

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
ARENGUBIOLOOGIA ÕPPETOOL

Roman Muzõtšin

***Ric8^{-/-}* hiire embrüonaalsete tüvirakkude kirjeldamine rakk-maatriks adhesioonis**

Bakalaureusetöö

Juhendajad MSc Katrin Ruisu
 MSc Riho Meier

TARTU 2015

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	3
SISSEJUHATUS	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1.1 Ekstratsellulaarne maatriks	6
1.2 Fokaalne adhesioon ja integriinid	8
1.3 Tsütoskeleti elemendid ja seos rakkude migratsiooniga	9
1.4 G valgud	13
1.5 RIC8A	15
2. EKSPERIMENTAALOSA	17
2.1 Töö eesmärgid	17
2.2 Materjal ja meetodika	17
2.2.1 Rakuliinid	17
2.2.2 Rakkude kultiveerimine	17
2.2.3 Immunotsütokeemia	18
2.2.4 Rakkude pildistamine	20
2.2.5 Adhesioonikatsed	20
2.3 Tulemused	23
2.3.1 Hiire ES rakkude koloonia morfoloogia kirjeldamine kasvatatuna želatiinil	23
2.3.2 Hiire ES rakkude aktiini tsütoskeleti ehituse kirjeldamine	23
2.3.3 Fokaalse adhesiooni kompleksi valgu vinkuliini koondumine hiire ES rakkudes	24
2.3.4 Hiire embrüonaalsete tüvirakkude kinnitumine erinevatele ekstratsellulaarse maatriksi komponentidele	26
2.4 Arutelu	29
KOKKUVÕTE	32
KIRJANDUSE LOETELU	34
LIHTLITSENTS	40

KASUTATUD LÜHENDID

ATP – adenosiin-trifosfaat

BM – basaalmembraan

BSA – *bovine serum albumine* ehk veise seerumi albumiin

DAPI - 4,6-diamidiin-2-fenüülindool, fluorestseeruv värvimolekul

DMEM – *Dulbecco's modified Eagle medium*

ECM – *extracellular matrix* ehk ekstratsellulaarne maatriks

ES rakud või ESC – *embryonic stem cells* ehk embrüonaalsed tüvirakud

FA – fokaalne adhesioon

FN – fibronektiin

GAP - *GTPase-activating protein* ehk GTPaase aktiveeriv valk

GDI - *guanine nucleotide-dissociation inhibitors* guaniini nukleotiidi eraldumise inhibiitor

GEF - *guanine nucleotide-exchange factor* ehk guaniini nukleotiidivahetusfaktor

GPCR – *G protein coupled receptor*

GTP – guanosiin-trifosfaat

GDP – guanosiin-difosfaat

HA - hüaluroonhape

HSPG - heparaansulfaatproteoglükaan

ICM – *inner cell mass* ehk sisemine rakumass

loxP – *locus of X-over P1*

MEF – *mouse embryonic fibroblast* ehk hiire embrüonaalne fibroblast

mQ – deioniseeritud kõrgpuhastatud vesi

NEAA – *non essential amino acids* ehk asendatavad aminohapped

OD – *optical depth*, termin on kasutusel valguse neelduvuse mõõtmisel

PBS – *phosphate buffered saline*

PG - proteoglükaan

RhoA - *ras homolog gene family member A*

Ric8 - resistant to inhibitors of cholinesterase geen või mRNA

RIC8 – *resistant to inhibitors of cholinesterase* valk

RTK – *receptor tyrosine kinase* ehk retseptor türosiinkinaas

TA - *transverse arcs* ehk ristkaared

SISSEJUHATUS

Hulkrakse organismi areng, funktsioneerimine ja ellujäämine põhineb rakkudevahelistel otsetel ja kaudsetel interaktsioonidel. Ükski organismi arenguetappidest ei toimu sõltumatult, rakud on omavahel pidevas ühenduses – toimub aktiivne vastastikune signaliseerimine nii rakumembraanide vahetel kontaktil, signaalmolekulide kinnitumisel membraani välispinnal asuvate retseptoritele või endokriinsete faktorite vahendusel. G valkude vahendusel toimuv infovahetus on osutunud tähtsaks signaliseerimisrajaks, mille häirega on seotud näiteks nii närvisüsteemi arengudefektid, mõnede vähivormide areng kui ka prenataalne surm mudelorganismides.

G valkudega seotud signaliseerimisradades on tähtsalt kohal valk RIC8. Esmalt avastati valk uurides *Caenorhabditis elegans* mutante, kellel oli resistentsus koliinesteraasi inhibiitoritele. See ~60kDa valk, tuntud ka kui *Synembryn*, osaleb G valkude α -subühikute korrektsel kokkupakkimisel ja nende retseptorsõltumatul aktiveerimisel. RIC8 mutantidel on täheldatud mitmeid defekte nii embrüogeneesis kui ka organogeneesis. Kuna RIC8 osaleb G valkude vahendatud signaliseerimisradades ja on tihedalt seotud G valkude α -subühikute õige voltumisega ja seeläbi vastutab nende kontsentratsiooni eest rakumembraanil, on tähtis uurida RIC8 funktsiooni lähemalt. Viimastel aastatel on ilmunud kirjanduses viidatud RIC8 võimalikule osalusele rakkude migratsioonis ning rakk-maatriks adhesiooniprotsessis.

Seetõttu uuritakse käesolevas töös rakk-maatriks adhesiooniprotsesse ja tsütoskeleti ehitust RIC8 puudulike hiire embrüonaalsete tüvirakkude kontekstis. Võrdluseks ja võimalike erinevuste väljatoomiseks kõrvutatakse *Ric8^{wt}*, *Ric8^{lox/lox}* ja *Ric8^{-/-}* E14 rakuliine. Katsetes kasutatakse erinevaid ekstratsellulaarse maatriksi komponente substraatidena ja püütakse lokaliseerida adhesiooniga seotud tsütoskeleti struktuure.

Märksõnad: hiire embrüonaalsed tüvirakud, RIC8, fokaalne adhesioon, tsütoskelett

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Ekstratsellulaarne maatriks

Ekstratsellulaarne maatriks (ECM) on hulkrakse organismi rakuväline struktuur, mis on biokeemiliseks signaalikandjaks rakke ümbritseva keskkonna muutuste osas, kasvufaktorite lokaalseks hoidlaks ja füüsiliseks kinnituspinnaks ning toeks. Lisaks muule biokeemilisele signalisatsioonile on tähtsal kohal raku-ECMi vahelised kahesuunalised transduktsioonid, mis pärinevad ECMi ehitusest endast ja selle reorganisatsioonist. Hulkrakse organismi rakud on programmeeritud vaikimisi apoptoosi (rakusurma) rada valima, kui nad ei kinnitu või kaotavad ühenduse ekstratsellulaarse maatriksiga (Frisch ja Francis, 1994). Antud mehhanism vähendab eksima läinud rakkude kinnitumist vales kohas, ennetades arengudefekte. ECM moodustab barjääri erinevate organismi kudede kokkupuutekohtadesse. ECMi koostis on väga erinev sõltuvalt nii hulkraksest organismist (olenevalt sellest, kas tegu on seene, taime või loomaga) kui ka asukohajärgsest koest. ECMi komponente toodetakse rakusiseselt, seejärel väljutatakse rakust rakuvaheruumi eksotsütoosi teel. Sekreteeritakse erinevaid kollageene, glükoproteiine (nt laminiini ja fibronektiini), proteoglykaane (näiteks heparaansulfaate) ja hüaluroonhapet.

Kollageenid on enimlevinud ECMi fibrillaarsed valgud, neid on erinevaid tüüpe. Imetaja organismi kollageenist ligi 90% moodustab I tüüpi kollageen, mida võib leida näiteks haavakoes, arterite seintes, luukoe ja hammaste orgaanilises komponendis. II tüüpi kollageen on aluskomponendiks kõhrkoes, III tüüp moodustab fiibreid koos I tüüpi kollageeniga. IV tüüpi kollageeni leidub basaalmembraanides (BM). Kollageeni eritatakse rakust prokollageenina (kolmest polüpeptiidist koosnev ahel) ja hiljem modifitseeritakse lõplikule kujule. Järgnevalt moodustatakse nendest molekulidest juba kiuline struktuur (Hynes ja Naba, 2012).

Fibronektiin (FN) on ühenduslüliks raku retseptorite (näiteks integriinide) ja kollageenikiudude vahel. Rakust eritatakse FNi kompaktsel lahustuval dimeersel kujul, kus C-terminuse lähedal on dimeerid ühendatud disulfiidsildadega. Raku pinnal järgneb integriinide poolt vahendatud FNi konverteerimine kiuliseks lahustumatuks vormiks (Wierzbicka-Patynowski ja Schwarzbauer, 2003). FN omab tähtsat rolli rakkude adhesioonil, migreerumisel, kasvul ja differentseerumisel, kuna omab erinevaid seondumissaite nii kollageeni, proteoglykaani hepariiniga (kasutatakse antikoagulandina), iseenda ja integriinide perekonna paljude retseptoritega (Pankov ja Yamada, 2002). Integriinid ühendavad FN kiud

raku aktiivist tsütoskeletiga, mille abil saab võimalikuks selle reorganisatsioon läbi Rho perekonna GTPaaside signaaliraja (Hall ja Nobes, 2000).

Laminiinid on heterotrimeersed α , β , γ ahelatest koosnevad disuflüidsildadega ühendatud adhesioonimolekulid. Kirjanduses on mainitud viit α , kolme β ja kolme γ ahelat, mis moodustavad vähemalt 15 erinevat kombinatsiooni (Durbeej, 2010). Laminiinid saavad oma nimetuse vastavate ahelate numbrite kombinatsioonist, näiteks laminiin 511 koosneb $\alpha 5\beta 1\gamma 1$ ahelatest. Laminiini esineb rohkelt basaalmembraanides, kus ta moodustab kiudude asemel võrgustikutaolise struktuuri, sidudes näiteks IV tüüpi kollageeni ja muid ECMi komponente. Laminiine on vaja näiteks epiblasti polarisatsiooniks, embrüonaalkeha kavitatsiooniks ja substraadile kinnitunud rakkude apoptoosi mineku vältimiseks (Murray ja Edgar, 2000). Basaalmembraan on kihiline ECM, mis moodustab koe ehituse nii embrüonaalse arengu staadiumis kui postnataalse organismi funktsioonide säilitamisel. BM on justkui plasmamembraani jätk, kaitstes kudesid füüsilise stressi eest, vahendades raku ja seda ümbritseva keskkonna vahel infot, mis omakorda võib olla nii koe sisene kui väline. Seda infot edastatakse integriinide või kasvufaktorite vahendusel. BM omab palju funktsioone ja mõnedeks neist peetakse näiteks tugevat epidermaalset/dermaalset seostumist, skeletilihaste sarkolemmi stabilisatsiooni ja gliiarakkude polarisatsiooni (Yurchenco, 2011).

Proteoglükaane (PG) leidub kollageenikiudude vahel, kus nad täidavad funktsioone, mis ei ole ehituslikku laadi. PGid on glükosaminoglükaanidega liidetud glükoproteiinid. Glükosaminoglükaanid on disahhariididest polümeerid, mille küljes on sulfaat- ja karboksüülrühmad. Selline ehitus annab PGidele negatiivse laengu. Väga suurt funktsioonide spektrit omavad organismis heparaansulfaatproteoglükaanid (HSPG). Need makromolekulid sisalduvad BMis, kus koostoimes teiste komponentidega määratakse BMi ehituslik laad ja seoses sellega ka migratsioonitee rakkudele. Samuti on HSPGd rakumembraani koosseisus võimelised koostöös integriinidega ja teiste raku adhesioonireseptoritega hõlbustama raku-ECMi seondumist, rakkudevahelist signaliseerimist ja raku migratsiooni (Sarrazin, Lamanna ja Esko, 2011).

Hüaluroonhape (HA - *hyaluronic acid*) on sulfüidsildadega anioonne glükosaminoglükaan, mis koosneb polümeriseerunud glükuroonhapest ja N-atsetüülglükosamiinist. HA toodetakse plasmamembraanil hüaluroonhappe süntaaside poolt, seejärel väljutatakse rakuvaheruumi. HA leidub epiteelses, neuralses ja paljudes teistes kudedes, ECMi koostises on ta koguselt kohe kollageenide järel. Evolutsiooni käigus on see polüsahhariid kõrgelt konserveerunud, st sellel on fundamentaalne tähtsus bioloogilistes protsessides. Läbi keeruliste interaktsioonide nii ECMi kui ka rakkudega täidab HA struktuurset rolli ning suunab arenguprotsesse kudedes

mikro- ja makrokeskkondade mõjutamisega ja retseptorite vahendatud geeniekspressiooni muutmisega. (Tolg jt., 2014; Chen ja Abatangelo, 1999).

1.2 Fokaalne adhesioon ja integriinid

Raku ja ECM'i vahelist ühendust nimetatakse fokaalseks adhesiooniks. Heterodimeersete transmembraansete valkudena on integriinid tähtsad retseptorid ECMi-raku vahelises seondumises ning rakusiseste signaaliradade aktiveerimises. Pärast integriini kinnitumist ECMi vastava ligandi külge toimub β subühiku intratsellulaarse saba seondumine nn ankurvalkudega nagu taliin. Need omakorda on võimelised kinnituma järgmistele adaptervalkudele (nt vinkuliin, α -aktiniin), ühendades integriinid F-aktiini tsütoskeleti kortikaalse osaga. Sobivate tingimuste juures moodustatakse integriinide juures fokaalse adhesioon kompleks, mis Rho GTPaasi aktiveerimisel kaasab adhesiooniprotsessi veelgi enam aktiinifilamente ja integriine (Hall ja Nobes, 2000).

