAA-3′
Fgf10	5’-AGTGTCCTGGAGATAACATCAGTGG-3′	5’-TTTGCCTGCCATTGTGCTGC-3′
Isl1	5’-CTTTTCTGCCGTGCAGACCACGAT-3′	5’-CAGCTGCTTCTCGTTGAGCACAGT-3′
Tbx1	5’- CGACAAGCTGAACTGACCA-3′	5’-CAATCTTCCGCTGCGTGATCC-3′
Shh	5′-AGCAGACCGGCTGATGACT-3′	5′-AGAGATGGCCAAGGCATTTAA-3′
Hprt	5’- CACAGGACTAGAACACCTGC-3’	5′-GCTGGTGAAAAGGACCTCT-3′

2.2.6. *In situ* hübridisatsioon

In situ hübridisatsiooniks kasutatud C57BL/6J ja *Gata3*^{KO} embrüod dissekteeriti PBS'is ning fikseeriti üleöö 4% PFA/PBS lahuses 4°C juures. Fiksaator pesti kudedest välja 0.1%

Tween20/PBS (PBT) puhvris ning dehüdreeriti 5 minutit iga etapp kasvava metanooli (Naxo) konsentratsiooniga (25%, 50%, 75%) PBT lahustes ning viimaks 2 korda 5 minutit 100% metanooliga. Seejärel materjal hüdreeriti 5 minutit iga etapp kahaneva metanooli konsentratsiooniga PBT lahusega ning permeabiliseeriti 2 minuti jooksul 10 µg · ml-1 proteinaas K (AppliChem)/PBT lahuses. Proteinaas K deaktiveeriti inkubeerides embrüoid 5 minutit 2 mg · ml-1 glütsiin (Sigma)/PBT lahuses. Sellele järgnesid 5 minutilised pesud PBT'ga ning järelfikseerimine 4% PFA/0.2% glutaaraldehüüdi/PBS lahusega 20 minutit. Edasi pre-hübridiseeriti embrüod 1 tunni jooksul 50% formamiidi/5X SSC (pH 5.0)/1% SDS prehübridisatsiooni lahuses 70°C juures. Hübridisatsiooniks lisati prehübridisatsioonilahusele lõppkonsentratsiooniga 1 µg · ml^{-1} *digoxigenin*-märgistatud (Roche) riboproovid, mida oli eelnevalt 5 minuti jooksul kuumutatud 80°C juures ning jahutatud jääl. Hübridisatsioon toimus 16 tunni jooksul 70°C juures loksutil (Eppendorf). Järgnevalt toimusid 65°C juures pesud post-hübridisatsiooni lahustega, mis sisaldasid 50% formamiidi/5X SSC (pH 5.0)/1% SDS ning 50% formamiidi/5X SSC (75 mM NaCl, 7.5 mM Na-tsitraat) (pH 5.0) 2 korda 30 minutit igas. Edasi pesti embrüod toatemperatuuril 3 korda 5 minuti jooksul TBST lahustega, mis sisaldas 25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 140 mM NaCl, 0.27 mM KCl, 0.1% Tween 20. Seejärel blokeeriti embrüod vähemalt 1 tunni jooksul ebaspetsiifilise antikeha seondumise vältimiseks 2% blocking reagent (Roche)/TBST lahusega. Blokeerimissegu asendati anti-digoxigenin-alkaline phosphatase konjugeeritud *Fab* fragmetide (1:2000, Roche)/1% blocking reagent/TBST lahusega ning inkubeeriti üleöö 4°C juures loksutil. Järgnevalt pesti embrüoid toatemperatuuril TBST lahusega: esmalt 3 korda 5 minutit igas, edasi vähemalt 3 korda 1 tunni jooksul ning viimaks üleöö. Seejärel pesti embrüoid 3 korda 30 minuti jooksul NTMT lahusega, mis sisaldas 100 mM NaCl, 100 mM Tris (pH 9.5), 50 mM MgCl2, 0.1% Tween-20. Värvusreaktsioon viidi läbi toatemperatuuril 2 – 4 tunni jooksul NTMT lahuses, mis sisaldas 250 µg · ml^{-1} NBT (nitrosinine tetrasool, Sigma-Aldrich) ja 125 µg · ml^{-1} BCIP (5-bromo-4-kloro-3-indolüülfosfaat, Applichem). Kui soovitud värvusreaktsioon oli märgata, pesti proove üleöö PBS'is ning järelfikseeriti toatemperatuuril 20 minutit 4% PFA/PBS lahusega.

2.2.7. Mikroskoopia, pildi- ja andmetöötlus

Embrüote analüüsiks ja pildistamiseks kasutati Leica M165FC (Leica) mikroskoopi varustatud Leica DFC 450 C (Leica) kaameraga.

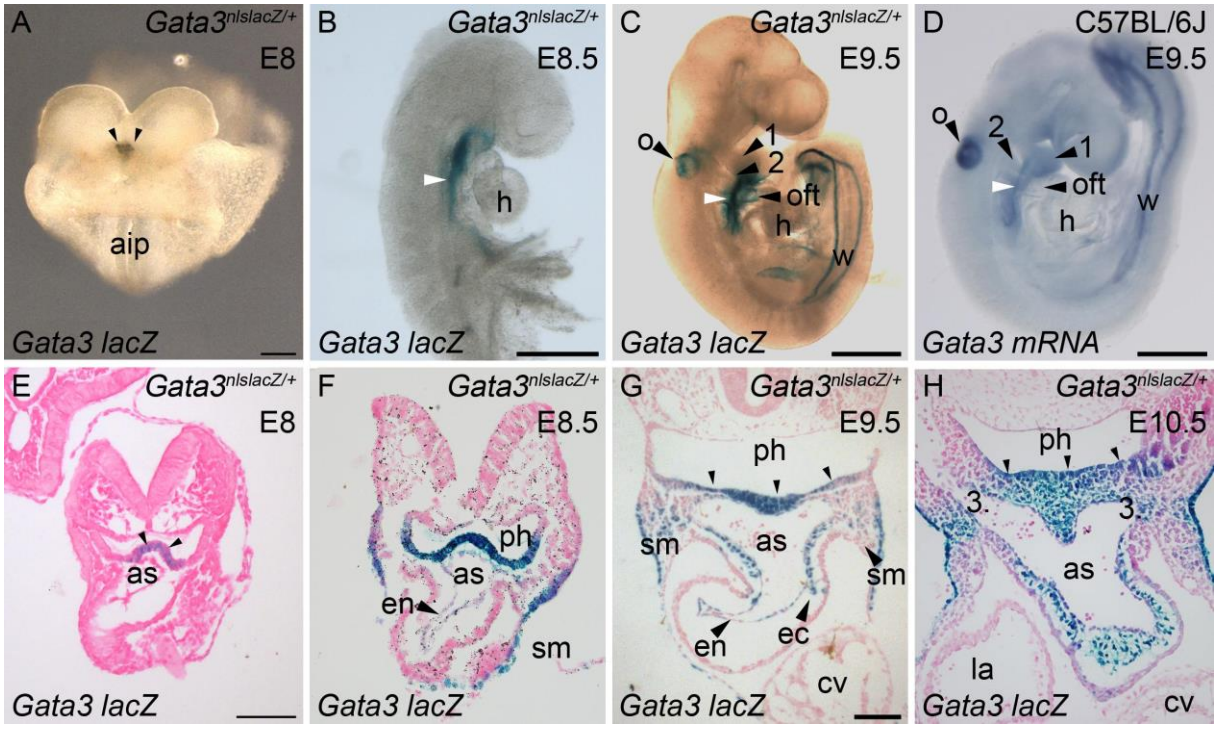
Immunohistokeemilisi preparaate analüüsiti Olympus CX52 (Olympus) mikroskoobiga ning pildistati Olympus DP71 (Olympus) kaameraga.

Piltide dokumenteerimiseks ning järeltöötlemiseks kasutati Adobe Photoshop CS7 (Adobe Systems) pilditöötlusprogrammi. AP-2a ekspressiooni ja AP-2α^+ rakkude omavahelist keskmist kaugust mõõdeti ImageJ programmi abil.

3. TULEMUSED

3.1. *Gata3* on ekspresseerunud südant moodustavas piirkonnas

Gata3 ekspressiooni kirjeldamiseks kasutati *Gata3*$^{nlslacZ/+}$ embrüoid, kus *Gata3* geeni ühes alleelis on esimesed kaks eksonit asendatud *nls-lacZ* reporterjärjestusega, millelt sünteesitud β-galaktosidaas (β-gal) transporditakse nls järjestuse tõttu tuuma. Embrüote X-gal'ga histokeemilise töötlemise järgselt matkib reaktsiooni produkt Gata3 mRNA ekspressiooni (Joonis 5 C, D). Südant moodustavas piirkonnas algab *Gata3-nls-lacZ* ekspressioon embrüo ventraalse voltumise käigus moodustunud neelu endodermi ventromediaalses osas E8 (Joonis 5 A, E). Südametoru lingustumisel E8.5 – E9.5 laieneb tugev ekspressiooni kogu neelu ventraalsesse endodermi mesodermi ja neelu rakkudesse (Joonis 5 B, F, D). E9.5 on *lacZ* ekspressiooni märgata VVK distaalse osa müokardis, endokardis ning lateraalselt lõpusekaari katvas ektodermis (Joonis 5 C, G). E10.5 on südametoru lingustumine lõppenud ning lõpusekaareartereid ümbritsev ja VVK distaalse osa mesenhüüm peamiselt NH päritolu (Jiang jt, 2000). Selles vanuses on *Gata3-nls-lacZ* laialdaselt ekspresseerunud VVK mesenhümaalsetes rakkudes ning aordikoti ja neelu vahelises mesenhüümis (Joonis 5 H). Lisaks ülaltoodule on ekspressiooni märgata ventraalselt eessoole endodermis ning lõpusekaareartereid proksimaalselt ümbritsevas mesenhüümis.

