

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

Carolin Ruven

Hiire *Ric8*^{-/-} embrüonaalsete tüvirakkude iseloomustamine

Bakalaureusetöö

Juhendajad MSc Katrin Ruisu
MSc Riho Meier

TARTU 2013

SISUKORD

SISUKORD	2
KASUTATUD LÜHENDID	3
SISSEJUHATUS	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1.1. Fokaalne adhesioon	6
1.1.1. Funktsioon	6
1.1.2. Struktuur	7
1.1.3. Adhesioon ja G valkude vahendatud signaalirajad.....	8
1.2. Embrüonaalsete tüvirakkude diferentseerumine neuraalseteks eellasrakkudeks ...	10
1.3. Guaniini nukleotiidivahetusfaktor RIC8	11
1.3.1. RIC8 biokeemiline funktsioon.....	11
1.3.2. RIC8 põhifunktsioonid	12
1.3.3. RIC8 mõju rakkude adhesioonile	13
1.3.4. RIC8 mõju aktiini tsütoskeletile	15
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	16
2.1. Töö eesmärgid	16
2.2. Materjal ja meetodika.....	16
2.2.1. Rakuliinid.....	16
2.2.2. Rakkude genotüüpiseerimine.....	16
2.2.3. Rakkude kasvatamine koekultuuris	17
2.2.4. Rakkude pildistamine	18
2.2.5. Rakkudest totaalse RNA eraldamine	18
2.2.6. cDNA süntees	18
2.2.7. Kvantitatiivne reaalaaja PCR.....	19
2.2.8. <i>Western blot</i>	20
2.3. Tulemused	21
2.3.1. <i>Ric8^{-/-}</i> ES rakkude kontrollimine.....	21
2.3.2. Neuraalse diferentseerumisraja markerite ekspressiooni kirjeldamine	22
2.3.3. Rakkude morfoloogia kirjeldamine diferentseerumisel neuraalseteks eellasrakkudeks.....	23
2.3.4. $G\alpha_i$ ja aktiini hulga kirjeldamine <i>Western blot</i> 'iga	25
2.4. Arutelu.....	26
KOKKUVÕTE	31

SUMMARY	32
TÄNUSÕNAD	32
KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU	34
LIHTLITSENTS.....	45

KASUTATUD LÜHENDID

BLBP – *brain lipid binding protein*

DMEM – *Dulbecco's modified Eagle medium*

ECM – *extracellular matrix* ehk ekstratsellulaarne maatriks

EMT – *epithelial-mesenchymal transition* ehk epiteliaal-mesenhümaalne transitsioon

EPL – *early primitive ectoderm-like cells* ehk varase primitiivse ektodermi staadiumi rakud

ES rakud – *embryonic stem cells* ehk embrüonaalsed tüvirakud

ESRRB – *estrogen-related receptor beta*

FGF5 – *fibroblast growth factor 5*

GPCR – *G protein coupled receptor*

HPRT – *hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*

ICM – *inner cell mass* ehk sisemine rakumass

loxP – *locus of X-over P1*

NCAM – *neural cell adhesion molecule*

NP rakud – *neural progenitor cells* ehk neuraalsed eellasrakud

NS rakud – *neural stem cells* ehk neuraalsed tüvirakud

qRT-PCR – *quantitative realtime polymerase chain reaction* ehk kvantitatiivne reaalaaja polümeraasi ahelreaktsioon

RGS – *regulator of G protein signalling*

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*

SISSEJUHATUS

Mitmerakulise organismi teke viljastatud munarakust on väga keeruline protsess. Rakud peavad jagunema ja diferentseeruma erinevateks rakutüüpideks ning migreerima oma õigetesse kohtadesse. Nende protsesside juures on oluline, et rakud suudaksid muutustele keskkonnas adekvaatselt reageerida. Selleks on organismides välja arenenud keerukad signalisatsioonisüsteemid. Mitmetes rakkude vahelistes ja rakusisestes signaaliradades on olulist rolli näidatud loomariigis konserveerunud G valkudel. Häireid G valkude signaaliradades seostatakse mitmete haigustega, nagu allergiad, diabeet ja mõned vähivormid. Seetõttu on oluline neid signaaliradu täpsemalt uurida. G valkude signalisatsioonisüsteemi üks asendamatu komponent on RIC8, mis on vajalik G valkude subühikute kokku pakkimiseks ja $G\alpha$ subühikute hilisemaks retseptorist sõltumatuks aktivatsiooniks. RIC8 rolli uurimine on perspektiivne, kuna ta on võimeline moduleerima erinevate G valgu subühikute vahendatud signaaliradu. Eelnevalt on erinevatel mudelorganismidel kirjeldatud mitmeid RIC8 puudusest tekkivaid defekte neurogeneesis ja embrüogeneesis. Nende molekulaarse tagapõhja kirjeldamiseks on põhjalikumalt uuritud RIC8 rolli mitoosikäivi orientatsiooni kujunemisel. Viimase paari aasta jooksul ilmunud teadustöodes on leitud, et RIC8 omab olulist rolli ka rakkude adhesioonis ekstratsellulaarse maatriksiga, mis on omakorda oluline mitmete teiste protsesside regulatsioonis, nagu rakkude migratsioon, kinnitumine substraadile, jagunemine ja rakusurm.

Käesolev bakalaureusetöö keskendub RIC8 rolli kirjeldamisele rakk-maatriks adhesioonis ning rakkude diferentseerumises. Teoreetilises osas antakse ülevaade fokaalsetest adhesioonidest, RIC8 biokeemilisest rollist ja bioloogilistest põhifunktsioonidest, keskendudes RIC8 rollile fokaalses adhesioonis ja aktiini tsütoskeleti regulatsioonis. Kitsam ülevaade antakse töö praktilisest osast lähtuvalt embrüonaalsete tüvirakkude diferentseerumisest neuraalseteks eellasrakkudeks. Eksperimentaalses osas kirjeldatakse *Ric8*^{-/-} embrüonaalsete tüvirakkude diferentseerimist neuraalseteks eellasrakkudeks ning selle käigus ilmnunud morfoloogilisi erinevusi võrreldes kontrollrakkudega. Lisaks hinnati ka β -aktiini ning $G\alpha_i$ hulga muutusi *Ric8*^{-/-} embrüonaalsetes tüvirakkudes.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Fokaalne adhesioon

1.1.1. Funktsioon

Ekstratsellulaarne maatriks (ECM) on võrgustik, mis koosneb raku poolt ümbritsevasse keskkonda sekreteeritavatest makromolekulidest. ECM komponentideks on kollageen, proteoglükaanid ja mitmed erinevad glükoproteiinid, nagu fibronektiin ja laminiin. Rakkude kinnitumisel ECMle moodustuvad rakk-maatriks kontaktid. Rakk-maatriks adhesioon on oluline protsess, mille kaudu rakud interakteeruvad ja suhtlevad keskkonnaga. Embrüonaalses arengus on rakk-maatriks adhesioon vajalik organite moodustamiseks, täiskasvanud organismis on see oluline säilitamiseks kudede terviklikkust ja organite funktsiooni. Lisaks rakkude kinnitamisele rakuvaheainele on rakk-maatriks ühendustel oluline roll ka mitmetes signaaliradades, mis võimaldavad rakul reageerida väliskeskkonna muutustele. Selline signaliseerimine võib viia rakkude kinnitumise, migratsiooni, jagunemise, diferentseerumise ja surmani, mõjutades erinevate geenide ekspressiooni (Meredith jt., 1993; Burrige ja Chrzanowska-Wodnicka, 1996; Geiger jt., 2001; Wu, 2007).