Biomolekulina koosnevad integriinid mittekovalentselt seotud α ja β glükoproteiinsetest membraani läbivatest subühikutest. α ja β subühikuid on mitmeid ja integriinid esinevad erinevate subühikute kombinatsioonidena, seetõttu tunnevad integriinid ära väga erinevaid ECMi valke. Integriinid koosnevad rakuvälisest, transmembraansest ja intratsellulaarsest domäänist. Rakumembraani välisel pinnal asuval osal omavad α ja β subühikud kahevalentsete kationide (Mg^{2+} ja Ca^{2+}) seondumissaitidega domääne, millest sõltub integriinide seondumine ligandidega. Sealjuures sõltub seondumise spetsiifilisus ja afiinsus kahevalentse katiooni tüübist. Inimestel kombineeritakse 24 erinevat tüüpi integriine 18 erinevast α ühikust ja 8 erinevast β ühikust, näiteks $\alpha_5\beta_1$ on fibronektiini ja $\alpha_6\beta_1$ laminiini retseptor paljudes rakutüüpides. β_1 ja β_3 subühikutega integriinid osalevad enamasti rakk-maatriks interaktsioonides, samas kui β_2 -ga integriinid vahendavad enamasti rakk-rakk signaale. Integriinide puhul on võimalik mõlemasuunaline signaalide ülekanne (nii seest-välja kui väljast-sisse). Seest-välja signaliseerimise käigus kasvab rakusisese signaliseerimise tulemusena integriini retseptorite afiinsus, st toimub integriinide aktivatsioon (Chungho jt., 2011). Näiteks tsütosoolse valguga taliin seondumisel β integriinide intratsellulaarsed domäänid toimub ekstratsellulaarse domääni konformatsiooni muutus ja seoses sellega integriini aktivatsioon. Samas on võimalik ka aktivatsioon läbi transmembraanse domääni telje nurga muutuse (Kim jt., 2011). Integriinide α subühiku intratsellulaarne domään aitab hoiab integriini inaktiivsesena sidudes β subühiku rakusisest osa. Rakusiseste signaalide tulemusena see fosforüleeritakse ning võimaldatakse integriini seondumine rakuvälistele ligandidele. (Liu

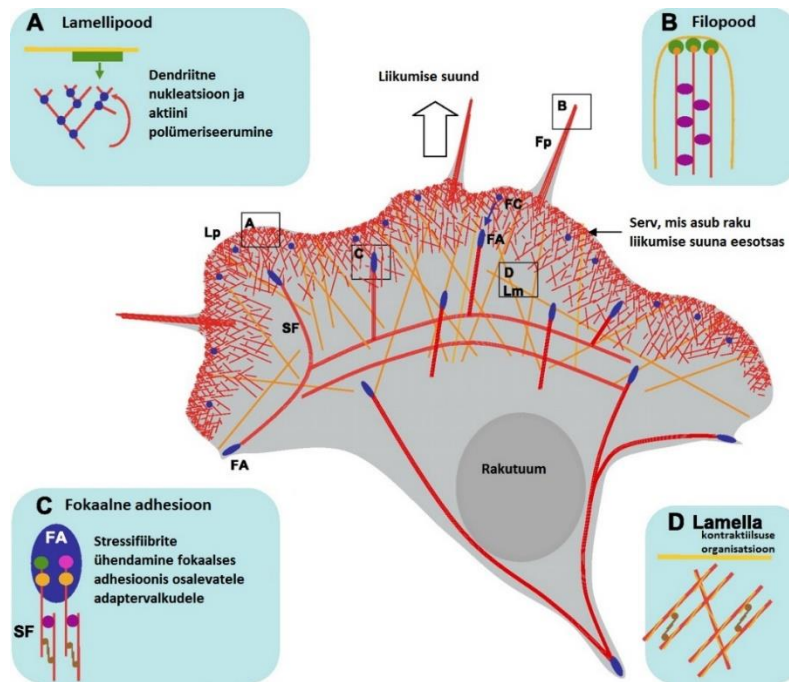
jt., 2015). Kahesuunalist signaliseerimist esineb näiteks trombotsüütidel, kus lahustuvate signaalimolekulide seandumisel rakupinnaretseptoritele toimub integriinide aktivatsioon (seest-välja), seejärel seundumine trombogeensele pinnale ja teistele trombotsüütidele. Samas käivitab integriinide seotus ligandidega integriini ($\alpha_2\beta_3$) interaktsiooni aktiini tsütoskeletiga (väljast-sisse), mille tagajärjel toimub raku laienemine, trombotsüütide agregaaadi levik ja kärna teke kahjustusele (Budnik jt., 2015). Transmembraansed valgud integriinid on suhtlusvahendiks raku ja keskkonna vahel ning fundamentaalseks elemendiks raku tsütoskeleti ühendamisel ECMiga.

1.3 Tsütoskeleti elemendid ja seos rakkude migratsiooniga

Tsütoskeleti koosseisu kuulub kolm peamist komponenti: mikrotuubulid, intermediaarsed filamendid ja filamentse aktiini võrgustik. Mikrotuubulid koosnevad α ja β heterodimeeridest ning saavad alguse raku tsentrosoomist, mida leidub vaid loomarakus. Mikrotuubulid osalevad organellide ruumilises paigutuses rakus, pakuvad pinnase rakusiseseks transpordiks ning on vajalikud kromosoomide ja tütarakkude lahknemiseks mitoosis. Intermediaarsed filamendid on väga mitmekesise koostisega ja enim varieeruvad tsütoskeleti osad, nad koosnevad α -heeliks polüpeptiidsetest ahelatest (McKayed ja Simpson, 2013). F-aktiin (filamentne aktiin) on polümeer, mis koosneb G-aktiini (globulaarne aktiin) monomeeridest, mis on koondatud kaheks helikaalselt põimuvaks fiibriks. Fiibrid on polariseeritud, kus analoogselt mikrotuubulitele loetakse kiiremini kasvav ots positiivseks (+).

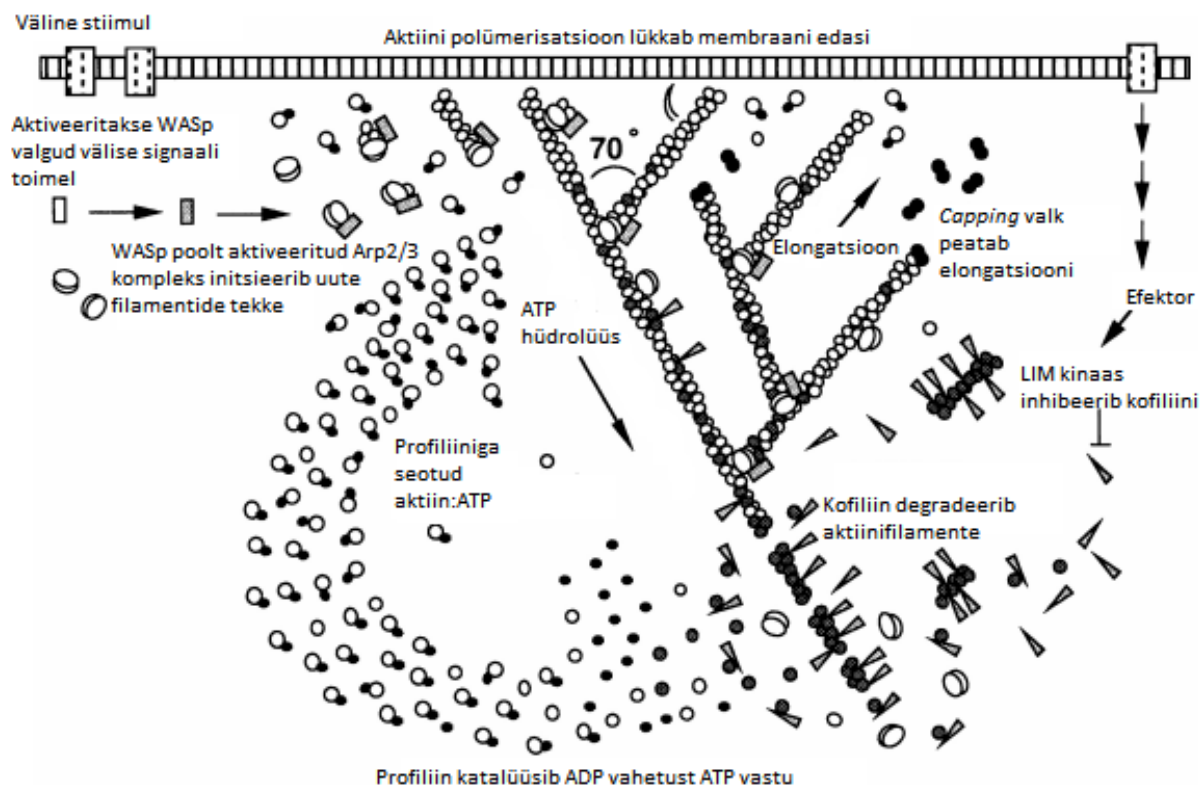
Tsütoskeleti aktiinivõrgustiku ja mikrotuubulite ümberorganiseerimine on raku motiilsuse, jagunemisprotsesside ja adhesiooni aluseks. Nende protsesside käigus muutub raku morfoloogia ja tsütoskeletile mõjuvad jõud. Jõudude tekke tagab nii aktiini polümeriseerimine/depolümeriseerimine kui ka aktomüosiini kompleksi aktiivsus. Müosiinid on mootorsete omadustega ATP-d hüdrolüüsivate valkude perekond, mis koosnevad pea, kaela ja saba domäänist. Pea domään on katalüütiliseks tsentriks ja interakteerub aktiiniga, saba interakteerub transporditava molekuli või teiste müosiinimolekulidega. Kaela domään on enamasti linkeriks ja kergete ahelate seundumiskohtadeks (Hartman ja Spudich, 2012). Raku migreerumisel võib jälgida kolme põhilise aktiinipõhise struktuuri olemasolu (vt joonis 1): aktiinivõrgustikust organiseeritud dünaamilisi struktuure ehk lamellipoode, aktomüosiinikompleksitest moodustatud stressifiibreid ja aktiinifilamentide kimpudest koosnevaid filopoode (Ridley jt., 2003). Samuti on raku migreerumiseks tarvis polariseerida rakk, ehk teisisõnu määrata ruumiliselt liikumise suund raku seisukohast. Eukarüootses rakus

osalevad selles protsessis aktiivselt mitmed valgud, kaasaarvatud Cdc42 valk (*cell division control protein*), mis kuulub Rho GTPaaside perekonda. Cdc42 aktiivsus kasvab raku liikumise suunas ja on maksimaalselt aktiivne lamellipoodide eesservas, kusjuures selle valgu aktivatsioon või inhibitsioon võib muuta järsult migratsiooni suunda. Üheks polarisatsiooni mehhanismiks on pakutud Cdc42 valgu inhibitoorset mõju lamellipoodide tekkele, teiseks pakutakse Cdc42 mõju tsentrosoomi ja Golgi aparadi lokaliseerimisele tuuma suhtes, mis määrab raku ees- ja tagaserva (Cau ja Hall, 2005). Tsentrosoomi ja Golgi aparadi paigutus võib mõjutada mikrotuubulite suunda ja nende põhiste vesiikulite transporti lamellipoodi serva poole tagades vajalike valkude pideva juurdevoolu migratsioonil toimival membraani laiendamisel (Rodriguez jt., 2003). Mikrotuubulite polümeriseeritav (+) ots on suunatud raku eesserva poole ja negatiivne (-) ots on kinnitatud tsentrosoomile, mis enamjaolt paikneb eesserva ja tuuma vahel tsütosoolis. Aktiini polümeriseerumine toimub nii kontrollitud kui ka kontrollimatul viisil, F-aktiin polümeriseerub ATP manulusel ka ilma kõrvalise sekkumiseta. Kontrollitud aktiini polümerisatsioon toimub (+) otsast, mis on vahetult eesserva membraani vastas ning (-) ots on suunaga raku tsentri poole. Kontrollimatu aktiini polümerisatsioon toimub ilma abistavate/suunavate valkudeta ATP hüdrolüüsil, kusjuures nii (+) kui (-) otstele liidetakse monomeere (G-aktiin:ATP), kuid (+) otsa kasv on kiirem. Aktiini (re)organiseerumine jooksulindi (*treadmilling*) põhimõttel on aktiini (+) otsa polümerisatsiooni ja (-) otsa lagundamise tasakaalustatud protsess. See tekitab statsionaarse raku seisukohast liikumise, mis tagab membraani väljasopistumise nii lamelli- kui filopoodide puhul (Claiche ja Carlier, 2008).



Joonis 1. Migreeruva raku skemaatiline aktiini tsütoskeleti illustatsioon, millel on välja toodud põhilised struktuurid. A: lamellipood, B: filopood, C: fokaalne adhesioon, D: lamella. Lp - lamellipood; Fp - filopodium; Lm - lamella; SF - stressi fiibrid; FA – fokaalne adhesioon; FC – fokaalne kompleks, mis on moodustuva FA eellane (Claiche ja Carlier, 2008; modifitseeritud).