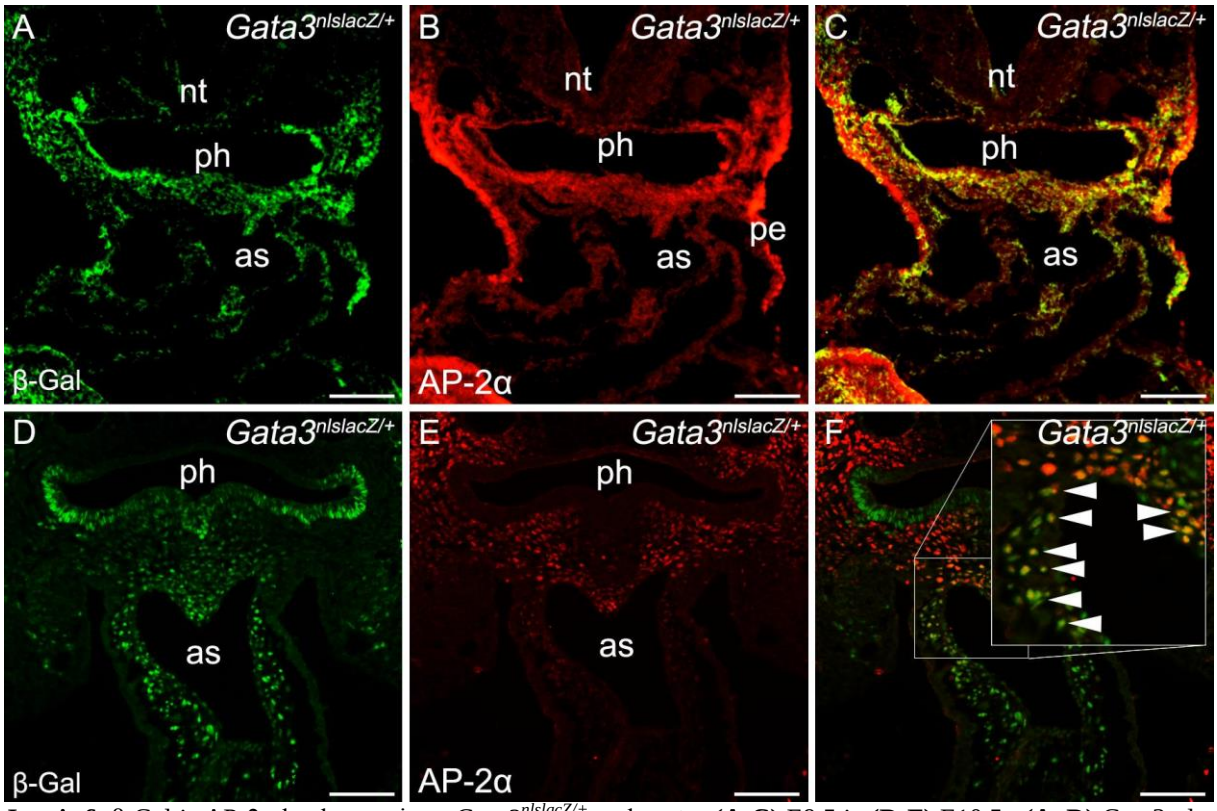


Joonis 5. *Gata3-nls-lacZ* ekspressioon südame arengus osalevates piirkondades E8 – E10.5. **(A)** E8 *whole mount* embrüol on frontaalvaates täheldatav β-galaktosidaasset aktiivsust (noolepead) neelu piirkonnas. **(B)** *Gata3-nls-*

lacZ ekspressiooni tähistav värvusreaktsioon on E8.5 embrüo südant moodustavas piirkonnas (valge nool). **(C)** E9.5 on β-galaktosidaasne aktiivsus märgatav 2. lõpusekaares, väljavoolukulglas (oft), südant moodustavas piirkonnas (valge nool), kõrvavesiikulis ning arenevates Wolffi juhades. **(D)** E9.5 C57BL/6J embrüo *in situ* hübridisatsioonil rekapituleerub *Gata3* mRNA ekspressioon *Gata3-nls-lacZ* ekspressiooniga. **(E-H)** Ristlõigud *Gata3*$^{nlslacZ/+}$ emrbüotest. **(E)** Ristlõigul E8 *Gata3*$^{nlslacZ/+}$ embrüost on ekspressioon detekteeritav ventraalses neelu endodermis (noolepead). **(F)** Transgeen on ekspresseerunud E8.5 embrüos ventraalses neelu (ph) endodermis, splanhnilises mesenhüümis (sm). **(G)** E9.5 on *Gata3-nls-lacZ* ekspressioon märgitav neelu mesenhüümis (sm), neelu endodermis (noolepead), väljavoolukulgla endokardiaalsete padjandite mesenhümaalsetes rakkudes (ec) ning endokardis (en). **(H)** Ristlõigul E10.5 embrüost on β-galaktosidaasne aktiivsus märgatav 3. lõpusekaarearteri proksimaalse osa mesenhüümis, väljavoolukulgla endokardiaalsete padjandite rakkudes, neelu endodermis (nooled) ning neelu ja aordikoti (as) vahelises mesenhüümis. Lühendid: aip, anterior intestinal portal; as, aordikott; cv, ühisvatsake; ec, endokardiaalse padjandi rakud; en, endokard; h, süda; o, kõrvavesiikul; oft, väljavoolukulgla; ph, neel; sm, splanhniline mesenhüüm; w, Wolffi juha. Mõõtlõigud: **(A)** 100 µm., **(B-D)** 1 mm, **(E, F)** 100 µm, **(G, H)** 100 µm.

3.2. Gata3 ja AP-2α koekspressioon

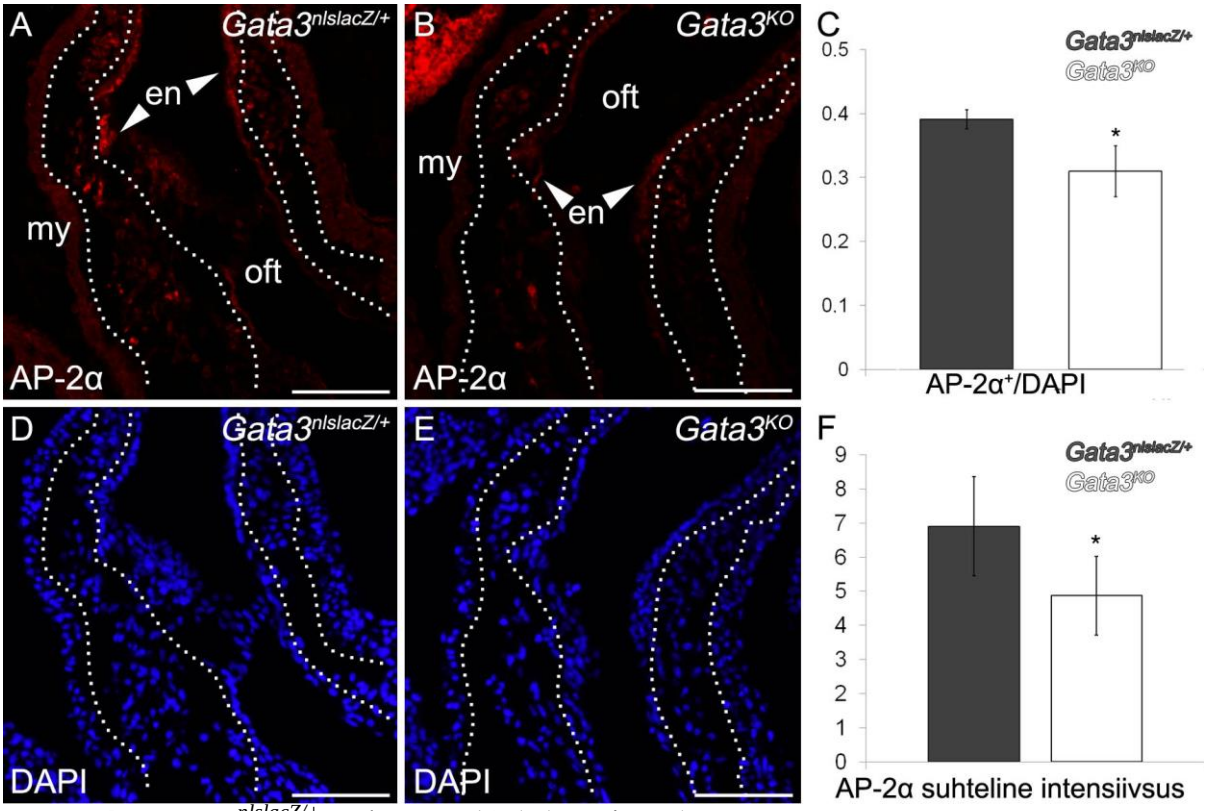
NH päritolu rakud migreeruvad endokardiaalsetesse padjanditesse mööda 3., 4. ja 6. lõpusekaare arteritega kulgevat mesenhüümi (Kirby ja Hutson, 2010), mis osaliselt kattub *Gata3-nls-lacZ* ekspressiooni kompartmendiga. Näitamaks, et *Gata3-nls-lacZ* on ekspresseerunud neuraalharja päritolu rakkudes vaadati immunohistokeemiliselt NH markeri AP-2α ja β-gal ekspressiooni kolokalisatsiooni. E9.5 *Gata3*$^{nlslacZ/+}$ embrüote ristlõikudelt ilmneb, et AP-2α ekspresseerivad rakud paiknevad lõpusekaare artereid ja ventro-lateraalselt neelu endodermi ümbritsevas mesenhüümis (Joonis 6 B). Markerite ekspressioon kattub neelu endodermi ja aordikoti vahelistes mesenhümaalsetes rakkudes (Joonis 6 C). E10.5 ühtib β-gal (Joonis 6 D) ja AP-2α (Joonis 6 E) ekspressioon laialdaselt aordikoti ning neelu vahelistes mesenhümaalsetes rakkudes ning distaalses VVK endokardiaalsetes padjandites (Joonis 6 F). Kattumist on ka märgata aordikaareartereid proksimaalselt ümbritsevates mesenhümaalsetes rakkudes.



Joonis 6. β-Gal ja AP-2α koekspressioon *Gata3*$^{nlslacZ/+}$ embrüotes **(A-C)** E9.5 ja **(D-F)** E10.5 . **(A, D)** Gata3-nls-lacZ ekspressioon märgitud anti-β-Gal'ga (roheline). **(B, E)** Neuraalharja päritolu rakud on märgistatud anti-AP-2α'ga (punane). **(C, F)** β-Gal ja AP-2α ekspressioonide ühendatud kujutis. Koekspressioon on värvunud kollaselt neelu ja väljavoolukulgla mesenhüümis (noolepead). Lühendid: as, aordikott; nt, neuraaltoru; pe, pinna ektoderm; ph, neel. Mõõtlõik 100 μm.