Adhesioonil on oluline roll rakkude migratsiooni juhtimisel. Rakkude migratsioon omakorda on aga oluline embrüonaalses arengus, haavade paranemisel ja immuunvastuses (Huttenlocher jt., 1995). Embrüonaalse arengu käigus on rakkude migreerumine oluline gastrulatsioonis, sugu- ja vererakkude eellaste jõudmisel õigetesse kohtadesse ning funktsionaalsete organite ja närvisüsteemi moodustumisel (Gilbert, 2010). Raku migratsioon vajab dünaamilist interaktsiooni ekstratsellulaarse maatriksi ja raku tsütoskeleti vahel. Nendes protsessides on tähtis roll integriinidel. Integriinid aktiveerivad mitmeid Rho perekonna valke, mis on olulised aktiini tsütoskeleti ümberkorraldamisel ja seega vajalikud rakkude liikumiseks ja adhesiooniks (Cooper ja Hausman, 2009). Migratsiooni alguses tekitab aktiini polümeriseerumine kindlasuunalisi väljasopistusi ehk lamellipode, mis määravad välise maatriksiga seondudes ära raku liikumise suuna (Stossel, 1993). Edasiseks migratsiooniks vajaliku hõõrdejõu tekitamiseks kasutavad rakud samuti adhesiooniprotsesse. Adhesioonijõud raku juhtiva otsa ja maatriksi vahel on suuremad kui raku tagumise otsa ja maatriksi vahel. See põhjustab rakkude juhtivas otsas pidevalt uute fokaalsete adhesioonide tekke ja tagumises otsas nende lagundamise, võimaldades sel viisil rakul kindlas suunas liikuda (Lee jt., 1993).

Rakkude kontakt maatriksiga on vajalik ka rakujagunemise käigus mitmes rakutsükli punktis. Ligandi seondumine integriiniga aktiveerib Ras-signaaliraja, suurendades sel viisil mitmete

G1 faasi läbimiseks ja S faasi sisenemiseks vajalike tsükliin-sõltuvate kinaaside ekspressiooni (Mainiero jt., 1997; Schwartz ja Assoian, 2001). Rakkude jagunemises teevad mitmed integriinid koostööd ja omavad sünergilist funktsiooni kasvufaktorite retseptoritega (Miyamoto jt., 1996). Integriinid mõjutavad rakkude jagunemist tugevdades kasvufaktorite signaali, sidudes valke membraanile ja reguleerides valkude translokalisatsiooni tuuma (Miranti ja Brugge, 2002).

Adhesiooni kadumine raku ja ekstratsellulaarse maatriksi vahel põhjustab rakkudes apoptoosi, mida nimetatakse *anoikis*'eks (Frisch ja Francis, 1994). See on vajalik kudede moodustamiseks ja sobiva rakkude hulga saavutamiseks (Sanes jt., 2000). *Anoikis*'e kaudu piiratakse liigset rakkude paljunemist, sest vastasel juhul võivad kinnitumata rakud migreeruda valesse kohta, kinnituda ebasobivale maatriksile ja seal jaguneda (Frisch ja Francis, 1994). Seevastu rakkudes, mis on juba maatriksile kinnitunud, takistatakse apoptoosi minekut. Integriinid on selle protsessi juures olulised, inhibeerides pro-apoptoosilisi ja aktiveerides anti-apoptoosilisi geene (Zhang jt., 1995; Sethi jt., 1999; Miranti ja Brugge, 2002).

Häired rakk-maatriks adhesioonides võivad põhjustada erinevaid haigusi. Mutatsioonid integriine kodeerivates geenides põhjustavad mitmeid harva esinevaid tõsiseid sündroome nagu leukotsüüdi adhesiooni puudulikkus ehk LAD-1 (*leukocyte adhesion deficiency-1*) ja Glanzmanni trombasteenia (Hogg ja Bates, 2000). Mutatsioone erinevates ECM valkudes on seostatud lihasedüstroofiaga (Jones jt., 2001). Muutuseid adhesioonis on seostatud ka vähi tekkega, sest rakk-maatriks adhesiooni puudumisel indutseeritud apoptoos on füsioloogiline barjäär, mis takistab metastaaside teket kasvajate rakkudes. Ometigi on mitmed vähirakud selle suhtes resistentsed ja suudavad moodustada metastaase ka rakkudele ebasobival substraadil (Frisch ja Sreaton, 2001). Seetõttu uuritakse rakk-maatriks adhesiooni regulatsiooni ja komponente intensiivselt.

1.1.2. Struktuur

Vastavalt osalevale tsütoskeleti komponendile jaotatakse rakk-maatriks kontaktid kaheks: fokaalne adhesioon ja hemidesmosoomid. Fokaalse adhesiooni puhul kinnitatakse rakuvaheaine erinevate molekulide abil rakusisestele aktiini filamentidele ja hemidesmosoomide puhul intermediaarsetele filamentidele. Hemidesmosoomide abil kinnituvad ekstratsellulaarsele maatriksile enamasti epiteelirakud, fokaalsete ühenduste kaudu aga fibroblastid ja enamik teisi rakutüüpe (Cooper ja Hausman, 2009). Käesolevas töös vaatame lähemalt fokaalseid adhesioone.

Fokaalsete adhesioonide põhikomponentideks on $\alpha\beta$ integriinide heterodimeerid (Lo, 2006). Imetajatel on 18 erinevat α ja 8 β subühikut, mida kombineerides saab moodustada vähemalt 24 heterodimeeri, mis on võimelised siduma erinevaid ligande (Calderwood, 2004). Mõlemad subühikud koosnevad pikast ekstratsellulaarsest, ühest transmembraansest ja lühikesest tsütoplasmaatilisest domäänist (Banno ja Ginsberg, 2008). Oma ekstratsellulaarse osaga seonduvad nad Arg-Gly-Asp (RGD) järjestusele, mida leidub mitmetes ECMi adhesiivsetes valkudes nagu fibronektiin, vitronektiin ja laminiin (Ruoslahti ja Pierschbacher, 1987). Tsütoplasmaatilise osaga seonduvad integriin taliini ja α -aktiniiniga, mis omakorda interakteeruvad rakusisese aktiini tsütoskeletiga (Calderwood jt., 1999; Otey ja Carpen, 2004).

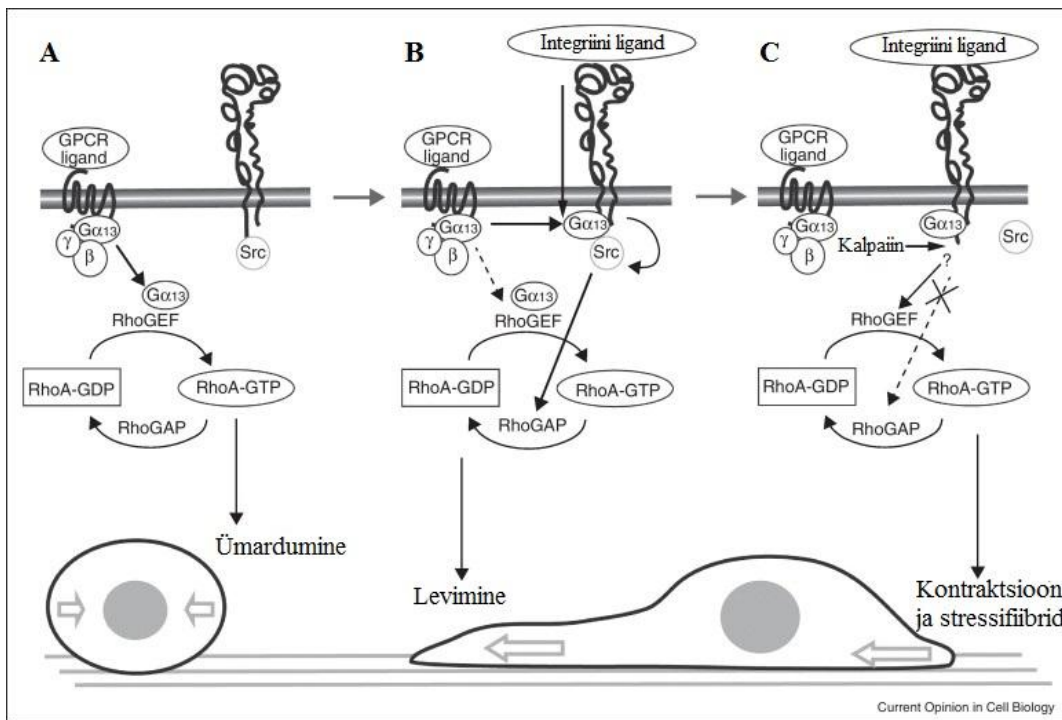
Fokaalsete adhesioonide tekkeks on vajalik integriinide aktivatsioon, mille käigus integriinid muutuvad ligandi suhtes afiinsemaks. Integriinide aktivatsiooniks on vajalik ekstratsellulaarse osa konformatsiooni muutus, mis saavutatakse taliini sidumisega integriini β subühiku tsütoplasmaatilise domääni külge. Pärast konformatsioonilist muutust on integriinid aktiveerunud olekus ja võimelised siduma ECM ligandi (Banno ja Ginsberg, 2008). Integriinide täielikuks aktiveerimiseks on lisaks ligandi seondumisele vajalik aktiveeritud integriinide kuhjumine adhesioonipiirkonda (Miyamoto jt., 1995; Hato jt., 1998). Selle tulemusel aktiveeritakse väljast-sisse signaalirada, mis toob kaasa integriinide sidumise aktiini tsütoskeletiga mitmete adhesioonivalkude abil ja erinevate signaaliradade komponentide koondumise (Cooper ja Hausman, 2009).