Lamellipoodid on raku otseseks ankrupunktiks ECM-il ning moodustuvad liikumissuuna eesserva. Lamellipoodid moodustatakse dendriitse nukleatsiooni teel (joonis 2), kus aktiinifilamenti külge (mitte otsa) seostub seitsmest valgust koosnev Arp2/3 kompleks ja reguleerib nukleatsiooni ja harunemist (Pollard jt., 2000). Arp2/3 kompleksi aktiveerivad omakorda WASp (*Wiskott-Aldrich syndrome protein*) perekonna valgud. Nukleatsiooni ja polümeriseerimise juures võtab osa valk profiliin, mis inhibeerib Arp2/3 kompleksi aktiivsust olles regulaatori rollis (Rotty jt., 2015). Kogu polümerisatsiooni kiirus sõltub aktiini vabade (+) otste arvust, millele on võimalik juurde liita monomeere. Seda protsessi tasakaalustab Ena/VASp valkude ja *capping* valkude konkurents vabade (+) otste pärast. Ena/VASp valgud soodustavad polümeriseerumist, samas kui *capping* valgud katavad vabad otsad vähendades polümerisatsioonisaite arvu (Bear jt., 2002). Kofiliin (ADF - *actin depolymerizing factor*) on valk, mis osaleb aktiinifilamentide depolümerisatsioonil, seda leidub kogu lamellipoodis välja arvatud selle eesservas. Kofiliini ja *capping* valkude tegevuse tagajärjel kasvab aktiini monomeeride kontsentratsioon, mis soodustab polümerisatsiooni. Profiliini-kofiliini häälestatud koostöö võib suurendada polümerisatsiooni kiirust mitmekordselt (Didry jt., 1998).



Joonis 2. Kortikaalse aktiini nukleatsiooni, polümerisatsiooni ja degradatsiooni skeem. Väliste signaalide toimel aktiveeritakse signaalide kaskaad, mille tulemusena toimub uute aktiinifilamentide teke, elongatsioon ja olemasolevate filamentide hargnemine Arp2/3 kompleksi abil. Polümerisatsiooni käigus hüdrolüüsitakse aktiiniga seotud ATPd. Aktiini dendriitse võrgustiku tagumises otsas degradeeritakse aktiinifilamente kofiliini abil, vabastades sellega aktiini:ADP vormi. Profiilin asendab aktiini:ADP ATP vastu ja tsükel kordub. LIM kinaas fosforüleeerib kofiliin vastava signaali tekkel, aktiinifilamentide vabade (+) otste arvu reguleerivad capping valgud (Pollard, 2000; modifitseeritud).

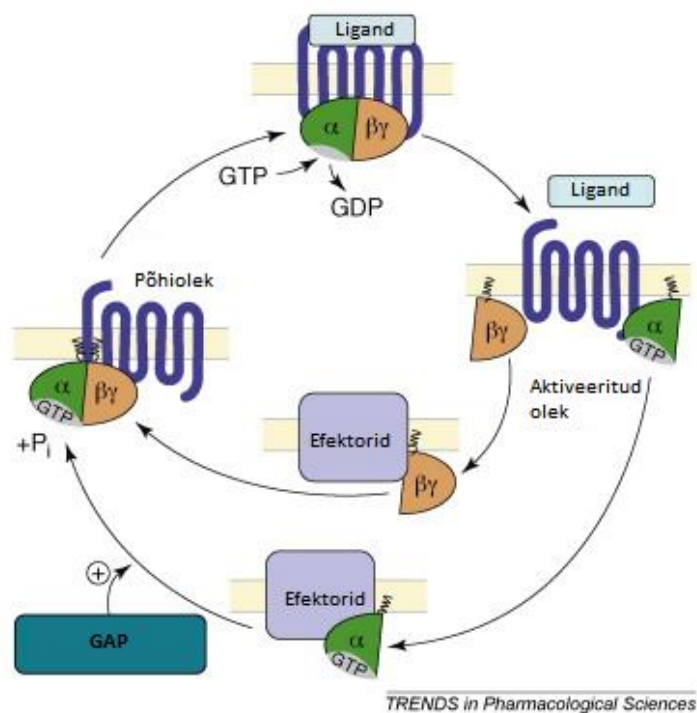
Filopoodid on rakumembraani väljasopistised, mis koosnevad aktiinikiudude paralleelsetest kimpudest. Nendele struktuuridele on pakutud sensorite rolli (Heckman ja Plummer, 2013). Filopode leidub kogu ECMiga kokkupuutuva rakumembraani ulatuses, erinevalt lamellipoodidest. Antud struktuuriga „kompab“ rakk ümbritsevat keskkonda.

Lühikestest vahelduva polaarsusega aktiinifilamentidest moodustuvad aktomüosiini kimbud, mida nimetatakse stressifiibriteks. Need on omavahel ühendatud (*cross-linked*) α -aktiiniini ja teiste aktiinikimpe siduvate valkudega. α -aktiiniini ja müosiinide paigutus on perioodiliselt vahelduv kogu stressifiibri ulatuses sarnanedes lihaste müofibrillidega. Loomarakkudes leidub kolme tüüpi stressifiibreid: ventraalsed, dorsaalsed fiibrid ja ristasetusega kaared (TA - *transverse arcs*). Ventraalsed fiibrid kinnituvad mõlema otsaga FAd külge osaledes raku adhesioonil ja kokkutõmbel. Dorsaalsed fiibrid kinnituvad ühe otsaga FAd külge ja teisega TA külge. TAd on liikumissuunale ristipidised fiibrid, mis liiguvad servast raku tsentri poole. Stressifiibrite moodustamist reguleerib signaalide kaskaad. Selles osaleb RhoA GTPaas, mille GTP-seoseline vorm aktiveerib Rho-sõltuva kinaasi, mis omakorda inaktiveerib kofiliini ning fosforüleeerib müosiini kerge ahela. Aktiinifilamentide lagundamine inhibeeritakse ning

käivitatakse raku kokkutõmbumine (Pirta ja Lappalainen, 2006; Naumanen jt., 2008). Dünaamiline tsütoskeleti reorganisatsioon võimekus on aluseks migratsioonile, mis toimub raku kuju muutumise teel. Lisaks kujumuutusele on tarvilik välise ankru ehk kinnituskoha olemasolu. Rho valgud osalevad tsütoskeleti ümberkujundamisel - migratsioonieelse rakukuju muutumisel tekivad lamellipoodid, rakk muutub lamedamaks. Lamellipoodid kinnituvad ECMile, andes nii suuna kui hõõrdejõu liikumiseks (Stossel, 1993). Liikumapanevaks jõuks on müosiinid, mis liigutavad aktiinifilamente üksteise suhtes vastupidistes suundades (Kanesaki jt., 2012). Rände ajal on raku eesotsas nakkumine tugevam kui tagumises otsas, selle arvelt liigutatakse rakku. Liikumise ajal lagundatakse tagumises osas FAsid, tekitades eesservas uusi (Lee jt., 1993). Selles protsessis osaleb Ca^{2+} -sõltuv proteaas kalpaiin, mis lõikab integriini β subühikut eraldades sellest türosiinkinaasi c-Src aktiveerides RhoA-rajat (Shen jt., 2012). RhoA-rada on võtmeregulaatoriks fokaalses adhesioonis ning tsütoskeleti aktiivõrgustiku organiseerumisel. RhoA-d aktiveerivad RhoGEF-ide kaudu mõned G valkude α subühikud (Worzfeld jt., 2008).

1.4 G valgud

G valgud (*guanine nucleotide-binding proteins*) on GTPaasid, mis on „lülititeks“ paljudes signaaliradades, olles kas GDP- või GTP-seoselises vormis. GTP-seoseline on aktiivne vorm, mis pärast signaaliülekannet muutub hüdrolyüüsil GDP-seoseliseks inaktiivseks vormiks. GTPaase reguleerib kolm klassi valke: GEF (*guanine nucleotide-exchange factor*), GAP (*GTPase-activating proteins*) ja GDI (*guanine nucleotide-dissociation inhibitors*) valgud (Siderovski ja Willard, 2005). G valgud jaotatakse suurteks G valkudeks (heterotrimeersed α - β - γ subühikutest koosnevad kompleksid) ja väikesed G valgud (monomeersed, homoloogsed α subühikule). Tänapäevaks on kirjeldatud neli põhilist $G\alpha$ subühikute klassi G_s , G_i/G_o , G_q/G_{11} and G_{12}/G_{13} . Rakus on heterotrimeerne G valk (α, β, γ subühikud) seotud rakumembraanis asuva GPCR-iga (*G protein coupled receptor*). GPCR kuuluvad retseptorite perekonda, millel on seitse transmembraanset domääni. Need seonduvad G valkudega, et edastada erinevaid signaale hormoonidelt, neurotransmitteritelt ja kasvufaktoritelt (Cabrera-Vera jt., 2008; Worzfeld jt., 2008).



Joonis 3. Ligandi seondumisel GPCRile toimub $G\alpha:GDP$ vahetuse GTP vastu. $G\alpha:GTP$ ja vabanenud dimeer $G\beta\gamma$ on signaalsaatorteks teistes radades. GAP kaasusel liidetakse süühikud GPCR-ile. $G\alpha$ omab GTP paasset aktiivsust võimaldades G valkude inaktivatsiooni hüdrolüüsides γ fosfaadi GTP . Tekkinud inaktiivne $G\alpha:GDP$ kompleks liitub $G\beta\gamma$ dimeeriga moodustades taas heterotrimeerse kompleksi (Worzfeld jt., 2008, järgi).

Ligandi seondumisel GPCRile toimub $G\alpha:GDP$ vahetuse GTP vastu (vt joonis 3). $G\alpha:GTP$ ja vabanenud dimeer $G\beta\gamma$ on signaalsaatorteks teistes radades. $G\alpha$ omab GTP paasset aktiivsust võimaldades G valkude inaktivatsiooni hüdrolüüsides γ fosfaadi GTP . Tekkinud inaktiivne $G\alpha:GDP$ kompleks liitub $G\beta\gamma$ dimeeriga moodustades taas heterotrimeerse kompleksi (Worzfeld jt., 2008).

Integriinide signaliseerimisradades on G valgud kesksel kohal, olles kaasatud protsessi läbi G_{13} subühiku. GPCRi kaudu aktiveeritud G_{13} (α subühik) koostöös RhoGEF-iga (Rho guaniini vahetusfaktor) vahetab $RhoA:GDP$ inaktiivses vormis GDP nukleotiidi GTP vastu aktiveerides $RhoA$ (*Ras homolog gene family, member A*), mille tagajärjel rakk ümardub (Shen jt., 2012). Kui toimub ligandi seondumine integriini ekstratsellulaarsele domäänile, siis seotakse eelnevalt aktiveeritud G_{13} integriini β subühiku intratsellulaarse domääni külge, mis kahandab G_{13} seondumist RhoGEF-iga. Sellega aktiveeritakse integriini β subühikuga seotud retseptorsõltumatu türosiini kinaasi *Src*, mis omakorda aktiveerib $RhoGAPi$. Järgneb $RhoA:GTP$ nukleotiidi hüdrolüüs GDP ks inaktiveerides sellega $RhoA$, mille tagajärjel rakk lamendub (Gong jt., 2010). Kirjeldatud raku tsükliline ümardumine-lamendumine on rakkude migratsiooni tagavaks mehhanismiks.

1.5 RIC8 valk kui potentsiaalne rakk-maatriks adhesiooni regulaator

RIC8 (*resistant to inhibitors of cholinesterase*) on 63kDa suurune valk, millel on leitud $G\alpha$ subühikute molekulaarse tsäperoni ja RIC8 guaniini nukleotiidi vahetusfaktori roll (Gabay jt., 2011; Tall jt., 2003). Tsäperonina seondub RIC8 G valgu α subühikuga ja osaleb selle kovalentsel voltumisel kohe pärast sünteesi ribosoomilt. Seejärel translokeerub guaniinivaba RIC8: $G\alpha$ kompleks membraanile, millel $G\alpha$ ühik vabaneb RIC8-st. Sellisel viisil on võimalik RIC8 poolne G valkude biosünteesi regulatsioon. RIC8 puudulikes rakkudes põhjustab $G\alpha$ subühikute vale voltumine nende degradeerimise tsütoplasmas, mille tulemusel väheneb $G\alpha$ subühikute kogus rakumembraanil (Gabay jt., 2011). RIC8 on samuti guaniini nukleotiidi siduvate G valkude nukleotiidivahetusfaktor, kus teda on vastavas signaalirajas kirjeldatud kui retseptorist sõltumatut $G\alpha$ subühiku aktivaatorit. RIC8 seondub $G\alpha$:GDP kompleksiga viies läbi vabanemise GDP-st, stabiliseerides nukleotiidivaba $G\alpha$ subühikut. RIC8 võimendab retseptorilt saadud signaali ja pikendab selle toimeaega (Tall jt., 2003). Imetajate puhul on kirjeldatud kahte vormi: RIC8A ja RIC8B. RIC8A aktiivsust on näidatud G_o , G_q , G_i ja G_{13} subühikutel ja RIC8B aktiivsust G_s ja G_q subühikutel (Tall jt., 2003). Hiire RIC8A nimetus on nomenklatuurireeglite järgi RIC8 ning nii on seda nimetatud ka käesolevas töös.

RIC8 on evolutsiooniliselt konserveerunud ning selle rolli on uuritud erinevatel mudelorganismidel ning leitud, et valk osaleb mitmes arengu ja homöostaasi protsessis. Näiteks *Caenorhabditis elegans*'i puhul leiti, et RIC8 osaleb mitoosikäevi moodustumisel, tsentrosoomide rotatsioonil, ja tuumade migratsioonil (Afshar jt., 2005). Lisaks on leitud, et *C. elegans*'i vastsete/täiskasvanute organismi närvisüsteemis ekspresseerub *Ric8* pea ganglionites ja kõhtmises närviketis (Miller jt., 2000) ning reguleerib virgatsainete vabanemist neuromuskulaarses sünapsis (Miller jt., 2000; Tall jt., 2003). *Drosophila melanogaster*'is osaleb RIC8 käävi orientatsiooni muutmisel ja tütarakkude asümmeetria säilitamisel (Wang jt., 2005). Imetajate organismis reguleerib RIC8 käävi paigutust mikrotoubulite tekitatud tõmbejõuga, et tõmmata tsentrosome ja käävi korteksi suunas (Tall ja Gilman, 2005).