3.3. TF AP-2α on *Gata3*^{KO} embrüote VVK endokardiaalse padjandi rakkudes alla reguleeritud

NH päritolu rakud osalevad VVK eraldumisel aordiks ja kopsutüveks ning häired selles protsessis viivad PTA tekkele (Waldo jt, 2001). Seetõttu mõõdeti AP-2α ekspresseerivate (AP-2α^{+}) rakkude hulka ning AP-2α ekspressiooni taset *Gata3*^{KO} endokardiaalsete padjandite mesenhüümis. Esmalt leiti E10.5 endokardiaalsetes padjandites AP-2α^{+} rakkude (Joonis 7 A, B) suhe kõigesse VVK mesenhümaalsetesse rakkudesse, millede tuumad olid värvitud DAPI'ga (Joonis 7 D, E). Tulemuseks saadi, et *Gata3*^{KO} embrüotes on AP-2α^{+}/DAPI^{+} rakkude suhe oluliselt väiksem (0.31, $p<0.05$) kui *Gata3*$^{nlslacZ/+}$ embrüotes (0.39) (Joonis 7 C). AP-2α ekspressiooni taseme hindamiseks mõõdeti *Gata3*^{KO} ja *Gata3*$^{nlslacZ/+}$ embrüote südamete VVK mesenhüümis AP-2α^{+} rakkude tuumade fluorestsentsi intensiivsust võrreldes tuumade taustluminestsentsiga. Selleks leiti keskmine signaali tugevus 100 AP-2α^{+} tuuma kohta, millest lahutati keskmine signaali tugevus 100 AP-2α^{-} tuumas kohta. Mõõtmiste tulemusena selgus, et *Gata3*^{KO} embrüotes on keskmine intensiivsuste väärtus oluliselt madalam (4.8, $p<0.05$) kui *Gata3*$^{nlslacZ/+}$ embrüotes (6.9) (Joonis 7 F).



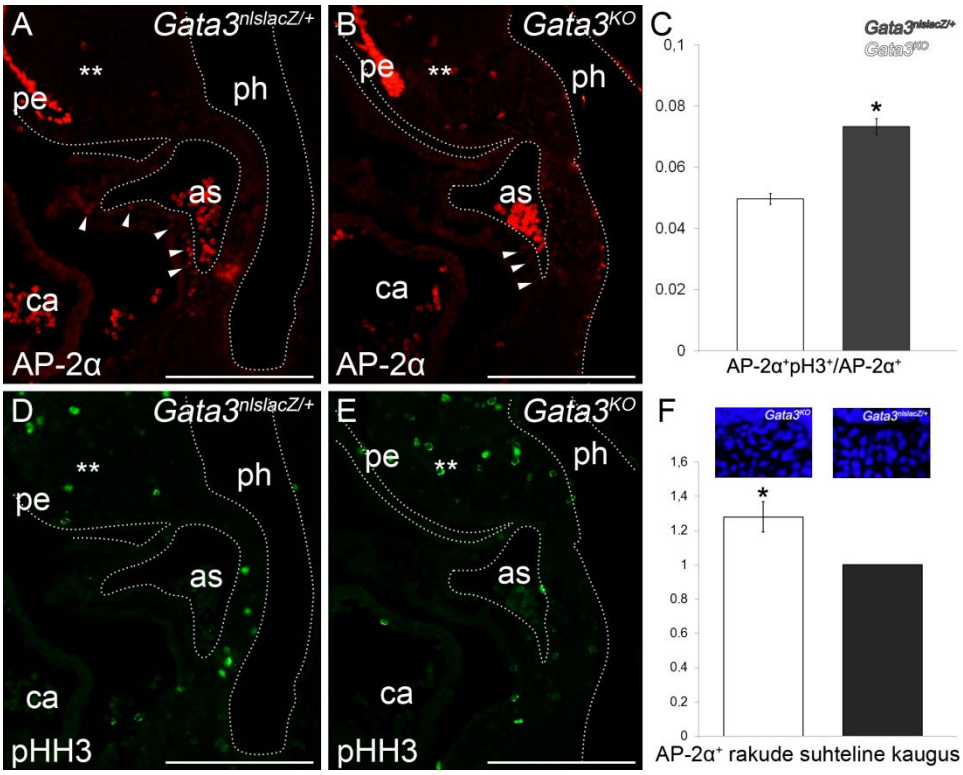
Joonis 7. AP-2α^{+} neuraalharja päritolu rakud E10.5 väljavoolukulgla endokardiaalsete padjandite mesenhüümis. **(A, D)** *Gata3*$^{nlslacZ/+}$ kontroll embrüo, (B, E) *Gata3*^{KO} embrüo. **(A, B)** Neuraalharja päritolu rakud on märgistatud AP-2α'ga (punane). **(D, E)** Rakkude tuumad märgistatud DAPI'ga (sinine). **(C)** AP-2α^{+} rakkude arvu suhe

punktiirjoonte vaheliselt alalt A'l ja B'l kõigisse mesenhüümi rakkude arvu (DAPI+ rakud) punktiirjoonte vaheliselt alalt D'l ja E'l *Gata3*$^{nlslacZ/+}$ (hall kast) ja *Gata3*^{KO} (valge kast) embrüotes (n=3). **(F)** AP-2α^{+} rakkude fluorestsentsi suhteline intensiivuses *Gata3*$^{nlslacZ/+}$ (hall kast) ja *Gata3*^{KO} (valge kast) embrüotes (n=3). **(C, F)** Veapiirideks märgitud standardhälve, tärn tähistab $p<0.05$. Lühendid: en, endokard; my, müokard; oft, väljavoolukulgla. Mõõtlõik 50 µm.

3.4. AP-2α^{+} rakkude proliferatsioon on *Gata3*^{KO} embrüotes vähenenud

Vähenenud AP-2α^{+} rakkude hulk *Gata3*^{KO} VVK endokardiaalsetes padjandites võib olla tingitud häiretest rakkude proliferatsioonil ja elumusel. Sellest tulenevalt hinnati AP-2α^{+} (Joonis 8 A, B) rakkude proliferatsioonilist aktiivsust mitoosis olevate rakkude markeriga pHH3 (*phospho histone H3*) ekspressiooni järgi (Joonis 8 D, E). Analüüsi käigus loendati E10.5 *Gata3*^{KO} ja kontrollembrüote mesenhüümis paiknevad AP-2α^{+} ja pHH3^{+} rakud ning leiti nende suhe kõigi AP-2α^{+} rakkude kohta. Tulemusena selgus, et *Gata3*^{KO} embrüotes on rakud võimelised jagunema, ent proliferatsiooni indeks võrreldes *Gata3*$^{nlslacZ/+}$ embrüotega on vähenenud 0.08'lt 0.05'le ($p<0.05$) (Joonis 8 C).

NH rakkude migratsioon toimub ühtse populatsioonina ja seetõttu paiknevad need üksteisele suhteliselt lähedal. Mõõtes AP-2α^{+} rakkude omavahelist keskmist kagugust ilmnes, et *Gata3*^{KO} embrüotes on neuraalharja päritolu rakud keskmiselt omavahel 1.23 korda kaugemal kui *Gata3*$^{nlslacZ/+}$ embrüotes (Joonis 8 F).

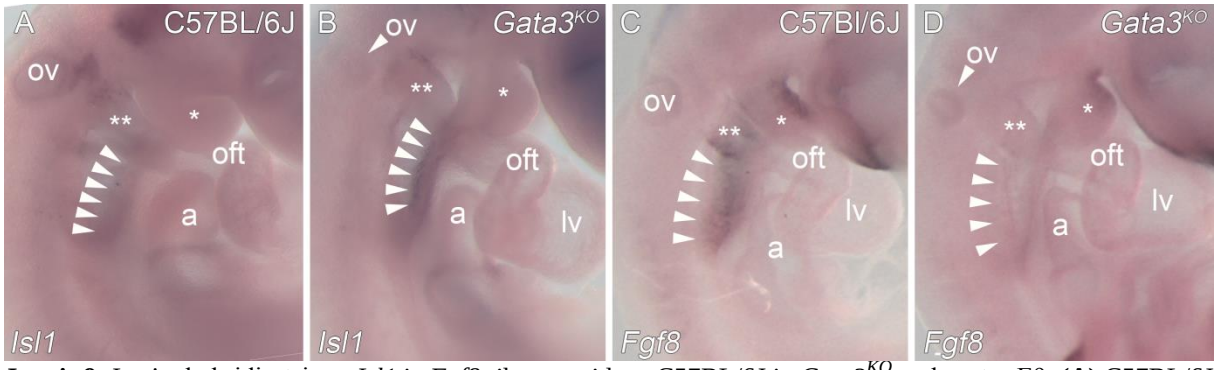


Joonis 8. AP-2α ja pHH3 kolokalisatsioon E10.5 sagitaallõikudel tähistab prolifereeruvaid neuraalharja rakke. **(A, D)** *Gata3*$^{nlslacZ/+}$ kontroll ja **(B, E)** *Gata3*^{KO} embrüo. **(A, B)** Neuraalharja päritolu rakud on märgistatud

AP-2α'ga (punane). Noolepead näitavad AP-2α^{+} rakke VVK mesenhüümis. **(D, E)** Mitootilised rakud onmärgistatud pHH3'ga (roheline). **(C)** AP-2α^{+} ja pHH3^{+} rakkude suhe *Gata3*$^{nlslacZ/+}$ (hall kast) ja *Gata3*^{KO} (valge kast) embrüotes (n=3). **(F)** *Gata3*^{KO} embrüo (valge kast) AP-2α^{+} rakkude keskmise kauguse suhe võrrelduna kontroll embrüoga (hall kast). Pildid illustreerivad analüüsitud rake. Veapiirid tähistavad standardhälvet, tärn $p<0.05$. Lühendid: as, aordikott; ca, ühine koda; pe, pinna ektoderm; ph, neel; **, 2. lõpusekaar. Punktiirjooned tähistavad struktuuride piire. Mõõtlõik 100 µm.