1.1.3. Adhesioon ja G valkude vahendatud signaalirajad

G valgud on heterotrimeersed signaalmolekulid, mis koosnevad α , β ja γ subühikust. Klassikalises signaalirajas on heterotrimeerne G valk seotud seitse korda membraani läbiva retseptoriga (GPCR – *G protein coupled receptor*), mis on võimeline siduma välist ligandi, milleks võivad olla erinevad neurotransmitterid, hormoonid või isegi valgusfoton. Ligandi sidumisel toimib GPCR kui nukleotidivahetusfaktor ja aktiveerib $G\alpha$ subühiku, vahetades guanosiin-difosfaadi (GDP) guanosiin-trifosfaadi (GTP) vastu. $G\alpha$:GTP kompleks vabaneb retseptori küljest ning $G\beta\gamma$ subühikutest (Cooper ja Hausman, 2009). Nii $G\alpha$:GTP kui ka $G\beta\gamma$ dimeer saavad signaale edasi signaalirajas järgnevatele efektoritele, millest tähtsamad on adenülaadi tsüklaas, fosfolipaas C, ionkanalid ja kinaasid (Neves jt., 2002). $G\alpha$ subühikul endal on GTPaasne aktiivsus, mis võimaldab G valkude inaktivatsiooni. Selle käigus $G\alpha$ subühik hüdrolyüsib γ fosfaadi GTPs, taastades inaktiivse $G\alpha$:GDP kompleksi, mis ühineb taas $G\beta\gamma$ dimeeriga ning moodustub uuesti inaktiivses olekus heterotrimeerne kompleks

(Bastiani ja Mendel, 2006). $G\alpha$ subühikud jagatakse geeni aminohappelise järjestuse, struktuuri ja efektormolekulide alusel nelja klassi: $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_s$, $G\alpha_{q/11}$, $G\alpha_{12/13}$ (Simon jt., 1991).

G valgu vahendatud signalisatsioon on oluline ka integriinide signaliseerimisradades, kus on põhjalikult kirjeldatud $G\alpha_{13}$ subühiku rolli. GPCR poolt aktiveeritud $G\alpha_{13}$ interakteerub Rho-valgu nukleotiidivahetusfaktoriga (RhoGEF), mis vahetab RhoA (*ras homolog gene family member A*) valgu küljes oleva GDP nukleotiidi GTP vastu, aktiveerides RhoA valgu ja sellega seotud signaaliraja. See viib rakkude kontraktsiooni ja ümardumiseni (joonis 1A). Kui aga integriinile seondub väline ligand, siis seotakse eelnevalt GPCRi poolt aktiveeritud $G\alpha_{13}$ integriini β subühiku külge ning seega väheneb $G\alpha_{13}$ sidumine RhoGEFiga. $G\alpha_{13}$ seondumine integriini β subühikuga aktiveerib sellega seotud c-Src kinaasi, mis omakorda aktiveerib Rho-valgu GTPaasi aktiveeriva valgu (RhoGAP) (Arthur jt., 2000; Gong jt., 2010). Järgneb Rho-valgu küljes oleva GTP hüdroolüüs GDPks, tuues kaasa RhoA-signaalaraja inhibeerimise. See viib rakkude lamendumise ja levimiseni substraadil (joonis 1B) (Arthur ja Burridge, 2001). Lisaks on rakkude migreerumisel oluline, et raku tagumine ots kokku tõmbuks ja fokaalseid adhesioone lagundaks. Selles protsessis on vajalik faktor kalpaiin, mis lõikab integriini β subühikut nii, et c-Src selle küljest eraldub, tuues endaga kaasa RhoA-signaalaraja aktiveerumise (joonis 1C) (Flevaris jt., 2007; Shen jt., 2012). Lisaks $G\alpha_{13}$ subühikule seondub RhoGEFile ka $G\alpha_{q/11}$ subühik. $G\alpha_{q/11}$ -sõltuv RhoA aktivatsioon toimub sõltumatult fosfolipaas $C\beta$ -st, mis on $G\alpha_{q/11}$ teadaolev efektor. $G\alpha_{12/13}$ subühikutevahendatud RhoA aktivatsioon toimub võrreldes $G\alpha_{q/11}$ subühikutega efektiivsemalt ja väiksema hulga välise ligandi juuresolekul (Vogt jt., 2003; Momotani ja Somlyo, 2012). Aktiveeritud RhoA põhjustab mitmete kinaaside vahendusel müosiini kerge ahela fosforüülimist, mis omakorda viib müosiini ATPasse aktiivsuse kasvuni. See võimaldab raku tagumise otsa kontraktsiooni ja aktiinifilamentide seondumist stressifibrilleks (Amano jt., 1996). Lisaks integriini ligandi sidumisele järgneva signaaliraja mõjutamisele on mitmete $G\alpha$ subühikute olulisust näidatud ka integriinide esialgses aktivatsioonis. Sel puhul osalevad $G\alpha$ valgud integriinide signalisatsioonil raku seest välja, võimaldades integriinides konformatsiooni muutust, mis on vajalik nende aktivatsiooniks ja ligandi sidumiseks (Nieswandt jt., 2002).



Joonis 1. Gα₁₃-st sõltuv RhoA dünaamiline regulatsioon (A) GPCRi ligand stimuleerib Gα₁₃ aktivatsiooni ja sellest sõltuva RhoGEFi aktivatsiooni. See viib RhoA aktiveerimiseni, millega kaasneb rakkude kontraktsioon ja ümardumine. (B) Integriini ligandi sidumisele järgneb GPCRilt vabanenud Gα₁₃ seondumine integriini β subühikule, mis on konkureeriv Gα₁₃-RhoGEF interaktsiooniga. Gα₁₃ seondumine integriini β subühikule aktiveerib sellega seotud c-Src kinaasi, mis omakorda aktiveerib RhoGAPi ja põhjustab RhoA signaaliraja inhibeerimise. Selle tulemusena soodustatakse raku levimist ja lamendumist, vähendades kontraktiilseid jõude. (C) Integriini β subühiku lõikamine kalpaiiniga põhjustab c-Src eemaldumise integriini küljest ja takistab seega c-Src-st sõltuvat Rho-inhibitsiooni. Samuti aktiveeritakse RhoGEFid. Need sündmused viivad RhoA taasaktiveerimiseni ja põhjustavad rakkude kontraktsiooni ja stressifibrite teket (Shen jt., 2012 järgi).

1.2. Embrüonaalsete tüvirakkude diferentseerumine neuraalseteks eellasrakkudeks

Pluripotentsed rakupopulatsiooni teke ja diferentseerumine on imetajate arengus kesksel tähtsusega. Imetajate varajases embrüogeneesis eristuvad blastotsüsti sisemine rakumass (ICM – *inner cell mass*) ja trofektoderim. Trofektodermist tekivad ekstra-embrüonaalsed koed ning ICMst saavad alguse kolm lootelehte, millest hiljem areneb kogu organism (Gilbert, 2010). *In vitro* kasvatatavad embrüonaalsed tüvirakud (ES rakud – *embryonic stem cells*) on blastotsüsti sisemisest rakumassist eraldatud pluripotentsed rakud, mis on võimelised diferentseeruma kõigist kolmest lootelehest pärit rakutüüpideks. Diferentseerumise käigus läbivad ES rakud varase primitiivse ektodermi sarnase rakustaadiumi (EPL rakud – *early primitive ectoderm-like cells*) (Pelton jt., 2002). Neuraalse induktsiooni käigus muutuvad EPL rakud neuraalseteks eellasrakkudeks (NP rakud – *neural progenitor cells*), mis säilitavad oma multipotentsuse ja võime iseennast juurde toota. NP rakud on võimelised diferentseeruma

järgnevateks neuraalse koe rakkudeks: neuronid, astrotsüüdid ja oligodendrotsüüdid (Qian jt., 2000; Temple, 2001). Algselt jagunevad NP rakud sümmeetriliselt, et iseennast juurde toota ning hiljem hakkab toimuma asümmeetriline jagunemine, kus üks rakk jääb neuraalseks tüvirakuks ja teine diferentseerub uueks rakutüübiks (Miyata jt., 2001; Miyata jt., 2004). Imetajate kesknärvisüsteemi arengus toodetakse algselt NP rakkudest lokaliseeritud ja ajast sõltuvalt neuroneid ning hiljem erinevaid gliiarakke (Qian jt., 2000; Temple, 2001).