Viimastel aastatel on kogunenud ka hulgaliselt tõendeid, et RIC8 võib olla oluline regulaator adhesiooni ja migratsiooni protsessis. Sellele viitavad uurimused, kus RIC8 puudusel on häiritud basaalmembraani intaktsus ja adhesioon basaalmembraanile. RIC8 puudus hiire embrüotes viib gastrulatsioonidefektideni ning varajase embrüonaalse surmani (E6.5-E8.5). *Ric8*^{-/-} embrüotel on epiblast ja mesoderm valesti organiseeritud ning basaalmembraan on katkendlik (Tõnissoo jt., 2010). Värskes uurimuses, kus *Ric8* oli spetsiifiliselt eemaldatud hiire neuraalsetest eellasrakkudest täheldati mutandi suurajukoos basaalembraani

katkendlikkust, mille tulemusel migreerusid neuronid oma õigest kihist välja (Kask jt., 2015). Teises sarnases uurimuses, kus samuti oli tehtud neuraalsete eellasrakkude spetsiifiline *Ric8* konditsionaalne *knock-out* hiir, leiti, et väikeajus asetsevad Bergmanni gliia rakud ei kinnitu basaalmembraanile, millest tingituna väikeaju kihid ei moodustu korrektselt. Lisaks leidsid nad *in vitro* adhesioonikatsete käigus, et hiirte *Ric8^{-/-}* gliiarakud kinnituvad laminiinile halvemini võrreldes metsiktüüpi rakkudega (Ma jt., 2012). *Xenopus laevis*'e neuraalharja rakkude RIC8 defitsiit põhjustab adhesiooni vähenemist ka fibronektiinile. RIC8 puudusel oli neuraalharja rakkude migratsioon häiritud ning lamenumine ja FA moodustumine oli märgatavalt vähenenud (Fuentealba jt. 2013). RIC8 puudusest tingitud rakkude adhesioonihäireid on tarvilik uurida sügavamalt, nende esinemist on näidatud väga erinevate hulkraksete organismide puhul ja saadavad tulemused annaksid võimaluse täpsemalt seletada häireid põhjustavaid mehhanisme ja otsida analooge teiste organismide talitluse puhul.

Leitud on tõendeid, et RIC8 võib mõjutada tsütoskeleti aktiinvõrgustiku organiseerumist. *Ric-8* mutatsioonide puhul *D.melanogaster* gastrulatsioonis on häiritud invaginatsiooniprotsessis osalevate ventraalsete rakkude kuju, sest aktiini tsütoskelett ei pea vastu hüdrostaatilisele rõhule tekitades rakkude pinnale paisumusi (*blebbing*). See on põhjustatud aktiinifilamentide häiritud polümeriseerumisest rakumembraani all (Kanesaki jt., 2013). Lisaks on leitud, et *Ric8^{-/-}* hiire embrüonaalsetes tüvirakkudes (ES rakud) on vähenenud F-aktiini tase, mis on tõenäoliselt põhjustatud RhoA vähesest aktiveeritusest, mis omakorda on põhjustatud $G\alpha_{12/13}$ ja $G\alpha_q$ puudusest hiire ES rakkudes (Gabay jt., 2011). Samuti on näidatud, et *Ric8* mahasurumine RNAi'ga pärsib hiire embrüonaalsetes fibroblastides aktiini tsütoskeleti ümberkorraldamist ning kasvufaktoriga indutseeritud raku migratsiooni. Neid tulemusi põhjendati *Ric8* mahasurumisest tuleneva $G\alpha_{13}$ vähenemisega rakumembraanis (Wang jt. 2011). Seega mõjutab RIC8 suure tõenäosusega tsütoskeleti aktiinvõrgustiku organiseerumist ja seda ilmselt Ga vahendatud protsesside läbi.

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

1. Võrrelda $Ric8^{wt}$, $Ric8^{lox/lox}$ ja $Ric8^{-/-}$ ES rakkude tsütoskeleti ehitust adhesioonil
2. Kirjeldada $Ric8^{lox/lox}$ ja $Ric8^{-/-}$ ES rakkude kinnitumist erinevatele substraatidele

2.2 Materjal ja meetodika

2.2.1 Rakuliinid

ES rakkude kasvatamiseks kasutati eelnevalt ettevalmistatud hiire embrüonaalseid fibroblaste, mis saadi hiireliini C57BL/6 E12,5 vanustest embrüotest. Hiire embrüonaalsed fibroblastid inaktiveeriti γ -kiirgusega. Antud töös olid ka kasutusel eelnevalt tekitatud $Ric8^{wt}$, $Ric8^{lox/lox}$ ja $Ric8^{-/-}$ hiire E14 ES rakuliinid. *Knock-out* rakkude saamiseks kasutati Cre/lox meetodit, mille abil $Ric8^{lox/lox}$ rakkudes viidi elektroporatsiooni teel Cre-rekombinaas, mis lõikas välja loxP järjestuste vahel paiknevad $Ric8$ geeni 4 esimest eksonit. E14 ES rakud on eraldatud $Ric8^{lox/lox}$ hiire blastotsüsti sisemisest rakumassist. Hilisemates katsetes loobuti $Ric8^{wt}$ rakuliini kasutusest, sest $Ric8^{lox/lox}$ rakuliiniga saadavate tulemustega puudus erinevus.

2.2.2 Rakkude kultiveerimine

Rakkude kultiveerimisel ja nendega manipuleerimisel kasutati järgmisi tabelitena väljatoodud söötmeid:

Tabel 1. MEF sööde

Komponent	Kontsentratsioon või määr	Tootja markeering
DMEM (naatriumpüruvaati ja L-glutamiini sisaldav)	baaskomponent	Gibco, Life Technologies
10% FBS	1:10	Gibco, Life Technologies
Penitsilliin/streptomütsiin	1:100	Gibco, Life Technologies

Tabel 2. ESC sööde

Komponent	Kontsentratsioon või määr	Tootja markeering
DMEM (naatriumpüruvaati ja L-glutamiini sisaldav)	baaskomponent	Gibco, Life Technologies
10% FBS (<i>ES cell quality</i>)	1:10	Gibco, Life Technologies
Penitsilliin/streptomütsiin	1:100	Gibco, Life Technologies
Asendatavad aminohapped - <i>NEAA</i>	1:100	Gibco, Life Technologies
Merkaptoetanool	0,1 mM	Ferak Berlin
hiire leukeemiat inhibeeriv faktor - <i>mLIF</i>	1:1000	Gibco, Life Technologies

ES rakkude kasvatamiseks valmistati eelnevalt ette hiire fibroblastidega (MEF) kaetud Petri tassid [kasutatusel olid nii 6cm (Cellstar 60/15mm, Greiner Bio-One) kui 10cm läbimõõduga tassid (BD Falcon 100/20mm, Corning)]. Selleks kaeti Petri tassid 0,1% želatiiniga (Millipore) 15 minuti jooksul, seejärel kanti tassidele MEF söötmes (tabel 1) suspendeeritud MEF rakud. Rutiinselt kasvatati *Ric8^{wt}*, *Ric8^{lox/lox}* ja *Ric8^{-/-}* hiire E14 ES rakke hiire embrüonaalsetel fibroblastidel. Söötmena kasutati ESC söödet (tabel 2). Katsete läbiviimiseks külvati rakud 0,1% želatiiniga (Millipore) kaetud tassidele vabanemaks fibroblastidest. Protsessi korrati MEF'idest vabanemiseks 2 korda. Söödet vahetati rakkudel ühe korra igapäevaselt. Rakkude ühelt tassilt teisele külvamiseks eemaldati rakkudelt sööde, pesti need üks kord PBS-iga (Millipore). Trüpsineerimine toimus lisades 1-3ml 37°C soojendatud 0,05% trüpsiini, mis oli lahuses 0,53 mM EDTAga (Corning) vastavalt tassi suurusele ja hoides ühe minuti jooksul 37°C ja 5% CO₂ sisalduse juures [Sanyo CO₂ incubator MCO-18AIC(UV)]. Trüpsiini inaktiveerimine toimus MEF söötmega (tabel 1), seejärel tsentrifugiti (Sigma 4-16K) toatemperatuuril 5 minutit 200g juures. Sade resuspendeeriti uues söötmes ja kanti uutele želatiiniga kaetud Petri tassidele. Rakke kasvatati inkubaatoris [Sanyo CO₂ incubator MCO-18AIC(UV)] 37°C ja 5% CO₂ sisalduse juures.

2.2.3 Immunotsütokeemia

Immunotsütokeemia protsessides kasutati komponente ja nende lahjendusi, mis jälgimise lihtsustamiseks tuuakse välja tabelina (tabel 3).

Tabel 3. Immunosütokeemia käigus kasutatud vahendid

Komponent	Kontsentratsioon või määr	Tootja markeering
DAPI	1:1000	Sigma Aldrich
Fibronektiin	10µg/ml	Millipore
Phalloidin488	1:150	Invitrogen
Phalloidin594	1:150	Invitrogen
Veise seerumi albumiin	1%	Sigma Aldrich
Vinkuliini antikeha (<i>rabbit</i>)	1:250	Bethyl Laboratories
AlexaFluor555 <i>goat-anti-rabbit</i>	1:1000	Life Technologies
Želatiin	0,1%	Millipore

Katse läbiviimiseks oli tarvis eelnevalt valmistada ette rakud. Selleks pesti Petri tassidel asuvad rakud PBS-iga (Millipore). Trüpsineerimine toimus lisades 1-3ml 37°C-ni soojendatud 0,25% fenoolpunasega trüpsiinilahust (Gibco, Life Technologies) vastavalt tassi suurusele, trüpsiinilahuse toimeaeg 70 sekundit inkubaatoris [Sanyo CO₂ incubator MCO-18AIC(UV)]. Trüpsiini inaktiveerimine toimus MEF söötmega (tabel 1), seejärel tsentrifuugiti (Sigma 4-16K) toatemperatuuril 5 minutit 200g juures. Sade resuspendeeriti uues ESC söötmes (tabel 2). Saadud suspensiooni kasutati rakkude viimiseks eelkaetud klaasidele (Menzel-Gläser), mis asusid 24-well plaadil (Santa Cruz Biotechnologies). Katseid tehti kahes blokis: 48-tunnise kinnitumisega katse teostati želatiiniga eelkaetud klaasidel, 2-tunnise kinnitumisega katse fibronektiiniga eelkaetud klaasidel. Mõlema bloki puhul lasti rakkudel kinnituda inkubaatoris [Sanyo CO₂ incubator MCO-18AIC(UV)] 37°C ja 5% CO₂ sisalduse juures. Pärast kinnitumisaja möödumist pesti klaase õrnalt PBSiga, et eemaldada kinnitamata rakud ning fikseeriti 4% paraformaldehüüdiga 10 minutit. Paraformaldehüüdi eemaldamiseks pesti klaase mõned korrad PBSiga ning säilitati PBSis 4°C juures.

Immuunotsütokeemia teostamiseks permeabiliseeriti rakud 0,1% TritonX lahusega 10 minuti jooksul (1 ml/kaev), pärast pesti PBS-iga kaks korda. Mittespetsiifilise seondumise vältimiseks blokeeriti rakud 45 minuti jooksul [0,2µm pooridega filtriga Minisart RC25 (Sartorius Stedium Biotech) filtreeritud] blokeerimisseguga 0,4 ml/kaev (1% veise seerumi albumiin PBSis). Blokeerimise järel kanti kinnitunud rakkudele vinkuliini polükloonaalne küüliku (*rabbit-anti-human*) primaarne antikeha. Selleks paigutati klaasid rakkudega allapoole Parafilm-il (Parafilm® M) asuvatele antikehi sisaldavatele lahuste 30µl laikudele. Parafilm paigutati niisutuskambrisse (selleks otstarbeks kasutati pipetiotsikute karpi, mille põhjas oli destilleeritud vesi), mis omakorda asetati külmutuskappi (Snaige-117-3). +4 °C juures hoiti rakke ööpäev.

Järgneval päeval kanti peale sekundaarne antikeha AlexaFluor555, konjugaadid (Ph488 ning Ph594) ja DAPI. Selleks pesti eelnevalt rakkudega kaetud klaase 1x PBS-i (Millipore) lahuses kaks korda. Rakkudega kaetud klaasid paigutati Parafilm-il asuvatele antikehadega ja konjugaadiga (vastavalt kas Ph488 või Ph594) laikudele (30 µl), Parafilm koos klaasidega omakorda eespool mainitud niisutuskambrisse ja hoiti toatemperatuuril üks tund. Seejärel toimus rakkudega kaetud klaaside kahekordne pesu PBS-iga, millele järgnes rakutuumade värvimine DAPI-ga toatemperatuuril 2-3 minuti jooksul. Selle protsessi käigus asetati klaasid 24-well plaadi kaevudesse ja lisati DAPI lahust 0,5 ml/kaev. Järgnes kaks rakkude pesu PBS-iga ja üks pesu mQ-ga.

Pärast värvimist teostati sulundamine. Selleks kanti sulundusvedelikku Fluoromount (Electron Microscopy Science) preparaadiklaasile Starfrost (Waldemar Knittel) 5 µl ühe rakkudega kaetud katteklaasi kohta. Seejärel paigutati rakkudega kaetud klaasid aeglaselt laikudele vältides õhumullide jäämist preparaadiklaasi ja rakkudega kaetud klaasi vahele. Antud etapil lasti preparaatidel kuivada vähemalt 20 minutit, sellele järgnes ärakuivamise ennetamiseks ja säilivuse pikendamiseks klaaside servade katmine värvitu küünelaki kihiga.