3.5. In situ hübridisatsioon *Fgf8* ja *Isl1* proovidega

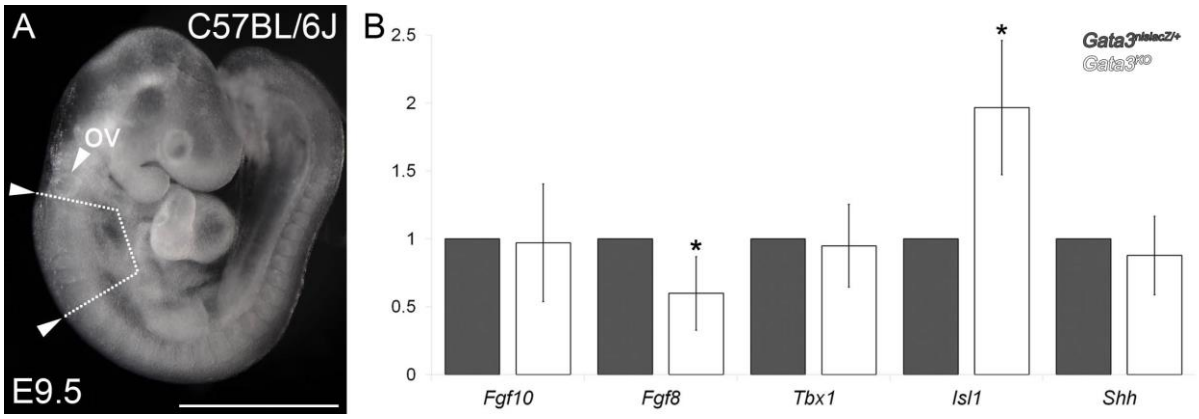
Gata3 puudusest põhjustatud VVK ja parema vatsakese hüpoplaasia molekulaarsete põhjuste selgitamiseks uuriti SSV markerite *Fgf8* ja *Isl1* ekspressiooni *in situ* hübridiseerimisega. Isl1 ja Fgf8 reguleerivad südametoru lingustumisel (E9) neelu mesenhüümi rakkude proliferatsiooni, elumust ja migratsiooni. *In situ* hübridisatsiooni tulemusena selgub, et E9 on *Fgf8* C57Bl/6J embrüotes tugevalt ekspresseerunud neelu endo- ja ektodermi rakkudes. Ekspressiooni on märgata ka neelu mesenhüümis ning distaalses VVK müokardi rakkudes. *Gata3*^{KO} embrüotes on *Fgf8* ekspressioon neelu endo- ja ektodermis märgatavalt alla reguleeritud. Samuti on ekspressioon puudulik VVK müokardis ning keha mesenhüümis. *Isl1* on C57Bl/6J embrüotes ekspresseerunud neelu endodermis ning ventraalselt neelu mesodermis. *Gata3*^{KO} embrüotes on *Isl1* ekspressioon antud piirkondades märgatavalt tugevam.



Joonis 9. *In situ* hübridisatsioon *Isl1* ja *Fgf8* riboproovidega C57BL/6J ja *Gata3*^{KO} embrüotes E9. **(A)** C57BL/6J embrüotes on märgata neelu piirkonnas (noolepead) **(B)** *Gata3*^{KO} embrüotes on ekspressioon neelu piirkonnas tugevam (noolepead). **(C)** *Fgf8* ekspressioon on märgatav E9 C57BL/6J embrüte neelu (noolepead) ja 2. lõpusekaare (*) piirkonnas. **(D)** *Gata3*^{KO} embrüotes on *Fgf8* mRNA ekspressioon kontrolliga võrreldavas piirkonnas (noolepead) vähenenud. Lühendid: a, ühine koda; lv, vasak vatsake; oft, väljavoolukulgla; ov, kõrvavesiikul; *, esimene lõpusekaar; **, teine lõpusekaar.

3.6. SSV markergeenide kvantitatiivsed muutused *Gata3*^{KO} embrüotes

Kvantitatiivseks SSV markergeenide ekspressiooni muutuste hindamiseks mõõdeti seda qRT-PCR'ga. Joonisel 10 A näidatud piirkonnad dissekteeriti välja neljast embrüost, eraldati totaalne RNA ning sünteesiti mRNA suhtes komplementaarne DNA. *Fgf8/10, Shh, Tbx1* ja *Isl1* geenide suhtelise ekspressioonitaseme analüüsil selgus, et *Gata3*^{KO} embrüotes on *Isl1* ekspressioon oluliselt kõrgem kontrollembrüotest (1.96, $p<0.05$), mis kinnitab *in situ* hübridisatsioonil saadud tulemusi (Joonis 10 B). *Tbx1* ekspressioon on võrreldav kontrollgruppi kuuluvate embrüotega (Joonis 10 B). Signaalimolekulide suhtelise ekspressioonitaseme võrdlusel ilmneb, et *Fgf8* tase on *Gata3*^{KO} embrüotes olulisel määral vähenenud (0.59, $p<0.05$). *Fgf10* ja *Shh* ekspressioonis statistiliselt olulist erinevust *Gata3*^{KO} ja C57BL/6J embrüote vahel ei ole (Joonis 10 B).



Joonis 10. Sekundaarse südamevälja markergeenide qRT-PCR. **(A)** punktiirjoonega märgitud embrüo piirkondadest, eraldati qRT-PCR'il analüüsitav RNA. **(B)** analüüsitud geenide (*Fgf10, Fgf8, Tbx1, Isl1, Shh*) mRNA'de ekspressioonitase *Gata3*^{KO} embrüotes (valge kast) võrrelduna C57BL/6J embrüotesse (hall kast). Veapiirid tähistavad standardhälvet ning tärnid $p<0.05$. Lühendid: ov, kõrvavesiikul. Mõõtlõik 1 mm.

4. ARUTELU

Gata3'e suhtes null-mutantsetel hiirtel esinevad mitmed südame arengudefektid: VSD, PTA, IAA ja DORV (Raid jt, 2009). *Cre* rekombinaasil põhinevad rakkude *fate mapping* eksperimentid on näidanud, et südame arteriaalse poole struktuuride arengudefektid saavad alguse südametoru lingustumisel (E8.5 – E10.5), mil neelu mesenhüümi rakkudest moodustuvad väljavoolukulgla, parem vatsake ning 65 – 70% ulatuses kodadest (Cai jt, 2003). Häireid rakkude proliferatsioonis, migratsioonis ja/või diferentseerumises põhjustavad kaasasündinud väärarenguid. Gata3 ekspressioon algab südame morfogeneesis osalevas piiikron E8 neelu endodermis, kust pärinevad Shh signaalid reguleerivad neelu mesenhüümi sh NH rakkude proliferatsiooni, migratsiooni ja elumust (Goddeeris jt, 2007). Shh signalisatsiooni häirimine SSV ja NH rakkudes põhjustab VVK hüpoplaasiat ning aordikaare arterite anomaaliaid (Goddeeris jt, 2007). Käesolevas töös selgus, et *Gata3*^{KO} embrüotes on NH rakkude proliferatsiooni aktiivsus ja arv oluliselt vähenenud. qRT-PCR'i tulemused aga näitasid, et E9.5 *Gata3*^{KO} embrüotes ei ole *Shh* ekspressioon võrreldes kontrolliga oluliselt muutunud. Sellest tulenevalt võib oletada, et Gata3 ei reguleeri Shh vahendatud rakkude proliferatsiooni, elumust ega migratsiooni. Teisalt ei saa välistada muutusi Shh retseptorite ekspressioonis neelu mesenhüümi rakkudes ning teiste Gata perekonna faktorite kompensatoorset toimet Shh ekspressiooni induktsioonil. Seda aitaks Shh retseptorite ja teiste Gata faktorite ekspressiooni anaalüüs südant moodustavas piirkonnas.

In situ hübridisatsiooni tulemusena selgub, et *Gata3*^{KO} embrüotes on endo- ja mesodermaalne *Fgf8* tugevalt alla reguleeritud. *Fgf8* suhtes homosügootsed null-mutantsed embrüod arenevad gastrulatsioonini (Sun jt, 1999). Konditsionaalsel *Fgf8* eemaldamisel neelu endo- ja mesodermi erinevatest populatsioonidest põhjustavad defekte VVK pikenemisel ja jagunemisel aordiks ja kopsutüveks (Ilagan jt, 2006; Park jt, 2006). *Fgf8* konditsionaalsel eemaldamisel AP-2α't ekspresseerivatest NH päritolu rakkudest põhjustab nende elumuse langust, 3., 4., ja 6 lõpusekaare arterite aplaasiat ja/või hüpoplaasiat (Macatee jt, 2003). Seetõttu võib vähenenud Fgf8 signalisatsioon ka *Gata3*^{KO} embrüotes põhjustada SSV rakkude apoptoosi ja proliferatsioni aktiivsuse langust ning sellest tulenevalt aordikaare arterite morfogeneesihäired (Tsaro jt, käsikiri). Gata3 võib ka otseselt reguleerida Fgf8 ekpsressiooni, sest teiste Gata perekonna faktorite puhul on näidatud spetsiifilisi enhancer-järjestusi *Fgf* ragulaatoraladel (Murakami jt, 2002). Gata3 seondumist *Fgf8 enhancer* järjestusele saaks kinnitada näiteks kromatiini immunosadestamise eksperimentidega.

Endo- ja mesodermaalne Fgf8 signalisatsioon osaleb ka neelu mesenhüümi ja NH rakkude migratsioonil (Sato jt, 2011). Varasemalt on näidatud, et NH rakkude migratsioon toimub

ühtse populatsioonina, kus ekspresseeritakse faktoreid, mis osalevad rakk-rakk adhesioonis ja kommunikatsioonis vajalikke valkusid: Cx40 ja Cx43 (Phillips jt, 2013; Xu jt, 2006). Vaadates NH päritolu rakkude paigutust üksteise suhtes ilmneb, et *Gata3*^{KO} pole migreeruv NH rakupopulatsioon niivõrd kondenseerunud kui seda võib näha kontrollgruppi kuuluvates *Gata3*$^{nlslacZ/+}$ embrüotes, viidates migratsiooni häiretele. Miratsioonihäiretele võib viidata ka NH rakkude väiksem osakaal *Gata3*^{KO} embrüote VVK mesenhüümis. *Gata3*^{KO} embrüote VVK mesenhüümis ei ulatu AP-2α^{+} rakud nii kaugele proksimaalsesse VVK'sse kui *Gata3*$^{nlslacZ/+}$ embrüotes. Samuti on *Gata3*^{KO} embrüote VVK mesenhüümis AP-2α^{+} rakkude suhe kõigisse mesenhümaalsetesse rakkudesse oluliselt väiksem kui kontrollembrüotes.