ES rakkudel on unikaalne geeniekspressiooni profiil, mis hoiab neid pluripotentses olekus (Loh jt., 2006; Zhou jt., 2007; Chen ja Daley, 2008). Kui ES rakud hakkavad diferentseeruma, siis erinevate diferentseerumissuundade korral muutub see profiil drastiliselt (Loring jt., 2001; Heo jt., 2005). Uuringud on näidanud, et geeniekspressiooni profiili säilitamisel ja muutmisel on oluline suhtlus transkriptsioonifaktorite ja epigeneetiliste mehhanismide vahel. ES rakkude üleminekul NP rakkudeks toimuvad ümberkorraldused kromatiini struktuuris, DNA metüleerimises, histoonide modifitseerimisel ja mitte-kodeerivate RNAde sünteesis, mis võimaldavad muuta erinevate geenide ekspressiooni. Täpsemalt on näidatud näiteks pluripotentsuse geenide ekspressiooni mahasurumist promootorite metüleerimise abil ja proneuraalsete geenide ekspressiooni aktiveerimist promootorite demetüleerimise abil (Lunyak ja Rosenfeld, 2008; Stein jt., 2010).

1.3. Guaniini nukleotiidivahetusfaktor RIC8

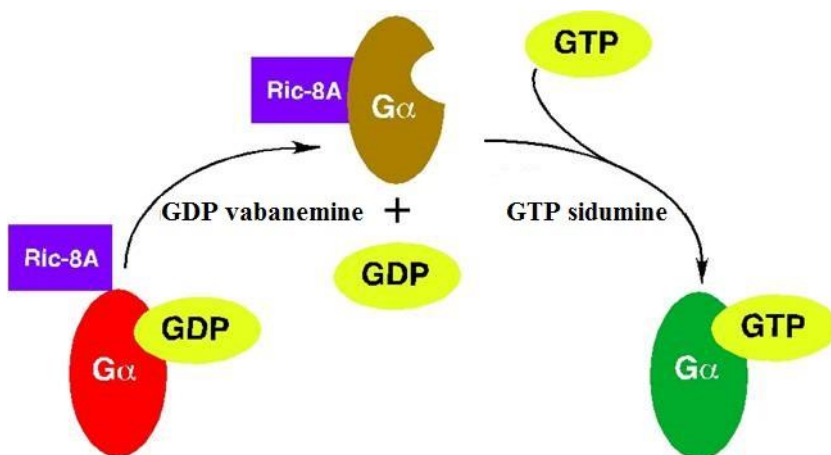
1.3.1. RIC8 biokeemiline funktsioon

RIC8 (*resistant to inhibitors of cholinesterase*) on 63kDa-line valk, mis avastati esmakordselt *Caenorhabditis elegans*'is (edaspidi *C. elegans*), kui otsiti koliinesteraasi inhibiitoritele resistentsid mutante (Miller jt., 1996). RIC8 teise nimetusena kasutatakse ka Synembryn'i, sest *C. elegans*'is on RIC8 valgu rollikirjeldatud nii rakkudevahelises sünaptilises ülekandes kui ka embrüogeneesis (Miller ja Rand, 2000; Miller jt., 2000). RIC8 on loomariigis tugevalt konserveerunud, omades funktsiooni mitmetes mudelorganismides alates seeneriigist kuni imetajateni (Miller jt., 2000; Tall jt., 2003; Afshar jt., 2005; David jt., 2005; Tõnissoo jt., 2010; Kanesaki jt., 2013). Sealhulgas on kirjeldatud RIC8 valku ka inimese rakkudes (Nishimura jt., 2006; Muggerud jt., 2009; Amoreux jt., 2012).

RIC8 on guaniini nukleotiidi siduvate G valkude nukleotiidivahetusfaktor (GEF) (Tall jt., 2003). Imetajatel on kirjeldatud RIC8A ja RIC8B isovormi. RIC8A aktiivsust on näidatud $G\alpha_o$, $G\alpha_q$, $G\alpha_i$ ja $G\alpha_{13}$ subühikutel ja RIC8B aktiivsust $G\alpha_s$ ja $G\alpha_q$ subühikutel (Klattenhoff jt., 2003; Tall jt., 2003). RIC8-t on G valkude vahendatud signaalirajas kirjeldatud kui retseptorist

sõltumatut $G\alpha$ subühiku aktivaatorit. RIC8 seondub monomeerse $G\alpha$:GDP kompleksiga, stimuleerides GDP vabanemist ja stabiliseerides nukleotiidivaba $G\alpha$ subühikut, et saaks seonduda GTP (joonis 2). Sel viisil võimendab RIC8 retseptorilt saadud signaali ja pikendab selle toimeaega (Tall jt., 2003; Tall ja Gilman, 2004).

GEF valkudega vastupidine funktsioon on RGS (*regulator of G protein signaling*, tuntud ka kui GAP - *GTPase activating proteins*) perekonna valkudel, mis seonduvad aktiivse $G\alpha$ subühikuga ja stimuleerivad selle GTPaasset aktiivsust. Selle tulemusel lüheneb aktiivse $G\alpha$:GTP vormi eluiga ja väheneb G valkude poolt edasikantav signaal (De Vries jt., 2000). RIC8 on võimeline vabastama $G\alpha$ subühikuid RGS inhibitsioonist, vabastades RGS: $G\alpha$:GDP kompleksist GDP ja võimaldades GTP seondumist $G\alpha$ subühikuga. Täpsemalt on seda näidatud $G\alpha_i$ ja RGS14 puhul (Vellano jt., 2011).



Joonis 2. RIC8 roll nukleotiidivahetusfaktorina. Inaktiivses olekus on $G\alpha$ subühik seotud GDPga. RIC8 seondumine $G\alpha$ -ga põhjustab GDP vabanemise ja võimaldab $G\alpha$ subühikul GTPd siduda. GTPga seotud $G\alpha$ on aktiivne ja saadab signaali edasi signaaliraja järgnevaleefektoritele (Tall'i uurimisgrupi veebilehekülj).

1.3.2. RIC8 põhifunktsioonid

RIC8 valgu funktsiooni on uuritud mitmetes erinevates protsessides. Detailsemalt on kirjeldatud RIC8 valgu rolli regulaatorina G valkude vahendatud mehhanismis, mis kontrollib asümmeetrilist rakujagunemist *C. elegans*'i embrüotel (Miller ja Rand, 2000; Afshar jt., 2004), *Drosophila melanogaster* (edaspidi *Drosophila*) neuroblastidel (Hampoez jt., 2005; Wang jt., 2005) ja imetajate rakkudes (Tall ja Gilman, 2005; Woodard jt., 2010). *C. elegans*'is on RIC8 oluline mitoosikäevi moodustumisel, tsentrosoomide rotatsioonil, tuumade migratsioonil ja teistes tsentrosoomi vahendatud protsessides (Miller ja Rand, 2000; Afshar jt., 2004; Couwenbergs jt., 2004; Afshar jt., 2005; Wilkie ja Kinch, 2005). Mudelorganismis

Drosophila osaleb RIC8 käävi orientatsiooni kujunemisel ja tütarakkude asümmeetria säilitamisel (David jt., 2005; Hampoelz jt., 2005; Wang jt., 2005). Imetajates mõjutab RIC8 käävi paigutust, reguleerides mikrotobulite tekitatud tõmbejõudu, mis on vajalik, et tõmmata tsentrosome ja käävi korteksi poole (Tall ja Gilman, 2005). Näidatud on ka imetajate RIC8 osalemist just käävi paigutuses rolli omavakortikaalse signaalikompleksi moodustamises (Woodard jt., 2010).