2.2.4 Rakkude pildistamine

Käesolevas töös kasvatatud rakke vaadeldi fluorestsentsmikroskoobiga (Olympus EX51) ja pildistati sellele kinnitatud kaameraga (Olympus DP71). Samuti rakendati töös konfokaalset mikroskoopi (Olympus IX81). Piltide töötamiseks kasutati kahte arvutiprogrammi: konfokaalse mikroskoobi andmefailidega töötamiseks FluoView FV1000 ja piltide järeltöötamiseks Adobe Photoshop CS6.

2.2.5 Adhesioonikatsed

Adhesioonikatseid teostati kolmes etapis. Esimesel (1) etapil uuriti *Ric8^{lox/lox}* ja *Ric8^{-/-}* ES rakkude kinnitumist erinevatele substraatidele (tabel 4), mil 96-well plaat oli eelnevalt töödeldud polü-D-lüsiiniga. Teisel (2) etapil uuriti *Ric8^{lox/lox}* ja *Ric8^{-/-}* ES rakkude kinnitumist erinevatele substraatidele (tabel 4) katmata eelnevalt plaati polü-D-lüsiiniga. Kolmandal (3) etapil uuriti ES rakkude kinnitumist fibronektiinile (tabel 4). Katsetes kasutati substraate, mis võiksid imiteerida rakkude kinnitumist ekstratsellulaarsele maatriksile ning kasutati polü-D-lüsiini ES rakkude nakkumise uurimiseks eelkatmise puhul.

Tabel 4. Adhesioonikatses kasutatud substraadid, lahjedati 1x PBS-is

Substraat	Kontsentratsioon või määr	Tootja markeering
Fibronektiin	10µg/ml	Millipore
Kollageen I tüüp	50µg/ml	Sigma Aldrich
Kollageen IV tüüp	50µg/ml	Santa Cruz Biotechnology
Laminiin	25µg/ml	BD Biosciences
Polü-D-lüsiin	1 mM	Corning
Želatiin	0,1%	Millipore

Esimese (1) etapil tehti katsed kahes korduses. Selleks kaeti 96-well plaat (*transparent, flat-bottom*, Greiner Cellstar) polü-D-lüsiini lahusega 0,3 ml/well, osad kaevud jäeti katmata. Plaat isoleeriti Parafilm-iga ja paigutati ööpäevaks külmkappi (Snaige-117-3) +4°C juurde. Seejärel kaeti antud plaat substraatidega lahjendatud PBS-is (fibronektiin, kollageen I, kollageen IV, laminiin, želatiin, osad kaevud jäeti kaetuna vaid polü-D-lüsiiniga ja osad kaevud jäeti katmata), isoleeriti Parafilm-i abil ja asetati plaat külmkappi (Snaige-117-3) +4°C juurde ööpäevaks. Järgmise sammuna pesti kaevud kaks korda PBS-iga ja pipeteeriti nendes veise seerumi albumiini ja DMEM-i (Gibco, Life Technologies) 1% lahust mittespetsiifilise seondumise vältimiseks. 96-well plaat jäeti seisma üheks tunniks toatemperatuurile. Seejärel aspireeriti lahus plaadi kaevudest. Eelnevalt ettevalmistatud *Ric8^{lox/lox}* ja *Ric8^{-/-}* ES rakususpensioonid DMEM-is ühtlustati, rakkude kontsentratsioonide määramisel kasutati hemotsütomeetrit ja faaskontrastmikroskoopi (Nikon Eclipse TS1000). Igasse kaevu pipeteeriti 100µl rakususpensiooni 10⁵ ES rakkudega ja lasti neil 37°C ja 5% CO₂ sisalduse juures kinnituda üks tund [Sanyo CO₂ incubator MCO-18AIC(UV)]. Pärast toimus kaks pesu PBS-iga, millele järgnes fikseerimine -20°C sügavkülmakambrist (Snaige-117-3) võetud 100% metanooliga (Naxo, BioTop) 10 minuti jooksul toatemperatuuril. Fikseerimise lõpus aspireeriti metanool laminaarse õhuvooluga bio-ohutuskapis (Mars Safety Class 2, Scanlaf). ES rakkude värvimiseks kasutati 1% kristallvioleti (Рсахим) vesilahust, värvi lisati 0,3ml kaevu kohta, hoiti ES rakkudel 20 minutit toatemperatuuril. Seejärel pesti värv maha destilleeritud veega värviliia eraldumise lakkamiseni. Pesule järgnes rakumembraani lüüsimine 1% TritonX-ga 30 minuti jooksul toatemperatuuril segamisaparaadil Thermostat C (Eppendorf). Pärast lüüsimist loeti 96-well plaadilt igast kaevust valgusneelduvus 620nm lainepikkusel skänneri GENios Plus abiga (Tecan).

Teisel (2) etapil teostati kaks katset, kasutati eelnevalt kirjeldatud protokollide ühe erandiga, 96-well plaati ei kaetud eelnevalt polü-D-lüsiiniga, ülejäänud protseduurid olid identsed.

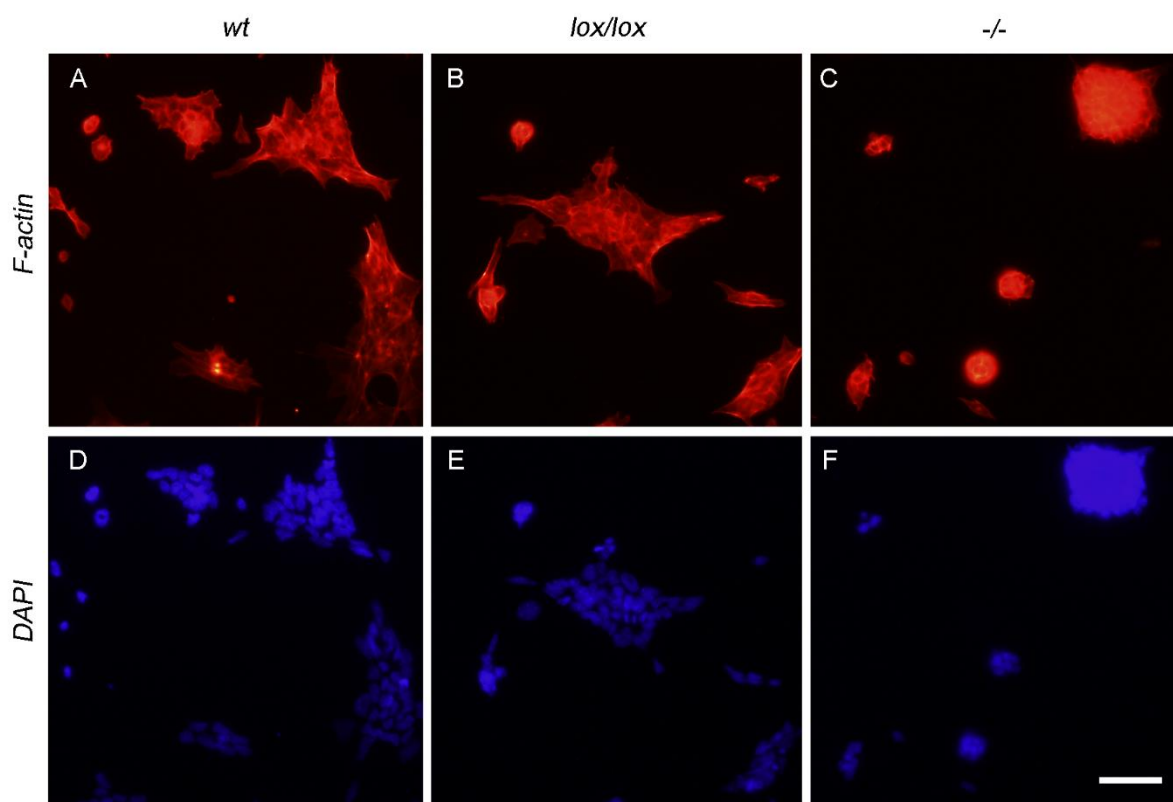
Kolmandal etapil kasutati 96-well plaadi kaevude katmiseks ainult fibronectiini, polü-D-lüsiiniga eelkatmist ei toimunud. Katse protokollid olid identne esimese (1) etapiga, mööndused substraadi ja polü-D-lüsiini osas. Kolmanda etapi katseid teostati seitsmes korduses.

Kõigi kolme etapi andmed salvestati Microsoft Exceli faili. Andmete analüüs toimus MS Exceli programmis.

2.3 Tulemused

2.3.1 Hiire ES rakkude koloonia morfoloogia kirjeldamine kasvatatuna želatiinil

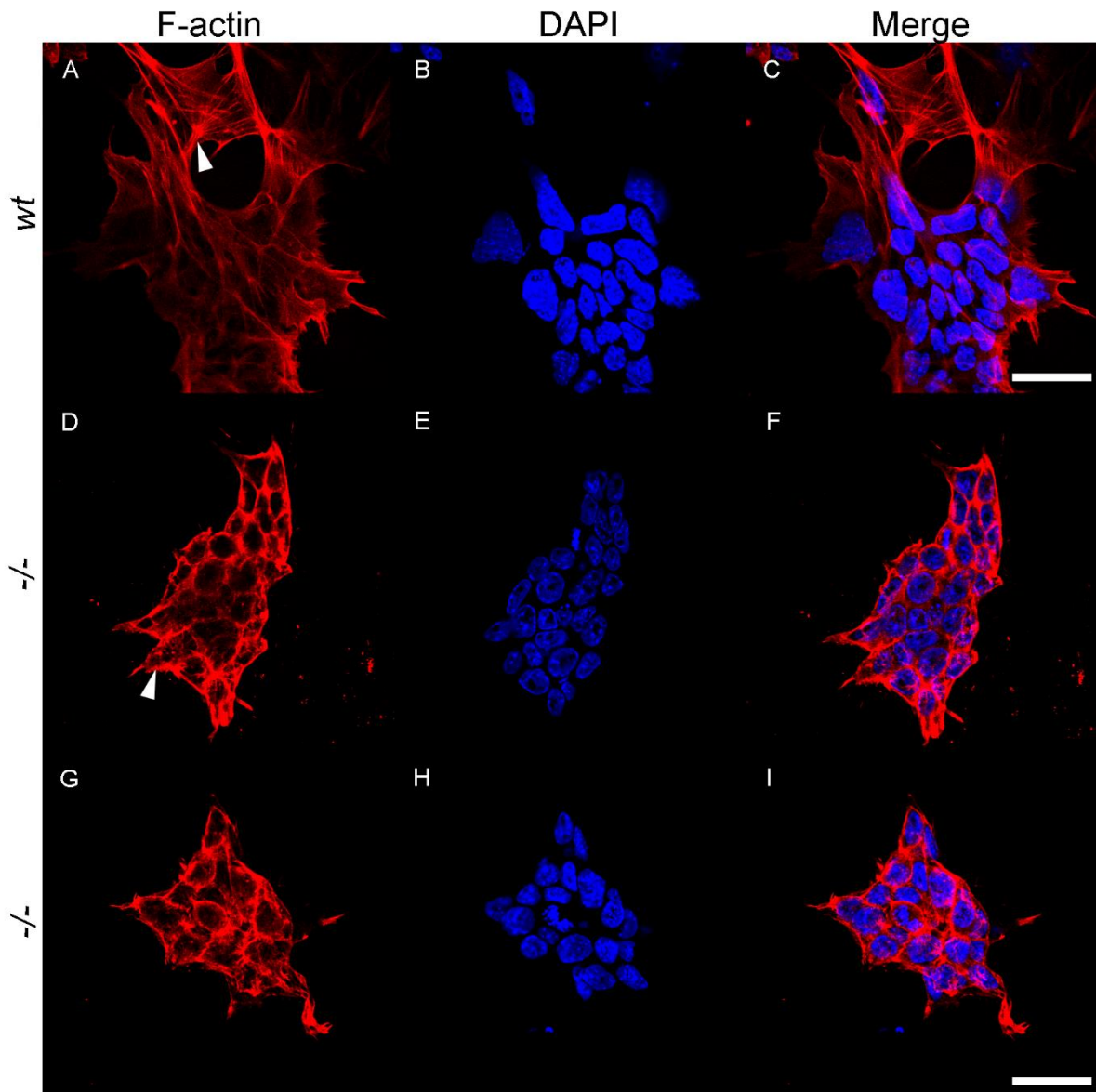
Esimese sammuna vaadeldi rakukolooniate üldist morfoloogiat (joonis 4). Selleks teostati florestsentsvärving falloidiiniga, mis värvib F-aktiini ning tuumad värviti DAPI-ga. Katses kasutati kolme rakuliini *Ric8^{wt}*, *Ric8^{lox/lox}* ja *Ric8^{-/-}*. *Ric8^{wt}* ja *Ric8^{lox/lox}* kolooniad koosnevad enamasti ühest lamenenud rakukihist (joonis 4, vastavalt A ja B). *Ric8^{-/-}* rakukolooniad eristuvad neist selgelt omades ümarat morfoloogiat ning tõenäoliselt koosnevad kolooniad mitmest rakukihist (joonis 4 C, F).



Joonis 4. Kolooniate morfoloogia ja rakkude tsütoskeleti ehitus 48 tunnil kinnitumisel želatiiniga kaetud klaasile vaadatuna 20x objektiiviga. Punase värviga A-C on tähistatud aktiini tsütoskelett, sinakalt D-F rakkude tuumad. A,D - metsiktüüpi rakuliin, B,E - loxP saitidega liin, C,F - Ric8 defitsiitne rakuliin. Paneelil esitatud ülesvõtted on ühtse mastaabiga, mõõtlõik 50µm.