NH päritolu rakkude migratsiooni reguleeritakse semaforiini signaaliraja kaudu, mille retseptorid sh plexinA2 on ekspresseerunud neelu mesenhüümi rakkudes (Feiner jt, 2001). Semaforiini Sema3C (*Semaphorin 3C*) ekspresseeritakse VVK müokardis ning nii *Sema3C* kui ka *plexinA2 knock-out* embrüotes esineb PTA (Toyofuku jt, 2008). Analoogselt on NH rakkude suhtes konditsionaalsetes *Gata6 knock-out* embrüotes on semaforiinide vahendatud migratsioon häiritud, millest tulenevad sarnase fenotüübiga defektid (VSD, DORV, PTA), mis on esindatud *Gata3*^{KO} embrüotes (Kodo jt, 2009; Raid jt, 2009). Migratsiooni häiretega seotud hüpoteesi toetavad ka eksperimendid, kus on näidatud, et Gata3 reguleerib Tgf-β (*Transforming growth factor β*) märklaudvalkude ekspressiooni, mis on vajalikud rakkude migratsioonil ja epiteliaal-mesenhümaalsel transitsioonil (Blokzijl jt, 2002; Yan jt, 2010). Gata3 poolt vahendatud signalisatsiooni mehhanismide välja selgitamisel VVK ja aordikaarearterite arengul tuleks määrata rakkude polarisatsiooni ja migratsiooniga seotud faktorite (Sema3c, Tgf-β2 ja plexinA2) ekspressiooni. Rakkude migratsiooni, aga ka proliferatsiooni, spetsifikatsiooni ja diferentseerumise mehhanismide välja selgitamist võimaldavad eksperimendid lihtsamatel mudelites, milledeks on raku- ja koekultuur.

Gata3^{KO} embrüote VVK mesenhüümis on transkriptsioonifaktor AP-2α tase oluliselt madalam. AP-2α ekspressioon on migreeruvate südame NH rakkude normaalseks arenguks oluline kuna AP-2α null-mutantsetes embrüotes esinevad lõpusekaare arterite ja VVK arenguhäired (Brewer jt, 2002). Seega võib olla AP-2α oluline vahelüli Gata3 signalisatsioonirajal, mis tingib migreeruvate rakkude proliferatsiooni ja migratsiooni häireid neelu mesenhüümis, tingides omakorda aordikaare arterite arenguhäireid, VVK hüpoplaasiat, DORV'i ja PTA'd.

Käesolevas töös hinnati *Gata3*^{KO} embrüotes peamiste SSV markerite ekspressiooni taset ning mustrit. *Isl1* ekspressioon on vajalik südame eellasrakkude (nii esimese kui ka teise südamevälja) potentsiaali säilimiseks ja proliferatsiooniks, mis toimub Fgf8 signalisatsiooni

kaudu (Park jt, 2006). Hiljuti on näidatud, et Isl1 on ekspresseerunud ka NH päritolu rakkudes (Engleka jt, 2012). *In situ* hübridisatsiooni ja qRT-PCR'i tulemused näitavad, et *Gata3*^{KO} embrüotes on *Fgf8* signaal teises südameväljas alla reguleeritud ning *Isl1*, mis positiivselt reguleerib Fgf8 ekspressiooni, on üles reguleeritud Võimalik, et vähenenud *Fgf8* tase *Gata3*^{KO} embrüotes võib olla tingitud teiste ülalvoolu paiknevate elementide regulatsiooni häiretest. Seetõttu hinnati *Tbx1* ekspressiooni, mis otseselt reguleerib Fgf8 signalisatsiooni vahendatud rakkude proliferatsiooni SSV rakkudes (Chen jt, 2009). Tulemusena selgus, et *Gata3*^{KO} embrüotes on ekspressiooni tase võrreldav kontroll embrüotega (Joonis 10 B) ning seetõttu Gata3 ei koopereeru Tbx1'ga aktiveerimaks *Fgf8* ekspressiooni.

Tuginedes saadud tulemustele saab oletada, et Fgf8 ja Isl1 vahel eksisteerib retsiprookne positiivne tagasiside mehhanism, mis indutseerib rakkude proliferatsiooni, et tagada *Gata3*^{KO} embrüotes piisav eellasrakkude hulk. Seega kui ühe faktori ekspressioonitase väheneb, reguleeritakse teise faktori ekspressioonitase üles. On vähe tõenäone, et Gata3 reguleerib otse *Isl1* ekspressiooni, kuna Gata seondumisdomeen *Isl1* regulaatorala DNA'l pole varasemates uurimustes neelu mesenhüümi rakkudes näidatud. Küll aga reguleerivad Isl1 ja Gata faktorid neelu mesenhüümi migratsiooni järgset diferentseerumist aktiveerides *Mef2c* transkriptsiooni (Dodou jt, 2004). Lisaks on näidatud teiste Gata perekonna faktorite kooperatiivset toimet Baf60c'ga hoides neelu mesenhüümi rakkudes positiivse tagasiside kaudu Nkx2.5 ekspressiooni (Lickert jt, 2004; Zeisberg jt, 2005). *Nkx2.5* null-mutantsetes embrüotes esinevad lingustumise defektid, mis viivad DORV'i tekkele. Prall jt (2007) näitasid, et *Nkx2.5 knock-out* embrüote neelu mesodermis on eellasrakkude spetiifilised markerid sh Isl1 ekspressioon tugevalt (4 korda) üles reguleeritud. Edasised eksperimendid näitasid, et toimub Bmp signaalide poolt vahendatud spetsifikatsioon ning proliferatsiooni vähenemine, mis tekitab VVK arengudefekte (Prall jt, 2007). Sellest tulenevalt on võimalik, et Gata3 puudumisel suunatakse neelu mesenhüümi rakud enneaegselt diferentseeruma, mis seletab Fgf8 alla regulatsiooni ja vähenenud NH ning SSV piirkonna rakkude proliferatsiooni. Sarnast Gata3’e funktsiooni on näidatud neeru juha rakkude arengul, kus *Gata3* puudumisel suunatakse eellasrakud enneaegselt diferenteseeruma (Grote jt, 2008). Sarnaselt *Nkx2.5 knock-out* embrüotele on ka *Gata3* null-mutantsetes SSV derivaatides *Wnt11* ekspressioon alla reguleeritud (Raid jt, 2009). Täpsemaks mehhanismide kirjeldamiseks tuleks analüüsida kardiomüotsüütide spetsifikatsioonil või diferentseerumisel osalevate *Nkx2.5, Mef2c* ja *Bmp2/4* markerite ekspressiooni.

Fgf10 on tuntud SSV rakkude markerina ja sisekõrva morfogeneesil reguleerib Gata3 just Fgf10 transkriptsiooni (Kelly jt, 2001; Lilleväli jt, 2007). Fgf8 ja Fgf10 funktsioon osaliselt

kattub ning nende kaksik haplopuudulikkus põhjustab VVK, parema vatsakese ja aordikaare arterite arenguhäired (Yusuke Watanabe et al., 2010). Sellest johtuvalt mõõdeti *Gata3*^{KO} embrüotes *Fgf10* taset ning ilmneb, et selle ekspressioon on võrreldav kontrollembrüotega. Kuna on näidatud, et Gata perekonna TF'id seonduvad ja reguleerivad Fgf10 transkriptsiooni, ei saa välistada teiste faktorite kompenseerivat toimet Gata3 puudumisele neelu mesenhüümi rakkudes. Gata3 funktsiooni mesodermaalse ja/või neuraalharja rakkude täpsemaks kirjeldamiseks tuleks kasutada *lox*'itud *Gata3* järjestusega hiireliini, mis võimaldab eemaldada *Gata3* erinevatest embrüonaalsetest struktuuridest nagu on seda näidanud sisekõrvas, silmas ja arterite arengul.

KOKKUVÕTE

Käesolevas magistritöös püüdsime leida vastust küsimusele, mis tingib *Gata3*'e suhtes null-mutantsetel hiirtel (*Mus musculus*) definitiivse südame arengudefektid: vatsakeste vaheseina defekt, persistentne aorditüvi ja topelt väljavool paremast vatsakesest. Gata3 on südametoru lingustumise ajal (E8.5-10.5) ekspresseerunud südame arengu seisukohalt olulistes embrüo kompartmentides: neelu endodermis, splanhnilises mesenhüümis ning väljavoolukulgla endokardiaalsetes padjandites. Esmalt ilmub *Gata3-nls-lacz* ekspressioon ventraalse endodermi mediaalsesse ossa aga E8. qRT-PCR ja *in situ* hübridisatsiooni tulemused näitavad, et sekundaarse südamevälja piirkonnas on $Gata3^{KO}$ embrüotes *Fgf8* alla reguleeritud ja *Isl1* üles reguleeritud, *Fgf10, Shh* ja *Tbx1* tase ei ole muutunud. Selline faktorite ekspressioonimuster võib põhjustada neelu mesenhüümi rakkude enneaegset diferentseerumist, mis omakorda viib südame väärarenguteni. *Fgf8* alla regulatsioonist võivad olla tingitud AP-2α^{+} neuraalharja rakkude vähenenud proliferatsioonitase ning migratsioonihäire väljavoolukulglasse. Viimasele viitab AP-2α^{+} rakkude väiksem osakaal $Gata3^{KO}$ embrüote väljavoolukulgla mesenhüümis. Samuti on langenud transkriptsioonifaktor AP-2α ekspressioonitase väljavoolukulgla mesenhüümis. Seega antud magistritöö tulemuste põhjal võib öelda, et $Gata3^{KO}$ embrüote südame arengut reguleervates piirkondades on muutunud nii *Fgf8* ja *Isl1* kui ka AP-2α ekspressioonimuster või –tase.

SUMMARY

Gata3 regulates arterial heart pole development in mice (Mus musculus)

Toomas Jagomäe

Formation of the cardiovascular system is a complex process gathering specification, proliferation and differentiation of mesodermal and ecto-mesenchymal cells into myriad cell types of the heart. It is thought that congenital heart defects are caused by disequilibrium between differentiation and proliferation of the extracardiac progenitor pool during looping stages. These progenitors migrate into embryonic heart, forming majority of ascending aorta, pulmonary arterie, left ventricle and atria. Thereafter it is crucial to study signaling- and transcriptional networks controlling the development of multipotent stem cells in order to reason congenital heart defects and devise genetic- and cell therapies.