RIC8 funktsiooni on kirjeldatud ka närvisüsteemis. *C. elegans*'i vastsetes ja täiskasvanud isendites ekspresseerub *Ric8* kogu närvisüsteemis – pea ganglionites ja kõhtmises närviketis (Miller jt., 2000). RIC8 funktsioon *C. elegans*'inärvisüsteemis on seotud G_{α_o} - G_{α_q} signaalirajaga, mis reguleerib virgatsainete vabanemist neuromuskulaarses sünapsis (Nurrish jt., 1999; Miller jt., 2000; Tall jt., 2003). Hiire varajases arengus vanuses E9.5-E12.5 ekspresseerub *Ric8* neuraaltorus, kraniaalganglionites, sümpaatilises tüves, dorsaalse juure ganglionites, silma läätses, sisekõrva endolümfaatilises kotikeses ja haistmiselundi vomeronasaalorganis. Täiskasvanud hiirel on *Ric8* ekspresseeritud käitumuslikult olulistest ajupiirkondades: neokorteksis, hipokampuses, väikeajus, käbikehas ja vöökäärus (Tõnissoo jt., 2003). RIC8 defitsiidiga *Ric8*^{+/-} hiirtel on näidatud võimendunud ärevuskäitumist ja vähenenud ruumilist mälu ning õppimisvõimet (Tõnissoo jt., 2006). Lisaks ekspresseeruvad RIC8A ja RIC8B hiire maitsepunga rakkudes ja interakteeruvad seal olevate G valgu subühikutega, võimendades sel viisil signaali ülekannet mõru ja magusa maitse retseptoritelt (Fenech jt., 2009).

Hiljuti on näidatud, et RIC8 käitub G_{α} valkude puhul ka molekulaarse tsaperonina. Nimelt aitab RIC8 ribosoomidelt sünteesitud G_{α} subühikuid kokku voltida ja neid siis plasmamembraanile transportida. *Ric8*^{-/-} rakkudes põhjustab ebakorrektnen G_{α} subühikute voltimine nende lagundamist tsütoplasmas ja seega takistab nende jõudmist membraanile (Gabay jt., 2011; Chan jt., 2013). Seetõttu on *Ric8*^{-/-} rakkudes vähenenud G_{α_i} , G_{α_o} , G_{α_q} ja $G_{\alpha_{13}}$ subühikute hulk plasmamembraanil (Hampoelz jt., 2005; Gabay jt., 2011).

1.3.3. RIC8 mõju rakkude adhesioonile

Hiljuti on ilmunud mitmeid uurimusi, kus on näidatud, et RIC8 on vajalik ka adhesiooni- ja migratsiooniprotsessides. Eelmisel aastal avaldatud uurimuses kirjeldati RIC8 rolli väikeaju arengus, täpsemalt Bergmanni gliia adhesioonis basaalmembraanile (Ma jt., 2012). Basaalmembraan on õhuke ja tihe ekstratsellulaarse maatriksi kiht, mille põhilisteks komponentideks on laminiin ja IV tüüpi kollageen (Timpl, 1996). Basaalmembraan reguleerib erinevaid bioloogilisi protsesse: rakkude areng, jagunemine, diferentseerumine, kasv,

migratsioon, polaarsus ja adhesioon (Erickson ja Couchman, 2000). Bergmanni gliia on tüüp väikeajus paiknevaid astrotsüüte, mille rakukehad paiknevad Purkinje rakkude kihis ja jätked sirutuvad molekulaarkihti. Gliiarakke mööda toimub väikeaju arengu käigus granulaarsete eellasrakkude migratsioon välisest kihist sisemisse (Sillitoe ja Joyner, 2007). *In vitro* adhesioonikatsed on näidanud, et *Ric8^{-/-}* gliiarakud ei suudabasaalmembraani põhikomponendile, laminiinile, edukalt kinnituda. Mutantsete hiirte uurimisel, kellel *Ric8* geen on spetsiifiliselt välja lõigatud neuraalsetes eellasrakkudes, selgus, et ka nende gliiarakud ei ole basaalmembraanile kinnitunud, mille tõttu on häiritud nii Bergmanni gliia rakukehade asetus kui ka jätkete organisatsioon. Sellest tulenevalt esineb *Ric8* defektsetel hiirtel probleeme granulaarsete eellasrakkude migratsioonis sisemisse granulaarkihti, mistõttu väikeaju kihid ei moodustu korrektselt. Lisaks ei moodustu mutantsetes hiirtes ka korralikud väikeaju lehed, sest basaalmembraani sissesopistumine granulaarrakkude vahele on häiritud (Ma jt., 2012).

Imetajate arengus on rakkude interaktsioonid basaalmembraaniga olulised veel rakkude epiteliaal-mesenhümaalse transitsiooni (EMT) protsessis (Fujiwara jt., 2007), mis omakorda on tähtis gastrulatsioonis, kus toimub ulatuslik rakkude migratsioon ja lootelehtede teke (Nakaya ja Sheng, 2008). *Ric8^{-/-}* hiire embrüotel on täheldatud basaalmembraani katkendlikkust, organiseerimatust ning ka häiritud rakkude adhesiooni gastrulatsioonis. Nimelt on spekuleeritud, et *Ric8^{-/-}* hiirte embrüotel on adhesioon häiritud erinevate ekstraembrüonaalsete struktuuride vahel vanuses E8.5 (embrüonaalne vanus 8.5 päeva). Need adhesioonihäired võivadki tuleneda basaalmembraani puudulikkusest ja sellega kaasnevatest häiretest EMT protsessis ning viia embrüonaalse surma ja väärarenguteni gastrulatsioonis (Tõnissoo jt., 2010).

Adhesiooni vahendamisel rakkude ja ekstratsellulaarse maatriksi vahel on olulised erinevad adhesioonimolekulid. Mitmed defektid, mida on kirjeldatud β 1-integriinide, integriiniga seotud kinaaside ja düstroglükaani puudumisel, on samasugused nagu RIC8 valgu puudumisel (Graus-Porta jt., 2001; Qu ja Smith, 2005; Satz jt., 2008; Ma jt., 2012). Seega on adhesioonimolekulide defitsiidist põhjustatud defektid tõenäoliselt vahendatud signaaliradade kaudu, kus osaleb ka RIC8. Integriinide signaalirajas on näiteks oluline $G\alpha_{13}$ subühik (Gong jt., 2010), mida RIC8 GPCRst sõltumatult aktiveerib (Tall jt., 2003) ja samuti tsäperonina voltida aitab (Gabay jt., 2011; Chan jt., 2013). Fokaalse adhesiooni kompleksis on oluline integriiniga interakteeruv paksilliin, mille fosforüülimist reguleerib muuhulgas ka $G\alpha_{12/13}$ (Needham ja Rozengurt, 1998). Hiljutises uuringus on näidatud, et RIC8 defitsiitsed neuraalharja rakud ei ole võimelised migreerima ning neis on vähenenud aktiveeritud

paksilliini ja fokaalsete adhesioonide hulk. Seega võib RIC8 mõju neuraalharja rakkude migratsioonile olla vahendatud just $G\alpha_{12/13}$ ja paksilliini kaudu, mõjutades rakkude adhesiooni ECMiga (Fuentealba jt., 2013). RIC8 otsest interaktsiooni on näidatud neuraalsete rakkude adhesioonimolekuli NCAM (*neural cell adhesion molecule*) 180kDa isovormiga (Amoureux jt., 2012). See valk vahendab lisaks rakk-rakk adhesioonile ka mitmeid rakkudevahelisi interaktsioone ja signaale, mis on olulised sünapside moodustamisel ja sünaptilises plastilisuses, viies närvisüsteemi korrektse arenguni (Crossin ja Krushel, 2000; Rougon ja Hobert, 2003). NCAM180 interakteerub $G\alpha$ valguga ja kutsub esile β -adrenergilise vastuse vaid siis, kui on eelnevalt seotud RIC8 valguga. Seega võib olla mitmete adhesioonimolekulide mõju sõltuv RIC8 olemasolust (Amoureux jt., 2012).