2.3.2 Hiire ES rakkude aktiini tsütoskeleti ehituse kirjeldamine

Järgmise sammuna uuriti ES rakkude aktiini tsütoskeletti lähemalt (joonis 5). *Ric8^{wt}* membraani väljasopistustega lamendunud rakkudes on näha moodustunud stressifiibrid (joonis 5A). *Ric8^{-/-}* rakkudes on F-aktiini rohkesti plasmamembraani all, kuid ei täheldatud stressifiibreid ega väljasopistusi membraanil (joonis 5G). *Ric8^{-/-}* on esitatud kahes korduses (joonis 5 D-F, G-I) näitamaks vastava fenotüübi esinemise regulaarsust.

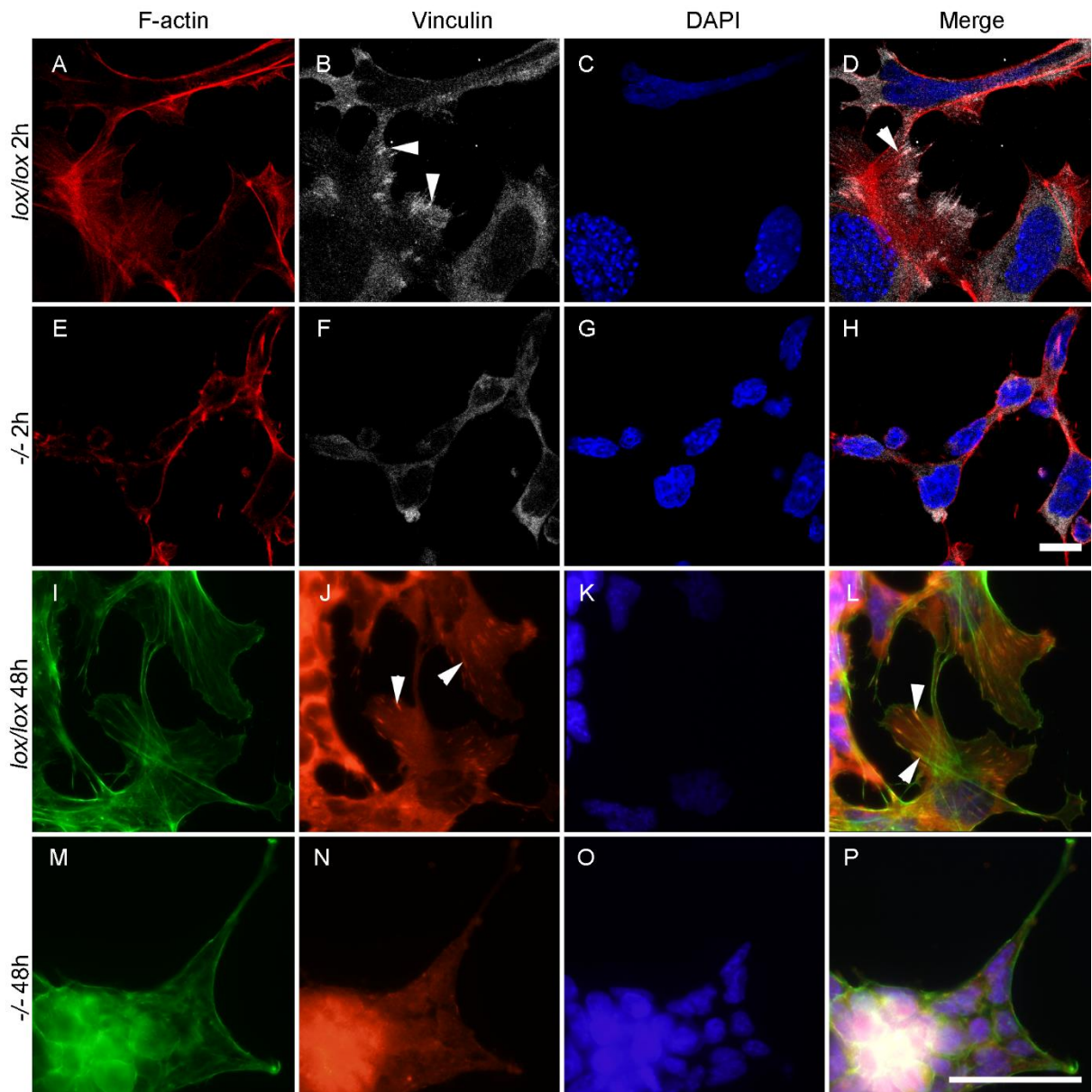


Joonis 5. Kolooniite morfoloogia ja raku tsütoskeleti ehitus 48 tunnisel kinnitumisel želatiiniga kaetud klaasile vaadatuna 60x objektiiviga. Optilised lõigud on tehtud vahetult rakkude ja klaasi kokkupuutetasandil. Punasega esitatud F-aktiin, sinisega rakutuomad. Metsiktüüpi rakuliin on tähistatud A-C, Ric8 puudulikud rakuliinid D-F ja G-I. Kolmandas tulbas kokkuliidetud ülesvõte F-aktiinist ja rakutuomadest. Noolepeadega on tähistatud: (A) metsiktüüpi rakkude tsütoskeletis moodustunud stressifiibrid ja (G) Ric8 puudulike rakkude puhul nende puudumine. Ülesvõtted on tehtud sama mastaabiga, mõõtlõik 30µm.

2.3.3 Fokaalse adhesiooni kompleksi valgu vinkuliini koondumine hiire ES rakkudes

Viimasena vaadeldi ES rakkude tsütoskeleti ehitust paralleelselt vinkuliini lokaliseerimisele ning võimaliku kompleksidesse koondumisega (joonis 6). Loobuti *Ric8^{wt}* ja *Ric8^{lox/lox}* rakuliinide paralleelsest kasutusest katsetes *Ric8^{lox/lox}* liini kasuks, kuna puudusid ehituslikud erinevused nii kolooniite morfoloogias kui ka raku tasandil ning *Ric8^{lox/lox}* ja *Ric8^{-/-}* rakud on omavahel geneetiliselt sarnasemad. F-aktiin märgiti jällegi falloidiiniga, tuomad DAPIga ning vinkuliini ekspressiooni tuvastati immunotsütokeemiliselt vinkuliini antikehaga. Katses

vaadeldi kahte ajapunkti: 2h fibronektiinile ja 48h želatiinile kinnitunud rakud. Kahe tunni jooksul kinnitunud *Ric8^{lox/lox}* ES rakkudes on ilmekalt näha stressifiibrite moodustumist (joonis 6A) vinkuliini koondumine (joonis 6B) ja tsütoskeleti äärmuses asuvate stressifiibrite otste ja vinkuliini asukohtade kokkulangemine (noolepead, joonis 6D). *Ric8^{-/-}* ES rakkudes ei täheldatud vastavaid organiseeritud tsütoskeleti struktuure (joonis 6E, F, H). Želatiinile kahe ööpäeva jooksul kinnitunud *Ric8^{lox/lox}* ES rakkudes on samuti organiseerunud stressifiibrid (joonis 6I), vinkuliini koondumine võimalikesse fokaalsetesse adhesioonikompleksitesse (joonis 6J), vinkuliini ja stressifiibri otste asupaikade kokkulangemine (joonis 6L). *Ric8^{-/-}* ES rakkudes vastavad struktuurid puuduvad (joonis 6M-P). Joonisel 6 on silmnähtav *Ric8^{lox/lox}* ES rakkude lamendumine (joonis 6 D, L), *Ric8^{-/-}* ES rakkude ei ole vastavat tendentsi märgata (joonis 6 H, P).



Joonis 6. ES rakkude tsütoskeleti ehitus ning vinkuliini lokatsioon nendes rakkudes. A-H ülevõtted on tehtud konfokaalse mikroskoobiga 100x objektiiviga fibronectiinile 2 tunni jooksul kinnitunud ES rakkudest, optilised lõigud on tehtud vahetult rakkude ja klaasi kokkupuutetasandil I-P ülevõtted on teostatud fluorestsentsmikroskoobiga 40x objektiiviga želatiinile 48 tunni jooksul kinnitunud ES rakkudest. B,J ülevõtetel näitavad noolepead vinkuliini koondumise asukohti *Ric8^{lox/lox}* ES rakkudes. D,L ülevõtetel osutvad noolepead stressifiibrite ja vinkuliini ühenduskohtadele *Ric8^{lox/lox}* ES rakkudes. *Ric8^{-/-}* rakkudes H,P puuduvad nii vinkuliini koondumine kui ka stressifiibrid. A-H ülevõtted on tehtud samas mastaabis, mõõtlõik 10µm. I-P ülevõtted on tehtud ühesuguse mastaabiga, mõõtlõik 50 µm.

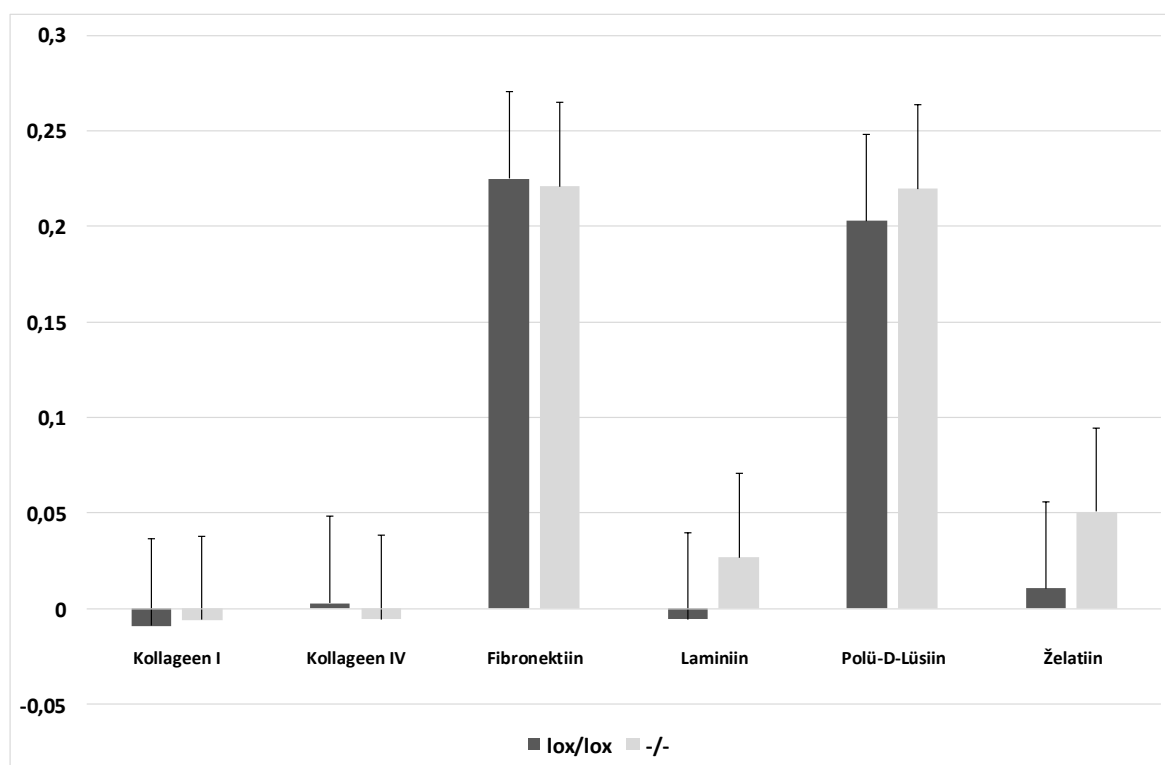
2.3.4 Hiire embrüonaalsete tüvirakkude kinnitumine erinevatele ekstratsellulaarse maatriksi komponentidele

ES rakkude adhesiooni hindamiseks lasti neil kinnituda ühe tunni jooksul eelnevalt erinevate substraatidega kaetud 96-well plaadile. Adhesioonimäära kvantifitseerimiseks värviti kinnitunud rakud kristallvioletiga ning mõõdeti valguse neeldumist 620 nm lainepikkuse juures. Adhesioonikatsed *Ric8^{lox/lox}* ja *Ric8^{-/-}* ES rakkudega viidi läbi kolmes etapis:

1. ES rakkude kinnitumine erinevatele substraatidele (tabel 4) ühe tunni jooksul (klaasid kaeti eelnevalt polü-D-lüsiiniga)
2. ES rakkude kinnitumine erinevatele substraatidele (tabel 4) ühe tunni jooksul
3. ES rakkude rakkude kinnitumine fibronektiinile (tabel 4) ühe tunni jooksul

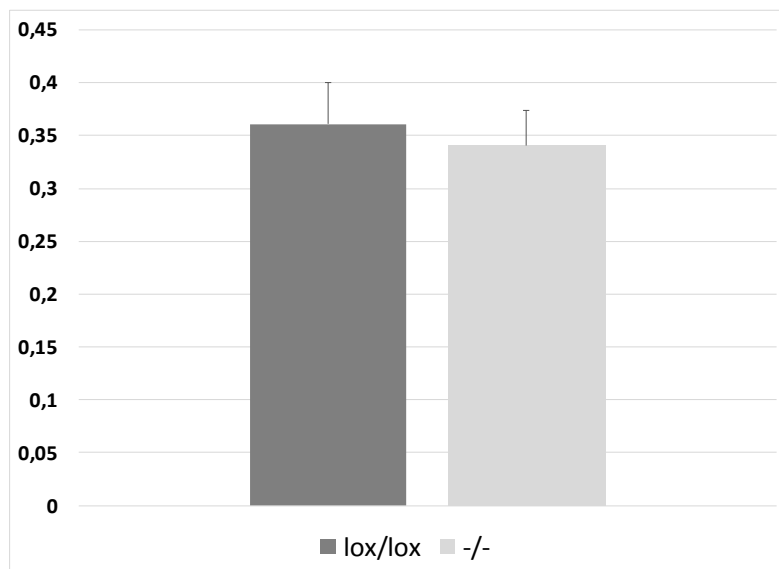
Esimese (1) etapi puhul teostati katset kahes korduses, mõlemal juhul oli selge, et eelkatmine polü-D-lüsiiniga ei soodustanud ekstratsellulaarse matriksi komponentide kinnitumist plastikule ning ES rakud kinnitusid pigem polü-D-lüsiinile ja mitte uuritava substraadile (tulemuste kajastamisest loobuti).