In mice (*Mus musculus*) homozygous mutations of the *Gata3* renders several defects in heart: ventricular septal defect, persistent truncus arteriosus and double outlet from right ventricle. It has been suggested that defects arise from the hypoplastic outflow tract and insufficient rotation of truncus arteriosus during cardiac looping. Gata3 has been shown to regulate the development of inner ear, kidneys, nervous system, adrenal glands, thyroid gland and thymus. Haploinsuffiency of GATA3 in humans causes Barakat syndrome which gathers sensorineural deafness, renal disease, hypoparathyroidism and in some cases ventricular septal defects.

Thereafter in this master thesis we studied the regulatory function of Gata3 in context of the heart development. Based on the results Gata3 is expressed in spatio-temporal manner in regions associated with the heart development. First of all, at E8 expression is seen at in ventral pharyngeal endoderm and during development at E9.5 it expands into lateral splachnic mesoderm. Prior to aorticopulmonary septation at E10.5 strong expression is seen in the endocardial cushions of outflowtract. Drawn on the outcome of qRT-PCR and *in situ* hybridization results, the expression of *Fgf8* is downregulated and *Isl1* is upregulated in *Gata3*^{KO}, which may cause premature differentiation of pharyngeal and neural crest cells. Decreased proliferation and migration of neural crest derived cells in *Gata3*^{KO} mice may be caused by the *Fgf8* expression downregulation. Hypoplastic outflowtract and insufficient looping in *Gata3*^{KO} embryos may be caused disoriented development of these two cell populations.

TÄNUSÕNAD

Tänan oma juhendajaid Raivo Raidi ja Kaire Tsarot, kes on antud teose nii mitmeski mõttes võimalikuks teinud. Sealhulgas soovin tänada arengubioloogia õppetooli juhatajat Prof Margus Poogat.

Lisaks soovin tänada arengubioloogia õppetooli teadlasi: Kärt Padarit, Tambet Tõnissood ja Riho Meierit, kelle pigem rohkem, kui vähem kriitilised kommentaarid olid abiks ka töö valmimisel. Metoodika selgitamise eest tänusõnad õppetooli doktorantidele: Helerin Margusele, Katrin Ruisule, Keiu Kasele, Janely Paele, Carmen Juksile ja Sirje Lullale. Mitte ilmtingimata selles järjekorras.

Viimaks tänusõnad TÜMRI vivaariumi töötajatele Sulev Kuusele, Sirje Kasele ja Mari Leele.

KASUTATUD KIRJANDUS

Alvarado, D. M., Veile, R., Speck, J., Warchol, M., & Lovett, M. (2009). Downstream targets of GATA3 in the vestibular sensory organs of the inner ear. *Developmental Dynamics : An Official Publication of the American Association of Anatomists*, *238*(12), 3093–102. doi:10.1002/dvdy.22149

Appler, J. M., Lu, C. C., Druckenbrod, N. R., Yu, W.-M., Koundakjijan, E. J., & Goodrich, L. V. (2013). Gata3 is a critical regulator of cochlear wiring. *J Neurosci.*, *33*(8), 3679–3691. doi:10.1523/JNEUROSCI.4703-12.2013.Gata3

Arima, Y., Miyagawa-Tomita, S., Maeda, K., Asai, R., Seya, D., Minoux, M., … Kurihara, H. (2012). Preotic neural crest cells contribute to coronary artery smooth muscle involving endothelin signalling. *Nature Communications*, *3*(May), 1267. doi:10.1038/ncomms2258

Bates, D. L., Chen, Y., Kim, G., Guo, L., & Chen, L. (2008). Crystal structures of multiple GATA zinc fingers bound to DNA reveal new insights into DNA recognition and self-association by GATA. *Journal of Molecular Biology*, *381*(5), 1292–306. doi:10.1016/j.jmb.2008.06.072

Blokzijl, A., ten Dijke, P., & Ibáñez, C. F. (2002). Physical and functional interaction between GATA-3 and Smad3 allows TGF-beta regulation of GATA target genes. *Current Biology : CB*, *12*(1), 35–45. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11790301

Bondue, A., & Blanpain, C. (2010). Mesp1: A key regulator of cardiovascular lineage commitment. *Circulation Research*, *107*, 1414–1427. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.227058

Bondue, A., Lapouge, G., Paulissen, C., Semeraro, C., Iacovino, M., Kyba, M., & Blanpain, C. (2008). Mesp1 acts as a master regulator of multipotent cardiovascular progenitor specification. *Cell Stem Cell*, *3*(July), 69–84. doi:10.1016/j.stem.2008.06.009

Brand, T. (2003). Heart development: Molecular insights into cardiac specification and early morphogenesis. *Developmental Biology*, *258*, 1–19. doi:10.1016/S0012-1606(03)00112-X

Brewer, S., Jiang, X., Donaldson, S., Williams, T., & Sucov, H. M. (2002). Requirement for AP-2alpha in cardiac outflow tract morphogenesis. *Mechanisms of Development*, *110*(1-2), 139–149. doi:S0925477301005792 [pii]

Bruneau, B. G., Nemer, G., Schmitt, J. P., Charron, F., Robitaille, L., Caron, S., … Seidman, J. G. (2001). A murine model of Holt-Oram syndrome defines roles of the T-Box transcription factor Tbx5 in cardiogenesis and disease. *Cell*, *106*, 709–721. doi:10.1016/S0092-8674(01)00493-7

Bruneau, B. G., Wu, D. K., Kelley, M. W., Tam, P. L., Nichols, J., & Smith, A. (2013). Signaling and Transcriptional Networks in Heart Development and Regeneration. doi:10.1101/cshperspect.a008292

Buckingham, M., Meilhac, S., & Zaffran, S. (2005). Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nature Reviews. Genetics*, *6*(November), 826–835. doi:10.1038/nrg1710

Cai, C. L., Liang, X., Shi, Y., Chu, P. H., Pfaff, S. L., Chen, J., & Evans, S. (2003). Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Developmental Cell*, *5*, 877–889. doi:10.1016/S1534-5807(03)00363-0

Chen, L., Fulcoli, F. G., Tang, S., & Baldini, A. (2009). Tbx1 regulates proliferation and differentiation of multipotent heart progenitors. *Circulation Research*, *105*, 842–851. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.200295

Chen, Y.-H., Ishii, M., Sun, J., Sucov, H. M., & Maxson, R. E. (2007). Msx1 and Msx2 regulate survival of secondary heart field precursors and post-migratory proliferation of cardiac neural crest in the outflow tract. *Developmental Biology*, *308*(2), 421–37. doi:10.1016/j.ydbio.2007.05.037

Ciruna, B., & Rossant, J. (2001). FGF Signaling Regulates Mesoderm Cell Fate Specification and Morphogenetic Movement at the Primitive Streak. *Developmental Cell*, *1*, 37–49. doi:10.1016/S1534-5807(01)00017-X

Clark, C. D., Zhang, B., Lee, B., Evans, S. I., Andrew, B., & Lee, K. (2013). Evolutionary Conservation of Nkx2.5 Autoregulation in the Second Heart Field. *Developmental Biology*, *374*(1), 198–209. doi:10.1016/j.ydbio.2012.11.007.Evolutionary

Cohen, E. D., Miller, M. F., Wang, Z., Moon, R. T., & Morrisey, E. E. (2012). Wnt5a and Wnt11 are essential for second heart field progenitor development. *Development*, *139*, 1931–1940. doi:10.1242/dev.069377

Cohen, E. D., Wang, Z., Lepore, J. J., Lu, M. M., Taketo, M. M., Epstein, D. J., & Morrisey, E. E. (2007). Wnt/β-catenin signaling promotes expansion of Isl-1–positive cardiac progenitor cells through regulation of FGF signaling. *The Journal of Clinical Investigation*, *117*(7), 1794–804. doi:10.1172/JCI31731.1794

Cyganek, L., Chen, S., Borchert, T., & Guan, K. (2013). Cardiac Progenitor Cells and their Therapeutic Application for Cardiac Repair. *Journal of Clinical & Experimental Cardiology*, *01*(S11). doi:10.4172/2155-9880.S11-008

Dodou, E., Verzi, M. P., Anderson, J. P., Xu, S.-M., & Black, B. L. (2004). Mef2c is a direct transcriptional target of ISL1 and GATA factors in the anterior heart field during mouse embryonic development. *Development (Cambridge, England)*, *131*, 3931–3942. doi:10.1242/dev.01256

Engleka, K. a., Manderfield, L. J., Brust, R. D., Li, L., Cohen, A., Dymecki, S. M., & Epstein, J. a. (2012). Islet1 derivatives in the heart are of both neural crest and second heart field origin. *Circulation Research*, *110*(7), 922–926. doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.266510

Evans, S. M., Yelon, D., Conlon, F. L., & Kirby, M. L. (2010). Myocardial lineage development. *Circulation Research*, *107*, 1428–1444.

doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.227405

Feiner, L., Webber, A. L., Brown, C. B., Lu, M. M., Jia, L., Feinstein, P., … Raper, J. A. (2001). Semaphorin 3C and cardiac development. *Development (Cambridge, England)*, *128*, 3061–3070.

George, K. M., Leonard, M. W., Roth, M. E., Lieuw, K. H., Kioussis, D., Grosveld, F., & Engel, J. D. (1994). Embryonic expression and cloning of the murine GATA-3 gene. *Development (Cambridge, England)*, *120*(9), 2673–86. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7956841

Goddeeris, M. M., Schwartz, R., Klingensmith, J., & Meyers, E. N. (2007). Independent requirements for Hedgehog signaling by both the anterior heart field and neural crest cells for outflow tract development. *Development (Cambridge, England)*, *134*, 1593–1604. doi:10.1242/dev.02824

Gottlieb, P. D., Pierce, S. a, Sims, R. J., Yamagishi, H., Weihe, E. K., Harriss, J. V, … Srivastava, D. (2002). Bop encodes a muscle-restricted protein containing MYND and SET domains and is essential for cardiac differentiation and morphogenesis. *Nature Genetics*, *31*(1), 25–32. doi:10.1038/ng866

Grote, D., Boualia, S. K., Souabni, A., Merkel, C., Chi, X., Costantini, F., … Bouchard, M. (2008). Gata3 acts downstream of beta-catenin signaling to prevent ectopic metanephric kidney induction. *PLoS Genetics*, *4*(12), e1000316. doi:10.1371/journal.pgen.1000316

Harigae, H. (2006). GATA Transcription Factors and Hematological Diseases. *Journal of Experimental Medicine*, *210*, 1–9.