1.3.4. RIC8 mõju aktiini tsütoskeletile

Hiljuti on uuritud ka RIC8 mõju rakkude aktiini tsütoskeletile, sest see on oluline nii rakkude adhesiooni- kui migratsiooniprotsessides. Hiire embrüonaalsete tüvirakkude kultuuris on näidatud, et $Ric8^{-/-}$ rakkudes on kogu aktiini ja polümeriseerunud aktiini hulk vastavalt 40% ja 70% võrra väiksem võrreldes metsiktüüpi rakkudega. $Ric8^{-/-}$ rakkudel esineb ka vähem filopoodi-sarnaseid struktuure, mida moodustavad aktiini polümeriseerunud filamendid. Lisaks on $Ric8^{-/-}$ rakkudes vähenenud RhoA-GTP hulk, mis viitab sellele, et vähenenud aktiini põhjuseks võib olla häiritud RhoA-signaalarada (Gabay jt., 2011). Nimelt on $G\alpha_{12/13}$ ja $G\alpha_q$ subühikud, mis on $Ric8^{-/-}$ rakkudes alla reguleeritud, olulised RhoGEFde ja seega kogu RhoA-signaalaraja aktiveerimisel (Hart jt., 1998). RhoA-signaalarada mõjutab fokaalsete adhesioonide induktsiooni, stressifibriidide teket (Chrzanowska-Wodnicka ja Burridge, 1996) ja aktiini polümeriseerumist. Viimases protsessis aktiveerib RhoA otseselt polümerisatsiooniedendavat faktorit profiliini (Watanabe jt., 1997) või inaktiveerib depolümeriseerivat faktorit kofiliini (Maekawa jt., 1999). Kuna aktiivse RhoA ekspresseerimine $Ric8^{-/-}$ rakkudes taastas esialgse aktiini hulga ja filopoodi-sarnaste struktuuride tekke, siis järelkult leiab RIC8-st sõltuv aktiini tsütoskeleti remodelleerimine aset just RhoA aktiveerimise tasemel (Gabay jt., 2011).

Drosophila puhul on aga näidatud, et $Ric8^{-/-}$ embrüo rakkudes on häiritud aktiini normaalne rakusisene lokalisatsioon. Kui normaalse arengu käigus paiknevad aktiini filamendid blastodermi rakkude servades, siis $Ric8^{-/-}$ embrüo rakkudes paiknevad aktiini filamendid hajutatult tsütoplasmas. Kortikaalse aktiini lokalisatsiooni häired põhjustavad $Ric8^{-/-}$ embrüotel ventraalsete rakkude ümardumise (*blebbing*). See leiab aset gastrulatsiooni ajal, kui embrüo blastodermi rakud ventraalsel poolel sisse sopistuvad (Kanesaki jt., 2013). Rakkude

sissesopistumine on oluline protsess gastrulatsioonis ja kudede moodustamises (Sweeton jt., 1991). Seega võib ka aktiini ebakorrektnel lokalisatsioon põhjustada embrüo väärarenguid, mida on *Ric8* puudulikes *Drosophila* ning ka hiire embrüotes varasemalt kirjeldatud (Hampoelz jt., 2005, Tõnissoo jt., 2010).

Rakukultuuri tingimustes on näidatud, et RIC8 on vajalik retseptor türosiini kinaasi (RTK) poolt vahendatud aktiini tsütoskeleti ümberpaigutumiseks ning sellest tulenevaks raku migratsiooniks (Wang jt., 2011). Rakkude migreerumisel moodustuvad aktiini tsütoskeleti ümberpaigutumise tulemusena membraansed kurrud, mille põhifunktsioon on staatilise raku ettevalmistamine migratsiooniks (Krueger jt., 2003). Eelnevalt on näidatud, et RIC8 seondumispartner $G\alpha_{13}$ on vajalik kasvufaktorite indutseeritud dorsaalsete kurdude dünaamiliseks tekkeks ja rakkude migratsiooniks. Need protsessid sõltuvad aga kasvufaktorite seondumisest vastavatele RTK retseptoritele (Wang jt., 2006). Algselt ei olnud teada, kuidas on omavahel seotud RTK ja $G\alpha_{13}$, kuid siis leiti, et nende seondumist vahendab RIC8. Nimelt mõjus RIC8 valgu mahasurumine kasvufaktori vahendatud dorsaalsete kurdude dünaamikale ja rakkude migratsioonile inhibeerivalt. Seega on RIC8 vajalik kasvufaktori retseptori poolt vahendatud aktiini tsütoskeleti ümberkorraldamiseks (Wang jt., 2011).

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1. Töö eesmärgid

1. Kirjeldada *Ric8*^{-/-} ES rakkude diferentseerumist neuraalseteks eellasrakkudeks.
2. Kirjeldada aktiini ja $G\alpha_i$ hulka *Ric8*^{-/-} ES rakkudes.

2.2. Materjal ja meetodika

2.2.1. Rakuliinid

Käesolevas töös kasutativarasemalt tekitatud *Ric8*^{-/-} ES rakuliini. *Ric8*^{-/-} rakkude saamiseks viidi *Ric8*^{lox/lox} (*Ric8* geeni 4 esimese eksoni ümber on loxP järjestused) rakkudesse elektroporatsiooni teel Cre-rekombinaas, mis lõikas välja loxP järjestuste vahel paiknevad *Ric8* geeni 4 esimest eksonit. *Ric8*^{lox/lox} rakud on eraldatud *Ric8*^{lox/lox} hiire blastotsüsti sisemisest rakumassist.

2.2.2. Rakkude genotüpiseerimine

Rakkude genotüpiseerimiseks viidi läbi PCR, kus kasutati järgnevaid alleelspetsiifilisi primereid:

ric5floxgeno	5'-CTTTTCCACGGGTGTTCTTC-3'
riccregenoR	5'-GCCAAACAATCTCTCGAACC-3'
riccregenoF	5'-GGTAGGGCTCACAATGTTGG-3'

Reaktsioonisegu maht oli 10µl. PCR reaktsioonisegu koosnes: 1x B puhver (10mM Tris-HCl pH 7.5, 10mM MgCl₂, 0,1mg/ml BSA) (Solis BioDyne), 0,2mM dNTP, 2mM MgCl₂, 0,3µM praimereid, 0,05U/µl Taq-polümeraas, 1µl DNA ja mQ vesi. Proovid kanti 1xTAEs (Tris-äädikhape, EDTA) valmistatud 1% või 1,5%-lisele agarosgeelile, kuhu lisati 5µl etiidiumbromiidi. DNA pikkusmarkerina kasutati 1kb või 100bp DNA *Ladder*'it (Thermo Scientific).

Kasutatud PCR-i programmi parameetrid:

95°C 5 minutit

95°C 30 sekundit

58°C 40 sekundit

72°C 1-2 minutit (vastavalt DNA fragmendi pikkusele)

72°C 10 minutit

} 32 tsükli

2.2.3. Rakkude kasvatamine koekultuuris

Neuraalse diferentseerumise katseks kasvatati *Ric8^{lox/lox}* ja *Ric8^{-/-}* hiire embrüonaalseid tüvirakke 2 päeva toiterakkudel (hiire embrüonaalsed fibroblastid, Millipore Inc.). Seejärel kasvatati neid 3 päeva toiterakkudeta DMEM *high glucose* söötmes (sisaldab juba naatriumpüruvaati ja L-glutamiini) (Invitrogen) [lisatud 20% veise looteserumit (FBS) (PAA), 1:10000 leukeemiat inhibeerivat faktorit (LIF) (Millipore Inc.), 1:100 asendamatuid aminohappeid (PAA), 1:100 penitsilliini-streptomütsiini (PAA) ja 0,1mM β-merkaptotetanooli (Appllichem)] tiheduseni ~80%. Edasi kasvatati rakke 24h seerumivabas ESGRO (Millipore Inc.) söötmes algse tihedusega 1,5x10⁵ rakku/cm². Nii DMEM kui ESGRO sööde hoiavad embrüonaalseid tüvirakke pluripotentses seisundis ja ei lase neid diferentseeruma. Seejärel külvati rakud RHB-A söötmesse (StemCells Inc.) tihedusega 1x10⁴ rakku/cm². RHB-A sööde soodustab ES rakkude diferentseerumist neuraalses suunas.

Rakkude kasvatamisel kasutati 0,1% želatiiniga kaetud 6 cm ja 10 cm läbimõõduga Petri tasse. Rakkudel vahetati söödet iga päev ja rakke passeeriti ülepäeva. Rakkude passeerimiseks

eemaldati rakkudelt sööde, pesti PBSiga (fosfaadiga puhverdatud füsioloogiline lahus) ja seejärel trüpsineeriti rakud tassilt lahti, lisades 1-3ml ESGRO Complete trüpsiinilahust (Millipore Inc.) vastavalt tassi suurusele. Trüpsiin inaktiveeriti söötmega, tsentrifugeeriti 5 min 200g juures ning sade resuspendeeriti uues söötmes ja kanti uutele Petri tassidele. Rakke kasvatati inkubaatoris 37°C ja 5% CO₂ sisalduse juures. Rakkude lugemiseks kasutati rakuloenduskambrit.