Teise (2) etapi katseid tehti kahes korduses, tulemused keskmistati (joonis 7). Graafikul on näha, et ES rakkude mõlemad liinid kinnituvad suhtelise edukusega fibronektiinile ja klaasidele, mis on eelnevalt kaetud polü-D-lüsiiniga. Ülejäänud substraadile antud katse tingimuste juures kinnitumist praktiliselt ei toimunud. Graafiku negatiivsed tulemused saadi, kuna algsetest tulemustest on arvestatud maha plastikule kinnitunud rakkude hulk (negatiivne kontroll). Mõlemad ES rakkude liinid kinnituvad nii fibronektiiniga kui ka polü-D-lüsiiniga kaetud plastile võrdse määraga.



Joonis 7. 620 nm lainepikkusega valguse neeldumine (OD) mõõdetuna pärast rakkude kinnitumist erinevate substraatidega kaetud plastile ühe (1) tunni jooksul. Valguse neeldumise määr on võrdeline kinnitunud rakkude arvuga. Olgu mainitud, et maksimaalne võimalik tulemus antud valguse neelduvuse mõõtmisel on 1. Veapiirid tähistavad valimi keskmise standarddviiga.

Kolmanda (3) etapi katseid tehti seitsmes korduses. Eelnevate tulemustele tuginedes valitud fibronektiinile kinnitused ES rakud järjekindlalt kõigi seitsme korduse vältel. Joonisel 7 on välja toodud $Ric\delta^{lox/lox}$ ja $Ric\delta^{-/-}$ ES rakkude keskmised tulemused (plastikule kinnitunud rakkude hulk maha arvestatud), mille põhjal on näha mõlema rakuliini suhteliselt võrdset kinnitumist fibronektiinile ($p > 0,05$).



Joonis 8. 620 nm lainepikkusega valguse neeldumine (OD) mõõdetuna pärast rakkude kinnitumist fibronektiiniga kaetud klaasile ühe (1) tunni jooksul. Valguse neeldumise määr on võrdeline kinnitunud rakkude arvuga, maksimaalne võimalik tulemus antud valguse neelduvuse mõõtmisel on 1. Veapiirid tähistavad valimi keskmise standardviga.

2.4 Arutelu

Molekulaarse tsaperoni rolli (Chan jt., 2013; Gabay jt., 2011) täitev ja G valkude nukleotiidvahetusfaktor RIC8 on kajastust leidnud mitmete mudelorganismidega läbiviidud uurimistöodes (Miller jt., 2000; Tall jt., 2003; Afshar jt., 2004; David jt., 2005; Tall ja Gilman, 2005; Woodard jt., 2010; Wang jt., 2011; Ma jt., 2012; Fuentealba jt., 2013). RIC8 on vaieldamatult tähtis uurimisobjekt osaledes paljudes G valkude poolt vahendatud protsessides.

Käesoleva töö raames võeti luubi alla hiire embrüonaalsete tüvirakkudel RIC8 defitsiidist tingitud tsütoskeleti ehituslikud eripärad ja uuriti adhesiooni erinevatele substraatidele. Eelnevalt on näidatud RIC8 defitsiidist põhjustatud neuraalharja rakkude adhesiooni defekte *Xenopus*'e näitel (Fuentealba jt., 2013) ning hiirte neuraalsete eellasrakkude häiritud migratsiooni tingituna Bergmanni gliiarakkude defektsest adhesioonist basaalmembraanile (Ma jt., 2012). On näidatud, et RIC8 defitsiidisel mutantsete hiirte embrüogeneesis toimuvad muutused ja häired, mis viivad letaalsuseni E6.5-E8.5 vanuses (Tõnissoo jt., 2010), teisisõnu gastrulatsioonis, mil toimub rakkude migreerumine moodustamaks lootelehti. Kuna gastrulatsioonile eelnevas etapis olevad rakud ei erine selle uurimistöo raames kasutatud ES rakkudest oluliselt (ICM - sisemisest rakumassist võetud) arengu seisukohast, siis käesolevas töös kasutatud *Ric8^{-/-}* ES rakkudel saadavad tulemused võiks osaliselt seletada *Ric8* mutantsete embrüote fenotüüpi.

Eelnevalt mainitud informatsiooni taustal tekitavad käesoleva töö raames saadud tulemused uusi küsimusi, mis vajavad kindlasti edasist uurimist. Basaalmembraan koosneb suuremas osas laminiinivõrgustikust, millesse on põimunud rohkelt kollageen IV, kuid katsetes kasutatud ES rakud ei näidanud tendentsi kinnitada vastavatele ECMi komponentidele. Nimelt kinnitusid *Ric8^{lox/lox}* ja *Ric8^{-/-}* ES rakud võrdlemisi edukalt vaid fibronektiinile. Ühe võimalusena näeb töö autor võtta kasutusele uued substraadid, mis erineksid koostiselt antud töös kasutatutest, et kontrollida katsetes kasutatud substraatide resultatiivsust kinnitumiskatsetes. Nimelt kasutati töös inimese valku kollageen IV ning laminiini, mis on pärit Engelbrecht Holm Swarm sarkoomi rakkudelt (täpne subühikute koostis teadmata). Seetõttu oleks otstarbekas kasutada tulevastes töödes hiirte rakkude baasil saadud Collagen VI ja kindla koostisega laminiini. Teine võimalus, mida võiks paralleelselt kasutada, näeks ette hiire ES rakkude kinnitumiseks kasutatava ajaakna varieerimist. Kui vaadata käesoleva immunotsütokeemia 48 tunni jooksul toimunud ES rakkude želatiinile kinnitumise katsete tulemusi, võiks eeldada ajaakna varieerimisel erinevaid tulemusi substraatidele nakkumise osas. Tingimusel, et kasutataks puhastatud substraate, saaks uurida rakkude poolt võimalikke

ekskreeteritud komponentide kontsentratsiooni kasvu, mille abil ES rakud kinnituvad ECMi erinevatele komponentidele. Hiirte M3 ja MM3 vähivormide metastaatilise aktiivsuse uurimisel avastati, et kõrgelt metastaatilises MM3 vormi kartsinoomirakkudes on fibronektiini mRNA tase 40x allareguleeritud võrreldes M3 vormiga, mille metastaasi aktiivsus suhteliselt madal (Werbajh jt., 1998). Antud juhul kaotavad vähirakud sideme ECMiga allareguleeritud fibronektiini ekspressiooni tõttu (FN omab seostumissaite integriinidega) – antud tulemuste ekstrapoleerimisel võiks kaaluda fibronektiini mRNA kontsentratsiooni uurimist hiire ES rakkudes. Ajaliselt pikema kinnitumiskatse korral võiks oodata FN-ist erinevate substraatide puhul teatud aja möödudes FN-i moodustamist hiire ES rakkude poolt ja seeläbi ka adhesiooni integriinide poolt vahendatud moel.

Immunotsütokeemia tulemuste põhjal on näha *Ric8^{-/-}* ja metsiktüüpi ES rakkude morfoloogilisi erinevusi, mutandil on näha kortikaalse F-aktiini korrapäratut struktuuri, stressifiibrid puuduvad ja väljasopististe hulk on võrreldes metsiktüübiga tagasihoidlik. Samuti on mutandi ES rakukolooniad kõrgemad, kolooniate äärmised rakud praktiliselt ei lamendu substraadile võrreldes metsiktüübiga. Selle põhjal võiks oletada, et rakk-rakk vahelised ühendused on rakk-matriks ühendustega samaväärsed mutantide puhul, samas kui metsiktüüpi ES rakkudel on rakk-ECM ühendused märgatavalt tugevamad kui rakk-rakk ühendused võimaldades rakkudel ja nende kolooniatel lamenduda. Antud asjaolu ei erista *Ric8^{wt}*, *Ric8^{lox/lox}* ja *Ric8^{-/-}* ES rakuline substraatidele kinnitumise osas. Kuid kolooniate morfoloogia ja ES rakkude tsütoskeleti erinevusi kolmes rakuliinis oleks võimalik tulevikus uurida rakkude migratsiooni kontekstis. Eelnevalt on näidatud, et RIC8 defitsiitsetel *Xenopus*'e embrüotel on arengudefektid, mis on tingitud neuraalharja rakkude migratsiooni defektidest (Fuentealba jt., 2013). *In vitro* katses näidati vastavate rakkude ringjat liikumist isegi kemoatraktandi juuresolekul. Analoogselt võiks hiire ES rakkude puhul läbi viia migratsioonikatse, näiteks Boydeni kambriga. Kasutades eelnevalt adhesioonikatsete puhul edukaks ostunud FN-i, eeldaks migratsioonikatsega saada lisainformatsiooni rakuliinide tsütoskelettide erinevuste kirjeldamisel. Antud informatsioon täiendaks oluliselt arusaama *Ric8^{-/-}* hiirtel tekkivatest arengudefektidest raku tasandil.

Katsetes kasutatud vinkuliini antikeha abil püüti lokaliseerida fokaalsete adhesioonide paiknemist rakus. Vinkuliin on vaid üks paljudest fokaalse adhesiooni kompleksi komponentidest, kuid seda koondub ka fokaalsesse kompleksi, mis on FA eellane rakus. Võimaliku edasiarendusena kaaluks autor aktiveeritud integriinide ja vinkuliini ja/või mõne muu FA komponendi kolokalisatsiooni uurimist kinnitamaks saadud tulemusi, mis seovad stressifiibri otsad koondunud vinkuliini saitidega ES rakkudes.

Kokkuvõttes peab nentima, et hiire ES rakud on keerulised objektid uurimiseks. Nende kultiveerimine ja pluripotentses olekus hoidmine on töömahukas. Kindlasti peaks edaspidistes töödes kasutusele võtma mõne markeri, mis kinnitaks kasutatavate rakkude pluripotentsust ning peab kaaluma ka võimalust, et adhesiooni tulemuste erinevuste puudumine mutantsete ning metsiktüüpi ES rakkude vahel võivad tingitud olla ka kasutusel olevatest hiire E14 ES rakkude avastamata iseärasusest.

KOKKUVÕTE

Käesolevas töös uuriti hiire embrüonaalsete tüvirakkude tsütoskeleti ehitust adhesioonil ning nende rakkude nakkumist erinevatele substraatidele. Kasutati kolme ES raku liini *Ric8^{wt}*, *Ric8^{lox/lox}* ja *Ric8^{-/-}* tsütoskelettide võrdlemisel ja kahte liini *Ric8^{-/-}* ning *Ric8^{lox/lox}* adhesiooni uurimisel substraatidele. *Ric8^{-/-}* ES rakuliin võeti kasutusele uurimaks RIC8 osalust embrüonaalsete tüvirakkude adhesioonis ekstratsellulaarsele maatriksile. ES rakkude kolooniate morfoloogia ja tsütoskeleti ehituse uurimisel kasutati immunotsütokeemiat värvumisprotsesside puhul ja konfokaal- ja fluorestsentsmikroskoopi ülesvõtete tegemisel. ES rakkude adhesiooni erinevatele substraatidele uuriti kristallvioletiga värvitud rakkude 620nm lainepikkusega valguse neeldumise mõõtmisega.

Töö käigus saadi järgmised tulemused:

- *Ric8^{wt}* ja *Ric8^{lox/lox}* ES rakkude fenotüübid on väga sarnased, nende poolt moodustatud rakukolooniate morfoloogia adhesioonil on sarnane ja rakkude tsütoskeleti ehitus on võrdlusele oluliste erinevusteta.
- *Ric8^{-/-}* ES rakkude kolooniad erinevad adhesioonil oluliselt *Ric8^{wt}* ja *Ric8^{lox/lox}* ES rakkude kolooniatest morfoloogia poolest.
- *Ric8^{-/-}* ES rakkudel puuduvad *Ric8^{wt}* ja *Ric8^{lox/lox}* ES rakkude adhesioonil esinevad tsütoskeleti stressifiibrid ja vinkuliini koondumine kompleksidesse.
- *Ric8^{-/-}* ES rakkudel esineb märgatavalt vähem membraani väljasopistisi võrreldes *Ric8^{wt}* ja *Ric8^{lox/lox}* ES rakkudega.
- *Ric8^{wt}* ja *Ric8^{-/-}* ES rakud kinnituvad ühe tunni jooksul ECMi komponenti imiteeriva fibronektiiniga kaetud plastikule, olulisi erinevusi kahe liini tulemustes vaadeldud ajaaknas ei eksisteeri .

Roman Muzōtšin

SUMMARY

There are a lot of signaling molecules that are responsible for functioning and survival of a multicellular organism. The signalling happens based on direct and indirect interactions between the cells. None of the developmental phases of a multicellular organism can be completed without these signaling molecules, one type of which are G proteins. G proteins are found to be essential in many signaling pathways, defective ones lead to developmental disorders of nervous system or even prenatal lethal outcome. RIC8 is described as a chaperone and a nucleotide exchange factor for G α subunits of a heterotrimeric G protein. Keeping that in mind it is important to study the roles of RIC8 in G α -mediated interactions, processes like cell adhesion, proliferation, differentiation and migration.

The objectives of the current research are to investigate cell-matrix adhesion processes and describe the composition of a cytoskeleton framework of the RIC8 deficient murine embryonic stem cells. *Ric8*^{wt}, *Ric8*^{lox/lox} ja *Ric8*^{-/-} ES cells were used for comparison. In order to explore the differences in adhesion processes (if any exist) different substrates were used to mimic components of ECM.