Heallen, T., Zhang, M., Wang, J., Bonilla-Claudio, M., Klysik, E., Johnson, R. L., & Martin, J. F. (2011). Hippo pathway inhibits Wnt signaling to restrain cardiomyocyte proliferation and heart size. *Science (New York, N.Y.)*, *332*(6028), 458–461. doi:10.1126/science.1199010

Hoffmann, A. D., Peterson, M. a, Friedland-Little, J. M., Anderson, S. a, & Moskowitz, I. P. (2009). Sonic Hedgehog Is Required in Pulmonary Endoderm for Atrial Septation. *Development (Cambridge, England)*, *136*(10), 1761–1770. doi:10.1242/dev.034157

Hutson, M. R., Zhang, P., Stadt, H. a., Sato, A. K., Li, Y. X., Burch, J., … Kirby, M. L. (2006). Cardiac arterial pole alignment is sensitive to FGF8 signaling in the pharynx. *Developmental Biology*, *295*, 486–497. doi:10.1016/j.ydbio.2006.02.052

Ilagan, R., Abu-Issa, R., Brown, D., Yang, Y.-P., Jiao, K., Schwartz, R. J., … Meyers, E. N. (2006). Fgf8 is required for anterior heart field development. *Development (Cambridge, England)*, *133*, 2435–2445. doi:10.1242/dev.02408

Jiang, X., Rowitch, D. H., Soriano, P., McMahon, a P., & Sucov, H. M. (2000). Fate of the mammalian cardiac neural crest. *Development (Cambridge, England)*, *127*(8), 1607–1616.

Johnson, R. L., & Martin, J. F. (2011). Proliferation and Heart Size, (April), 458–461.

Kelly, R. G., Brown, N. a., & Buckingham, M. E. (2001). The Arterial Pole of the Mouse Heart Forms from Fgf10-Expressing Cells in Pharyngeal Mesoderm. *Developmental Cell*, *1*(3), 435–440. doi:10.1016/S1534-5807(01)00040-5

Kirby, M. L., & Hutson, M. R. (2010). Factors controlling cardiac neural crest cell migration. *Cell Adhesion & Migration*, *4*(4), 609–621. doi:10.4161/cam.4.4.13489

Kitajima, S., Takagi, a, Inoue, T., & Saga, Y. (2000). MesP1 and MesP2 are essential for the development of cardiac mesoderm. *Development (Cambridge, England)*, *127*, 3215–3226.

Kodo, K., Nishizawa, T., Furutani, M., Arai, S., Yamamura, E., Joo, K., … Yamagishi, H. (2009). GATA6 mutations cause human cardiac outflow tract defects by disrupting semaphorin-plexin signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(33), 13933–13938. doi:10.1073/pnas.0904744106

Laforest, B., Andelfinger, G., & Nemer, M. (2011). Loss of Gata5 in mice leads to bicuspid aortic valve. *Journal of Clinical Investigation*, *121*(7), 2876–2887. doi:10.1172/JCI44555

Laforest, B., & Nemer, M. (2011). GATA5 interacts with GATA4 and GATA6 in outflow tract development. *Developmental Biology*, *358*(2), 368–378. doi:10.1016/j.ydbio.2011.07.037

Lickert, H., Takeuchi, J. K., Von Both, I., Walls, J. R., McAuliffe, F., Adamson, S. L., … Bruneau, B. G. (2004). Baf60c is essential for function of BAF chromatin remodelling complexes in heart development. *Nature*, *432*(7013), 107–112. doi:10.1038/nature03071

Lieuw, K. H., Li, G. L., Zhou, Y., Grosveld, F., & Engel, J. D. (1997). Temporal and spatial control of murine GATA-3 transcription by promoter-proximal regulatory elements. *Developmental Biology*, *188*(1), 1–16. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9245507

Lilleväli, K., Haugas, M., Pituello, F., & Salminen, M. (2007). Comparative analysis of Gata3 and Gata2 expression during chicken inner ear development. *Developmental Dynamics : An Official Publication of the American Association of Anatomists*, *236*(1), 306–13. doi:10.1002/dvdy.21011

Lilleväli, K., Matilainen, T., Karis, A., & Salminen, M. (2004). Partially overlapping expression of Gata2 and Gata3 during inner ear development. *Developmental Dynamics : An Official Publication of the American Association of Anatomists*, *231*(4), 775–81. doi:10.1002/dvdy.20185

Lim, K. C., Lakshmanan, G., Crawford, S. E., Gu, Y., Grosveld, F., & Engel, J. D. (2000). Gata3 loss leads to embryonic lethality due to noradrenaline deficiency of the sympathetic nervous system. *Nature Genetics*, *25*(2), 209–212. doi:10.1038/76080

Liu, W., Selever, J., Wang, D., Lu, M.-F., Moses, K. a, Schwartz, R. J., & Martin, J. F. (2004). Bmp4 signaling is required for outflow-tract septation and branchial-arch artery remodeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*

America, *101*(13), 4489–4494. doi:10.1073/pnas.0308466101

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, *25*, 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262

Lowry, J. A., & Atchley, W. R. (2000). Molecular Evolution of the GATA Family of Transcription Factors: Conservation Within the DNA-Binding Domain, 103–115. doi:10.1007/s002399910012

Macatee, T. L., Hammond, B. P., Arenkiel, B. R., Francis, L., Frank, D. U., & Moon, A. M. (2003). Ablation of specific expression domains reveals discrete functions of ectoderm- and endoderm-derived FGF8 during cardiovascular and pharyngeal development. *Development (Cambridge, England)*, *130*(25), 6361–6374. doi:10.1242/dev.00850

Manaia, A., Lemarchandel, V., Klaine, M., Max-Audit, I., Romeo, P., Dieterlen-Lièvre, F., & Godin, I. (2000). Lmo2 and GATA-3 associated expression in intraembryonic hemogenic sites. *Development (Cambridge, England)*, *127*(3), 643–53. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10631184

Mariani, F. V, Ahn, C. P., & Martin, G. R. (2008). Genetic evidence that FGFs have an instructive role in limb proximal-distal patterning. *Nature*, *453*(7193), 401–405. doi:10.1038/nature06876

McCulley, D. J., & Black, B. L. (2012). Transcription Factor Pathways and Congenital Heart Disease. *Current Topics in Developmental Biology*, *100*(415), 253–277. doi:10.1016/B978-0-12-387786-4.00008-7.Transcription

Mesbah, K., Rana, M. S., Francou, A., Van Duijvenboden, K., Papaioannou, V. E., Moorman, A. F., … Christoffels, V. M. (2012). Identification of a Tbx1/Tbx2/Tbx3 genetic pathway governing pharyngeal and arterial pole morphogenesis. *Human Molecular Genetics*, *21*(6), 1217–1229. doi:10.1093/hmg/ddr553

Moriguchi, T., Takako, N., Hamada, M., Maeda, A., Fujioka, Y., Kuroha, T., … Engel, J. D. (2006). Gata3 participates in a complex transcriptional feedback network to regulate sympathoadrenal differentiation. *Development (Cambridge, England)*, *133*(19), 3871–81. doi:10.1242/dev.02553

Murakami, A., Ishida, S., Dickson, C. (2002) GATA-4 interacts distinctively with negative and positive regulatory elements in the Fgf-3 promoter. Nucl. Acids Res., 30 (4), 1056-1064

Muroya, K., Hasegawa, T., Ito, Y., Nagai, T., Isotani, H., Iwata, Y., … Ogata, T. (2001). GATA3 abnormalities and the phenotypic spectrum of HDR syndrome. *Journal of Medical Genetics*, *38*(6), 374–80. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1734904&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Nardelli, J., Thiesson, D., Fujiwara, Y., Tsai, F. Y., & Orkin, S. H. (1999). Expression and genetic interaction of transcription factors GATA-2 and GATA-3 during development of

the mouse central nervous system. *Developmental Biology*, *210*(2), 305–21. doi:10.1006/dbio.1999.9278

Nemer, G., Fadlalah, F., Usta, J., Nemer, M., Dbaibo, G., Obeid, M., & Bitar, F. (2006). A novel mutation in the GATA4 gene in patients with Tetralogy of Fallot. *Human Mutation*, *881*(July 2005), 1–12. doi:10.1002/humu.9410

Pandolfi, P. P., E., R. M., Karis, A., Leonard, M. W., Dzierzak, E., Grosveld, F. G., … Lindenbaum, M. H. (1995). Targeted disruption of the GATA3 gene causes severe abnormalities in the nervous system and in fetal liver haematopoesis. *Nature Genetics*, *11*.

Park, E. J., Ogden, L. a, Talbot, A., Evans, S., Cai, C.-L., Black, B. L., … Moon, A. M. (2006). Required, tissue-specific roles for Fgf8 in outflow tract formation and remodeling. *Development (Cambridge, England)*, *133*(12), 2419–33. doi:10.1242/dev.02367

Pata, I., Studer, M., van Doorninck, J. H., Briscoe, J., Kuuse, S., Engel, J. D., … Karis, a. (1999). The transcription factor GATA3 is a downstream effector of Hoxb1 specification in rhombomere 4. *Development (Cambridge, England)*, *126*(23), 5523–31. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10556076

Phan, D., Rasmussen, T. L., Nakagawa, O., McAnally, J., Gottlieb, P. D., Tucker, P. W., … Olson, E. N. (2005). BOP, a regulator of right ventricular heart development, is a direct transcriptional target of MEF2C in the developing heart. *Development (Cambridge, England)*, *132*(11), 2669–2678. doi:10.1242/dev.01849

Phillips, H. M., Mahendran, P., Singh, E., Anderson, R. H., Chaudhry, B., & Henderson, D. J. (2013). Neural crest cells are required for correct positioning of the developing outflow cushions and pattern the arterial valve leaflets. *Cardiovascular Research*, *99*(3), 452–60. doi:10.1093/cvr/cvt132

Prall, O. W. J., Menon, M. K., Solloway, M. J., Watanabe, Y., Zaffran, S., Bajolle, F., … Harvey, R. P. (2007). An Nkx2-5/Bmp2/Smad1 negative feedback loop controls heart progenitor specification and proliferation. *Cell*, *128*(5), 947–59. doi:10.1016/j.cell.2007.01.042

Raid, R., Krinka, D., Bakhoff, L., Abdelwahid, E., Jokinen, E., Kärner, M., … Karis, A. (2009). Lack of Gata3 results in conotruncal heart anomalies in mouse. *Mechanisms of Development*, *126*(1-2), 80 – 89. doi:10.1016/j.mod.2008.10.001

Rochais, F., Mesbah, K., & Kelly, R. G. (2009). Signaling pathways controlling second heart field development. *Circulation Research*, *104*(8), 933–42. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.194464

Rojas, A., Kong, S. W., Agarwal, P., Gilliss, B., Pu, W. T., & Black, B. L. (2008). GATA4 is a direct transcriptional activator of cyclin D2 and Cdk4 and is required for cardiomyocyte proliferation in anterior heart field-derived myocardium. *Molecular and Cellular Biology*, *28*(17), 5420–31. doi:10.1128/MCB.00717-08

Saga, Y., Hata, N., Kobayashi, S., Magnuson, T., Seldin, M. F., & Taketo, M. M. (1996). MesP1: a novel basic helix-loop-helix protein expressed in the nascent mesodermal cells during mouse gastrulation. *Development (Cambridge, England)*, *122*(9), 2769–78. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8787751

Saga, Y., Miyagawa-Tomita, S., Takagi, a, Kitajima, S., Miyazaki, J. I., & Inoue, T. (1999). MesP1 is expressed in the heart precursor cells and required for the formation of a single heart tube. *Development (Cambridge, England)*, *126*(15), 3437–47. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10393122

Sato, A., Scholl, A. M., Kuhn, E. B., Stadt, H. a., Decker, J. R., Pegram, K., … Kirby, M. L. (2011). FGF8 signaling is chemotactic for cardiac neural crest cells. *Developmental Biology*, *354*(1), 18–30. doi:10.1016/j.ydbio.2011.03.010

Singh, M. K., Li, Y., Li, S., Cobb, R. M., Zhou, D., Lu, M. M., … Gruber, P. J. (2010). Gata4 and Gata5 cooperatively regulate cardiac myocyte proliferation in mice. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(3), 1765–1772. doi:10.1074/jbc.M109.038539

Später, D., Abramczuk, M. K., Buac, K., Zangi, L., Stachel, M. W., Clarke, J., … Chien, K. R. (2013). A HCN4+ cardiomyogenic progenitor derived from the first heart field and human pluripotent stem cells. *Nature Cell Biology*, *15*(9), 1098–106. doi:10.1038/ncb2824

Sun, X., Meyers, E. N., Lewandoski, M., & Martin, G. R. (1999). Targeted Disruption of the Fgf8 causes failure of cell migration in the gastrulating mouse embryo. *Genes & Development*, *13*, 1834–1846.

Tian, X., Hu, T., He, L., Zhang, H., Huang, X., Poelmann, R. E., … Zhou, B. (2013). Peritruncal coronary endothelial cells contribute to proximal coronary artery stems and their aortic orifices in the mouse heart. *PloS One*, *8*(11), e80857. doi:10.1371/journal.pone.0080857

Tirosh-Finkel, L., Zeisel, A., Brodt-Ivenshitz, M., Shamai, A., Yao, Z., Seger, R., … Tzahor, E. (2010). BMP-mediated inhibition of FGF signaling promotes cardiomyocyte differentiation of anterior heart field progenitors. *Development (Cambridge, England)*, *137*(18), 2989–3000. doi:10.1242/dev.051649

Tomita, Y., Matsumura, K., Wakamatsu, Y., Matsuzaki, Y., Shibuya, I., Kawaguchi, H., … Fukuda, K. (2005). Cardiac neural crest cells contribute to the dormant multipotent stem cell in the mammalian heart. *The Journal of Cell Biology*, *170*(7), 1135–46. doi:10.1083/jcb.200504061

Toyofuku, T., Yoshida, J., Sugimoto, T., Yamamoto, M., Makino, N., Takamatsu, H., … Kikutani, H. (2008). Repulsive and attractive semaphorins cooperate to direct the navigation of cardiac neural crest cells. *Developmental Biology*, *321*(1), 251–62. doi:10.1016/j.ydbio.2008.06.028

Tsarovina, K., Reiff, T., Stubbusch, J., Kurek, D., Grosveld, F. G., Parlato, R., … Rohrer, H. (2010). The Gata3 transcription factor is required for the survival of embryonic and adult

sympathetic neurons. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *30*(32), 10833–43. doi:10.1523/JNEUROSCI.0175-10.2010

Van den Berg, G., Abu-Issa, R., de Boer, B. a, Hutson, M. R., de Boer, P. a J., Soufan, A. T., … Moorman, A. F. M. (2009). A caudal proliferating growth center contributes to both poles of the forming heart tube. *Circulation Research*, *104*(2), 179 – 188. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.185843

Van Vliet, P., Wu, S. M., Zaffran, S., & Pucéat, M. (2012). Early cardiac development: A view from stem cells to embryos. *Cardiovascular Research*, *96*, 352–362. doi:10.1093/cvr/cvs270

Waldo, K. L., Kumiski, D. H., Wallis, K. T., Stadt, H. a, Hutson, M. R., Platt, D. H., & Kirby, M. L. (2001). Conotruncal myocardium arises from a secondary heart field. *Development (Cambridge, England)*, *128*(16), 3179–88. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11688566

Wang, J., Greene, S. B., Bonilla-Claudio, M., Tao, Y., Zhang, J., Bai, Y., … Martin, J. F. (2010). Bmp Signaling Regulates Myocardial Differentiation from Cardiac Progenitors Through a MicroRNA-Mediated Mechanism. *Developmental Cell*, *19*(6), 903–912. doi:10.1016/j.devcel.2010.10.022

Wang, J., Luo, X., Xin, Y., Liu, Y., Liu, Z., Wang, Q., … Yang, Y. (2012). Novel GATA6 Mutations Associated with Congenital Ventricular Septal Defect or Tetralogy of Fallot, *31*(11), 1610–1617. doi:10.1089/dna.2012.1814

Watanabe, Y., Miyagawa-Tomita, S., Vincent, S. D., Kelly, R. G., Moon, A. M., & Buckingham, M. E. (2010). Role of mesodermal FGF8 and FGF10 overlaps in the development of the arterial pole of the heart and pharyngeal arch arteries. *Circulation Research*, *106*(3), 495–503. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.201665

Watanabe, Y., Zaffran, S., Kuroiwa, A., Higuchi, H., Ogura, T., Harvey, R. P., … Buckingham, M. (2012). Fibroblast growth factor 10 gene regulation in the second heart field by Tbx1, Nkx2-5, and Islet1 reveals a genetic switch for down-regulation in the myocardium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(45), 18273–18280. doi:10.1073/pnas.1215360109

Watt, A. J., Battle, M. a, Li, J., & Duncan, S. a. (2004). GATA4 is essential for formation of the proepicardium and regulates cardiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(34), 12573–8. doi:10.1073/pnas.0400752101

Xu, X., Francis, R., Wei, C. J., Linask, K. L., & Lo, C. W. (2006). Connexin 43-mediated modulation of polarized cell movement and the directional migration of cardiac neural crest cells. *Development (Cambridge, England)*, *133*(18), 3629–3639. doi:10.1242/dev.02543

Yan, W., Cao, Q. J., Arenas, R. B., Bentley, B., & Shao, R. (2010). GATA3 inhibits breast cancer metastasis through the reversal of epithelial-mesenchymal transition. *Journal of*

Biological Chemistry, *285*(18), 14042–14051. doi:10.1074/jbc.M110.105262

Yang, L., Cai, C.-L., Lin, L., Qyang, Y., Chung, C., Monteiro, R. M., … Evans, S. (2006). Isl1Cre reveals a common Bmp pathway in heart and limb development. *Development (Cambridge, England)*, *133*, 1575–1585. doi:10.1242/dev.02322

Yelbuz, T. M., Waldo, K. L., Kumiski, D. H., Stadt, H. A., Wolfe, R. R., Leathebrury, L., & Kirby, M. L. (2002). Shortened Outflow Tract Leads to Altered Cardiac Looping After Neural Crest Ablation. *Circulation*, *106*(4), 504–510. doi:10.1161/01.CIR.0000023044.44974.8A

Yue, Q., Wagstaff, L., Yang, X., Weijer, C., & Münsterberg, A. (2008). Wnt3a-mediated chemorepulsion controls movement patterns of cardiac progenitors and requires RhoA function. *Development (Cambridge, England)*, *135*(6), 1029–1037. doi:10.1242/dev.015321

Zaffran, S., & Kelly, R. G. (2012). New developments in the second heart field. *Differentiation; Research in Biological Diversity*, *84*(1), 17–24. doi:10.1016/j.diff.2012.03.003

Zeisberg, E. M., Ma, Q., Juraszek, A. L., Moses, K., Schwartz, R. J., Izumo, S., & Pu, W. T. (2005). Morphogenesis of the right ventricle requires myocardial expression of Gata4. *Journal of Clinical Investigation*, *115*(6), 1522–1531. doi:10.1172/JCI23769

Zhang, L., Nomura-Kitabayashi, A., Sultana, N., Cai, W., Cai, X., Moon, A. M., & Cai, C.-L. (2014). Mesodermal Nkx2.5 is necessary and sufficient for early second heart field development. *Developmental Biology*, *390*(1), 68–79. doi:10.1016/j.ydbio.2014.02.023

Zhang, Z., Huynh, T., & Baldini, A. (2006). Mesodermal expression of Tbx1 is necessary and sufficient for pharyngeal arch and cardiac outflow tract development. *Development (Cambridge, England)*, *133*(18), 3587–3595. doi:10.1242/dev.02539

Zhao, R., Watt, A. J., Battle, M. A., Li, J., Bondow, B. J., & Duncan, S. A. (2008). Loss of both GATA4 and GATA6 block cardiac myocyte differentiation and results in acardia in mice. *Developmental Biology*, *317*, 614–619. doi:10.1016/j.ydbio.2008.03.013

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Toomas Jagomäe (04.06.1989)

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

Gata3 reguleerib koduhiire (Mus musculus) südame arteriaalse pooluse arengut

mille juhendajad on Raivo Raid ja Kaire Tsaro,

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 31.08.2016 kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

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

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

Tartus, 26.05.2015