Results showed structural differences in cytoskeletons of *Ric8*^{wt}/*Ric8*^{lox/lox} and *Ric8*^{-/-} ES cells. RIC8 deficient cells showed no formation of stress fibres nor did vinculin concentrate in specific regions of a cell. The morphology of *Ric8*^{-/-} ES cell colonies was notably different compared to the ones of wild-type ES cells. As for the adhesion on different substrates, there was no difference to be found between the cell lines. Both *Ric8*^{wt} and *Ric8*^{-/-} ES cells preferred to adhere on glasses coated with fibronectin, none of the other substrates showed substantial results whatsoever.

The results show, that ES cells we used preferred fibronectin as substrate for adhesion and RIC8 deficient ES cells have abnormal cytoskeleton constitution compared to wild-type cells. The further implications of these results shall be elucidated in the future research.

KIRJANDUSE LOETELU

Teadusartiklid

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

Amoureux, M-C., Nicolas, S. and Rougon, G. (2012). NCAM180 regulates Ric8a membrane localization and potentiates β -adrenergic response. *PLoS ONE*. 7(2): e32216.

Bear, J. E., Svitkina, T. M., Krause, M., Schafer, D. A., Loureiro, J. J., Strasser, G. A., and Gertler, F. B. (2002). Antagonism between Ena/VASP Proteins and Actin Filament Capping Regulates Fibroblast Motility. *Cell*. 109(4): 509-521.

Bonafè, F., Govoni, M., Giordano, E., Caldarera, C. M., Guarnieri, C. and Muscari, C. (2014). Hyaluronan and cardiac regeneration. *J. Biomed. Sci*. 21(1): 1-27.

Budnik, I., Shenkman, B. and Savion, N. (2015). Synergistic effect of signaling from receptors of soluble platelet agonists and outside-in signaling in formation of a stable fibrinogen-integrin α IIb β 3-actin cytoskeleton complex. *Thromb. Res*. 135: 114-120.

Cabrera-Vera, T. M., Vanhauwe, J., Thomas, T. O., Medkova, M., Preininger, A., Mazzoni, M. R., Hamm, H. E. (2003) Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocr Rev* 24: 765–781

Cau, J. and Hall, A. (2005). Cdc42 controls the polarity of the actin and microtubule cytoskeletons through two distinct signal transduction pathways. *J. Cell. Sci*. 118(12): 2579-2587.

Chan, P., Thomas, C. J., Sprang, S. R. and Tall, G. G. (2013). Molecular chaperoning function of Ric-8 is to fold nascent heterotrimeric G protein α subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 110(10): 3794-3799.

Chen, W. J. and Abatangelo G. (1999). Functions of hyaluronan in wound repair. *Wound. Repair. Regen*. 7(2): 79-89.

Chungho, K., Feng, Y. and Ginsberg, M. (2011). Regulation of integrin activation. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol*. 27: 321-345.

Claiche, C. L. and Carlier, M. (2008). Regulation of Actin Assembly Associated With Protrusion and Adhesion in Cell Migration. *Physiol. Rev*. 88(2): 489-513.

- Didry, D., Carlier, M. F. and Pantaloni, D. (1998). Synergy between actin depolymerizing factor/cofilin and profilin in increasing actin filament turnover. *J. Biol. Chem.* 273(40): 25602-25611.
- Durbeej, M. (2010). Laminins. *Cell. Tissue. Res.* 339(1): 259.
- Fuentealba, J., Toro-Tapia, G., Arriagada, C., Riquelme, L., Beyer, A., Henriquez, J. P., Caprile, T., Mayor, R., Marcellini, S., Hinrichs, M. V., Olate, J. and 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.
- Frijns, E., Sachs, N., Kreft, M., Wilhelmssen, K. and Sonnenberg, A. (2010). EGF-induced MAPK signaling inhibits hemidesmosome formation through phosphorylation of the integrin beta4. *J. Biol. Chem.* 285(48): 37650-37662.
- Frisch, S. M. and Francis, H. (1994). Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J. Cell. Biol.* 124(4): 619-626.
- Gabay, M., Pinter, M. E., Wright, F. A., Chan, P., Murphy, A. J., Valenzuela, D. M., Yancopoulos, G. D. and Tall, G. G. (2011). Ric-8 proteins are molecular chaperones that direct nascent G protein α subunit membrane association. *Sci. signal.* 4(200).
- Gong, H., Shen, B., Flevaris, P., Chow, C., Lam, S. C., Voino-Yasenetskaya, T. A., Kozasa, T. and Du, X. (2010). G protein subunit Galpha13 binds to integrin alphaIIb beta3 and mediates integrin “outside-in” signaling. *Science.* 327: 340-343.
- Guan, S., Tan, S., Li, Y., Torres, J., Uzel, G., Xiang, L. and Law, S. A. (2015). Characterization of single amino acid substitutions in the β 2 integrin subunit of patients with leukocyte adhesion deficiency (LAD)-1. *Blood. Cells. Mol. Dis.* 54(2): 177-182.
- Hall A. and Nobes C.D. (2000). Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton. *Philos. T. R. Soc. B.* 355(1399): 965-970.
- Hampoelz, B., Hoeller, O., Bowman, S.K., Dunican, D. and Knoblich, J.A., (2005). *Drosophila* Ric-8 is essential for plasma-membrane localisation of heterotrimeric G proteins. *Nat. Cell Biol.* 7, 1099–1105.
- Hartman, M. A. and Spudich, J. A. (2012). The myosin superfamily at a glance. *J. Cell. Sci.* 125(7): 1627-1632.

- Heckman, C. and Plummer, I. H. (2013). Review: Filopodia as sensors. *Cell. Signal.* 25(11): 2298-2311.
- Hooi Ching, L., Mulhaupt, H. B. and Couchman, J. R. (2015). Cell surface heparan sulfate proteoglycans control adhesion and invasion of breast carcinoma cells. *Mol. Cancer.* 14(1): 277-306.
- Hynes, R. O. and Naba, A. (2012). Overview of the matrisome--an inventory of extracellular matrix constituents and functions. *Cold. Spring. Harb. Perspect. Biol.* 4(1): a004903.
- Kanesaki, T., Hirose, S., Grosshans, J. and Fuse, N. (2013). Heterotrimeric G protein signaling governs the cortical stability during apical constriction in *Drosophila* gastrulation. *Mech. Dev.* 130(2-3): 132-142.
- Kask, K., Ruisu, K., Tikker, L., Karis, K., Saare, M., Meier, R., Karis, A., Tõnissoo, T. and Pooga, M. (2015). Deletion of *ric8a* in neural precursor cells leads to altered neurogenesis and neonatal lethality of mouse. *Dev. Neurobiol.*
- Kraushaar, D. C., Yamaguchi, Y. and Wang, L. (2010). Heparan sulfate is required for embryonic stem cells to exit from self-renewal. *J. Biol. Chem.* 285(8): 5907-5916.
- Liu, J., Wang, Z., Thinn, A. M., Ma, Y. and Zhu, J. (2015). The dual structural roles of the membrane distal region of α integrin cytoplasmic tail in integrin inside-out activation. *J. Cell. Sci.* jcs-160663.
- Ma, S., Kwon, H. J. and Huang, Z. (2012). RIC8, a Guanine Nucleotide Exchange Factor for Heterotrimeric G proteins, Regulates Bergmann Glia-Basement Membrane Adhesion during Cerebellar Foliation. *J. Neurosci.* 32(43): 14979-14993.
- McKayed, K. K. and Simpson, J. C. (2013). Actin in Action: Imaging approaches to study cytoskeleton structure and function. *Cells.* 2(4): 715-731.
- Miller, K.G., Emerson, M.D., McManus, J. and Rand, J.B. (2000). RIC-8 (synembryn): a novel conserved protein that is required for G α signaling in the *C.elegans* nervous system. *Neuron.* 27: 289-299.
- Murray, P. and Edgar, D. (2000). Regulation of programmed cell death by basement membranes in embryonic development. *J. Cell. Biol.* 150(5): 1215-1221.
- Naumanen, P., Lappalainen, P. and Hotulainen, P. (2008). Mechanisms of actin stress fibre assembly. *J. Microsc.* 231: 446-454.

- Pankov, R., Yamada, K. M. (2002). Fibronectin at a glance. *J. Cell. Sci.* 115(20): 3861-3863.
- Pirta, H. and Lappalainen, P. (2006). Stress Fibers Are Generated by Two Distinct Actin Assembly Mechanisms in Motile Cells. *J. Cell. Bio.* 173(3): 383-394.
- Pollard, T. D., Blanchoin, L. and Mullins, R. D. (2000). Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29(1): 545-576.
- Rodriguez, O. C., Schaefer, A. W., Mandato, C. A., Forscher, P., Bement, W. M. and Waterman-Storer, C. M. (2003). Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis. *Nature. Cell. Biol.* 5(7): 599-609.
- Rotty, J. D., Wu, C., Haynes, E. M., Suarez, C., Winkelman, J. D., Johnson, H. E. and Bear, J. E. (2015). Profilin-1 Serves as a Gatekeeper for Actin Assembly by Arp2/3-Dependent and -Independent Pathways. *Dev. Cell.* 32(1): 54-67.
- Ruisu, K., Kask, K., Meier, R., Saare, M., Raid, R., Verakšitš, A., Karis, A., Tõnissoo, T. and Pooga, M. (2013). Ablation of RIC8A function in mouse neurons leads to a severe neuromuscular phenotype and postnatal death. *PloS ONE.* 8(8): e74031.
- Sabatelli, P., Pellegrini, C., Faldini, C. and Merlini, L. (2012). Cytoskeletal and extracellular matrix alterations in limb girdle muscular dystrophy 2I muscle fibers. *Neurol. India.* 60(5): 510-511.
- Sarrazin, S., Lamanna, W. C., Esko, J. D. (2011). Heparan sulfate proteoglycans. *Cold. Spring. Harb. Perspect. Biol.* 3(7): a004952.
- Shen, B., Delaney, M. K. and Du, X. (2012). Inside-out, outside-in, and inside–outside-in: G protein signaling in integrin-mediated cell adhesion, spreading, and retraction. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 24(5): 600-606.
- Siderovski, D. P. and Willard, F. S. (2005). The GAPs, GEFs, and GDIs of heterotrimeric G-protein alpha subunits. *Int. J. Biol. Sci.* 1(2): 51-66.
- Stossel, T. P. (1993). On the crawling of animal cells. *Science.* 260(5111): 1086-1094.
- Tall, G. G. and 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102: 16584-16589.

- Tall, G. G., Krumins, A. M. and Gilman, A. G. (2003). Mammalian Ric-8A (Synembryn) Is a Heterotrimeric G α Protein Guanine Nucleotide Exchange Factor. *J. Biol. Chem.* 278(10): 8356-8362.
- Tolg, C., McCarthy, J. B., Yazdani, A., & Turley, E. A. (2014). Hyaluronan and RHAMM in wound repair and the "cancerization" of stromal tissues. *Biomed. Research. International.* 2014: a103923.
- Tõnissoo, T., Lulla, S., Meier, R., Saare, M., Ruisu, K., Pooga, M. and Karis, A. (2010). Nucleotide exchange factor RIC-8 is indispensable in mammalian early development. *Dev. Dyn.* 239(12): 3404-3415.
- Wang, H., Ng, K. H., Qian, H., Siderovski, D. P., Chia, W. and Yu, F. (2005). Ric-8 controls Drosophila neural progenitor asymmetric division by regulating heterotrimeric G proteins. *Nat. Cell. Biol.* 7(11): 1091-1098.
- Wang, L., Guo, D., Xing, B., Zhang, J. J., Shu, H., Guo, L., Huang, X. (2011). Resistance to Inhibitors of Cholinesterase-8A (Ric-8A) Is Critical for Growth Factor Receptor-induced Actin Cytoskeletal Reorganization. *J. Biol. Chem.* 286 (35): 31055–31061
- Wierzbicka-Patynowski, I. and Schwarzbauer, J. E. (2003). The ins and outs of fibronectin matrix assembly. *J. Cell. Sci.* 116(16): 3269-3276.
- Wondimu, Z., Omrani, S., Ishikawa, T., Javed, F., Oikawa, Y., Virtanen, I. and Patarroyo, M. (2013). A novel monoclonal antibody to human laminin α 5 chain strongly inhibits integrin-mediated cell adhesion and migration on laminins 511 and 521. *PloS ONE.* 8(1): e53648
- Worzfeld, T., Wettschureck, N. and Offermanns, S. (2008). G12/G13-mediated signalling in mammalian physiology and disease. *Trends. Pharmacol. Sci.* 29(11): 582-589.
- Yamashiro, S. and Watanabe, N. (2014). A new link between the retrograde actin flow and focal adhesions. *J. Biochem.* 156(5): 239-248.
- Yurchenco, P. D. (2011). Basement membranes: cell scaffoldings and signaling platforms. *Cold. Spring. Harb. Perspect. Biol.* 3(2): a004911.

Raamatud

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. 2002. Molecular Biology of the Cell, Integrins. 4th ed., Garland Science, New York. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26867/>

Gilbert, S. F. 2010. Developmental biology, p. 78, 301, 302. 9th ed., Sinauer Associates, Inc, Sunderland, USA.

Kasutatud veebiaadressid

Tall'i uurimusgrupi veebilehekül: <http://www.urmc.rochester.edu/pharmacology-physiology/research/labs/tall/Research.cfm#one>

LIHTLITSENTS

Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Roman Muzõtsin (sünnikuupäev: 16.01.1984)

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

***Ric8^{-/-}* hiire embrüonaalsete tüvirakkude kirjeldamine rakk-maatriks adhesioonis,**

mille juhendajad on Katrin Ruisu ja Riho Meier,

- 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 kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
 3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 21.05.2015