2.2.4. Rakkude pildistamine

Kõiki käesolevas töös kasvatatud rakke vaadeldi mikroskoobiga Nikon Eclipse TS100 ja pildistati sellele kinnitatud kaameraga Nikon DS-Fi2. Piltide järeltöötamiseks kasutati arvutiprogrammi Adobe Photoshop CS6.

2.2.5. Rakkudest totaalse RNA eraldamine

Peatükis 2.2.3 kirjeldatud neuraalsete eellasrakkude kasvatamisel võeti iga päev üks *Ric8^{lox/lox}* ja *Ric8^{-/-}* rakkudega Petri tass totaalse RNA eraldamiseks (D0-D5). Selleks rakud trüpsiniseeriti ning koguti 15ml tuubi ja tsentrifugeeriti 5min 200g juures. Sade suspendeeriti uuesti 1ml söötmes ja tsentrifugeeriti 5min 200g juures. Sööde aspireeriti ja rakud homogeniseeriti 100-500µl Trizol[®] reagentiga (Invitrogen) vastavalt kogusele (0,75ml Trizoli 5-10x10⁶ raku kohta). Segu inkubeeriti 5 minutit toatemperatuuril, seejärel lisati 1ml Trizoli kohta 0,2ml kloroformi, 1,5ml tuubi raputati 15 sekundit ja inkubeeriti veel 2 minutit. Seejärel tsentrifugeeriti 15min 12000g juures. RNAd sisaldav vesifaas pipeteeriti uude tuubi ja lisati 0,5ml 100% isopropanooli 1ml kasutatud Trizoli kohta. Inkubeeriti veel 10 minutit ja tsentrifugeeriti 10min 12000g juures. Järgnevalt isopropanool eemaldati ja sadestatud RNA pesti 1ml 75% etanooliga. RNA suspendeeriti RNAasi-vabas DEPCiga (dietüülpürokarbonaat) töödeldud vees.

2.2.6. cDNA süntees

5µg RNA proovile (DEPC-ga töödeldud vees) lisati oligo(dT)₁₇ praimerit (lõppkontsentratsioon reaktsioonisegus 2,5µM) ja dNTP segu (0,5µM). Proove inkubeeriti praimerite seondumiseks 5 minutit 65° C juures ja seejärel hoiti 1 minut jääl. Lisaks RNA proovile, praimerile ja dNTP segule sisaldas lõplik cDNA reaktsioonisegu 1x First Strand puhvrit (50 mM Tris-HCl pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂), 5mM MgCl₂, 10mM DTT (ditiotreitol), 2U/µl RNaseOUT[™] ja 10U/µl SuperScript[™] III pöördtranskriptaasi (Invitrogen). Reaktsioonisegu maht oli 20µl. cDNA sünteesiks inkubeeriti proove 50 minutit

50°C juures ning reaktsiooni peatamiseks inkubeeriti veel 5 minutit 85°C juures. Proovid jahutati jääl ja säilitati edasiseks kasutamiseks -20°C juures.

2.2.7. Kvantitatiivne reaalaaja PCR

Kvantitatiivne reaalaaja-PCR viidi läbi StepOnePlus Real-Time PCR System masina (Applied Biosystems) ja StepOne Software v2.0 tarkvara abil. Reaktsioonisegu maht oli 10µl. Reaktsioonisegu koosnes: 1x HOT FirePol®EvaGreen qPCR Mix Plus segu (2,5mM MgCl₂, HOT FIREPol® DNA Polümeraas, dNTPd, EvaGreen® qPCR puhver, EvaGreen® värv ja ROX värv) (SolisBioDyne), 0,2µM praimerid, 1µl cDNA ja mQ vesi. Proovid kanti PCR plaadile kolmekordse kordusena. Kõikide praimeritega viidi katse läbi vähemalt 2 korda ja saadud tulemustest võeti statistilisel analüüsil keskmised väärtused. Uuritavate geenide mRNA ekspressioonitaseme hindamiseks arvutati suhe *Hprt* (*hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*) suhtes. Suhteline ekspressioonitase (x) arvutati $\Delta\Delta Ct$ valemiga $x=2^{-\Delta\Delta Ct}$, kus $\Delta\Delta Ct = (Ct_{-}[uuritav mRNA]-Ct_{-}[Hprt]) - (Ct_{lox}[uuritav mRNA]-Ct_{lox}[Hprt])$

Kasutatud qRT-PCR programm:

95°C 12 minutit

95°C 15 sekundit

} 40 tsüklit

60°C 1 minut

Katsetes kasutatud praimerid

<i>Esrrb</i>	F 5'-CAC CTG CTA AAA AGC CAT TGA CT-3'
	R 5'-CAA CCC CTA GTA GAT TCG AGA CGA T-3'
<i>Fgf5</i>	F 5'-TGC AAG TGC CAA ATT TAC GGA-3'
	R 5'-AGT TCT GTG GAT CGC GGA CGC ATA GGT A-3'
<i>Blbp</i>	F 5'-AAA GTG GTG ATC CGG ACA CAA T-3'
	R 5'-CCA ACC GAA CCA CAG ACT TAC A-3'
<i>Hprt</i>	F 5'-CAC AGG ACT AGA ACA-3'
	R 5'-GCT GGT GAA AAG GAC-3'
<i>Ric8</i>	F 5'-GAG GAG TTC CAC GGC CAC A-3'
	R 5'-CTT CAG CCT GTG GGT CTG GTG-3'

2.2.8. Western blot

Valgulüsaadi saamiseks koguti Petri tassidelt *Ric8^{lox/lox}* ja *Ric8^{-/-}* ES rakud, pesti PBSiga ja lüüsi 2xSDS proovipuhvris (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glütserooli, 1% β -merkaptopetaanooli, 0,02 % bromofenool sinist) vastavalt rakkude kogusele (1ml proovipuhvrit 50mg rakkude kohta). DNA ahelate lõhustamiseks kasutati sonikaatorit Bioruptor UCD-200 (Diagenode). Proove säilitati -20°C juures.

Valkude lahutamiseks kasutati SDS-PAAG elektroforeesi. Kontsentreeriva geelina kasutati 4% polüakrüülamiidgeeli [4% akrüülamiid, 125mM Tris/Tric pH 6.8, 0,1% SDS, 1:100 naatriumpersulfaat (NAPS), 1:1000 tetrametüületüleendiamiin (TEMED)] ja lahutava geelina 10% polüakrüülamiidgeeli (10% akrüülamiid, 375mM Tris/Tric pH 8.8, 0,1% SDS, 1:100 NAPS, 1:1000 TEMED). Geelile kanti 15 μ l totaalkvalku. Geeli jooksutati 1xSDS puhvris (25mM Tris pH 8.3, 192mM glütsiin, 0,1% SDS) 15-30 minutit voolutugevusel 60V ja 1 tund voolutugevusel 120V. Järgnevalt kanti valgud üle metanooliga määratud PDVF (polüvinüülideendifluoriid) membraanile. Valkude ülekande toimus 1 tund voolutugevusel 60mA ülekandepuhvris, mis sisaldas 10mM CAPSi (N-tsükloheksüül-3-aminopropaansulfoonhape) ja 10% (v:v) metanooli. Valkude elektroforeesiks ja ülekandmiseks membraanile kasutati BioRadMini-PROTEAN® Tetracell aparatuuri. Membraani pesti TBSiga (Trisiga puhverdatud füsioloogiline lahus) ja mittespetsiifilise seondumise blokeerimiseks inkubeeriti membraani 1 tund blokeerimislahuses (10% piimapulbrit, 1x TBS). Edasi pesti membraane 2x5 minutit TBSis. Seejärel inkubeeriti membraane üleöö primaarse antikehaga (1% piimapulbri lahuses TBSis). Kasutatud primaarsed antikehad:

Hiire valmistatud β -aktiini vastane antikeha (Abcam), lahjendusega 1:1000

Küülikus valmistatud $G\alpha_{i(1+2)}$ vastane antikeha (Abcam), lahjendusega 1:1000

Hiire valmistatud GAPDH vastane antikeha (GeneTex), lahjendusega 1:10000

Hiire valmistatud RIC8 vastane antikeha (Abcam), lahjendusega 1:800

Membraane pesti 4x5 minutit TBSis ja inkubeeriti 1 tund sekundaarse antikehaga (1% piimapulbri lahuses TBSis). Kasutatud sekundaarsed antikehad:

Aluselise fosfataasiga konjugeeritud hiire IgG vastane antikeha (Vector Labs), lahjendusega 1:1000

Aluselise fosfataasiga konjugeeritud küüliku IgG vastane antikeha (Vector Labs), lahjendusega 1:1000

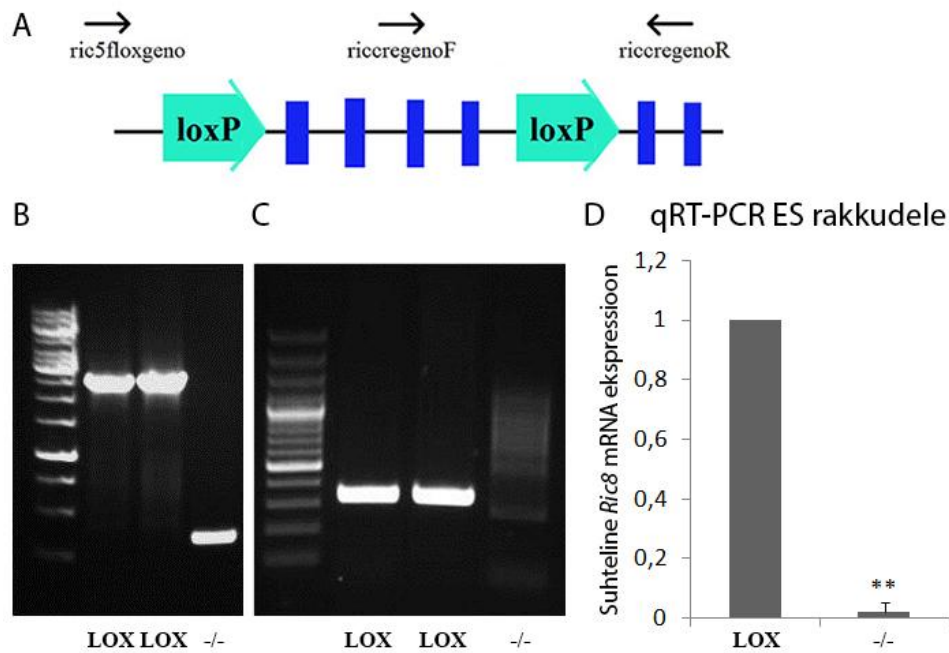
Järgnevalt pesti membraane veel 4x5 minutit TBSis. Valkude nähtavaks toomiseks inkubeeriti membraane pimedas 5ml-s aluselise fosfataasi puhvris (100mM NaCl, 5mM MgCl₂, 100mM Tris pH 9.5), mis sisaldas 330µg/ml NBTd (nitrosinine tetrasool, Sigma-Aldrich) ja 167µg/ml BCIPi (5-bromo-4-kloro-3-indolüülfosfaat, Sigma-Aldrich) kuni tulemuse ilmumiseni.

Valgu hulga kvantifitseerimiseks kasutati arvutiprogrammi ImageJ. Piltidega tehti kaks sõltumatut mõõtmist ning tulemused keskmistati. *Western blot* viidi samade antikehadega läbi 3 korda. Andmete statistiliseks analüüsiks kasutati *Student*’i T-testi programmis Excel.

2.3. Tulemused

2.3.1. *Ric8*^{-/-} ES rakkude kontrollimine

Ric8^{-/-} ES rakuliin oli varasemalt meie töörühmas tekitatud kasutades Cre-Lox rekombinatsioonisüsteemi. *Ric8*^{-/-} rakkudes on loxP järjestuste vahelt 4 eksonit Cre-rekombinaasi poolt välja lõigatud. Kontrollina kasutati *Ric8*^{lox/lox} ES rakke, mida ei eksponeeritud Cre rekombinaasile (joonis 3A). Cre rekombinaasi poolt põhjustatud *Ric8* deletsiooni toimumise kinnitamiseks kasutati praimereid ric5floxgeno ja riccregenoR, mis seonduvad kahele poole loxP järjestusi. *Ric8*^{-/-} rakkudes, kus Cre rekombinaas on loxP järjestuste vahele jääva ala välja lõiganud, tekib lühike produkt (300 bp) ning *Ric8*^{lox/lox} rakkudes tekib pikk produkt (2500 bp) (joonis 3B). Lisaks kasutati riccregenoF ja riccregenoR praimereid, millest esimene seondub loxP järjestuste vahele. Seega tekib *Ric8*^{lox/lox} rakkudes produkt pikkusega 350 bp ja *Ric8*^{-/-} rakkudes ei teki üldse produkti, sest loxP järjestuste vaheline ala on väljalõigatud ja esimesel praimeril pole kuhugi seonduda (joonis 3C). qRT-PCRiga kinnitati, et *Ric8*^{-/-} rakkude cDNA pealt ei teki amplifitseeritud produkti (joonis 3D). Järelikult ei transleerita *Ric8* geenilt täispikka mRNA-d ega sünteesita ka funktsionaalset valku.

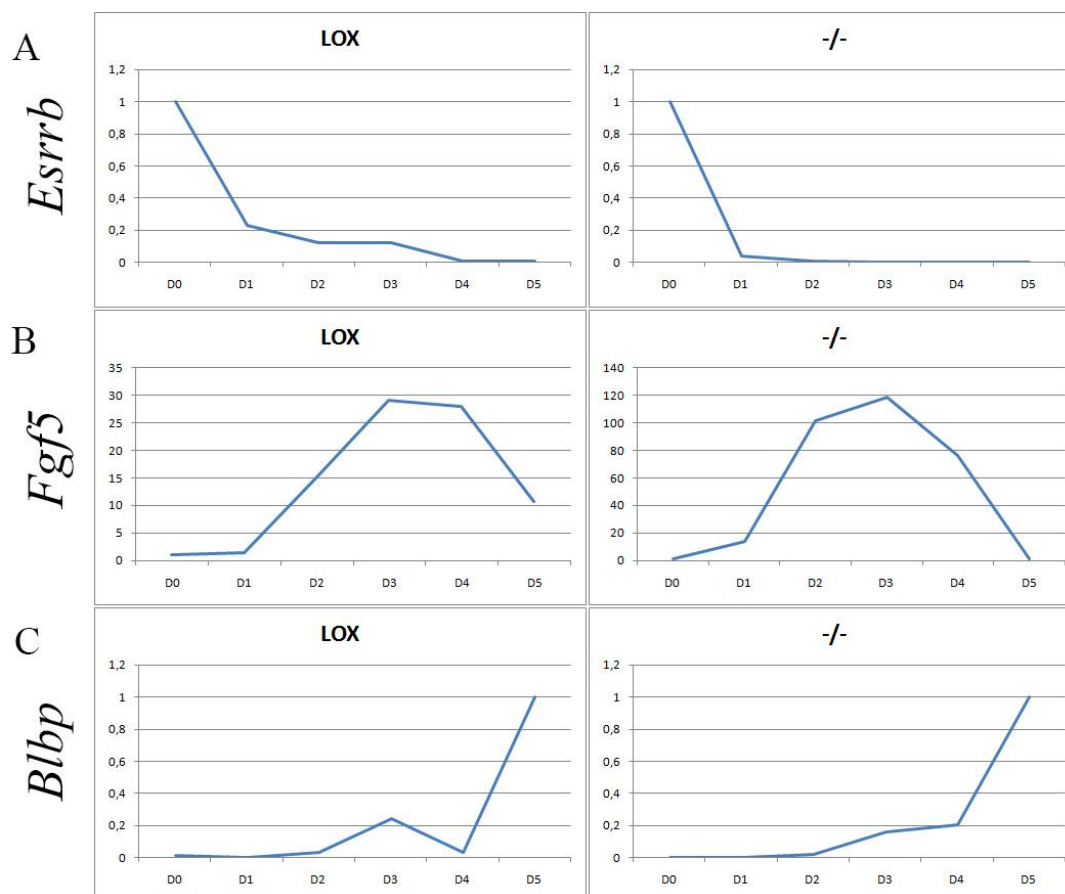


Joonis 3. Eelnevalt tekitatud *Ric8*^{-/-} ES rakkudes on *Ric8* esimesed 4 eksonit välja lõigatud ja mRNA-d ei sünteesita (A) *Ric8* geeni neli esimest eksonit (eksonid tähistatud tumesiniselt) on viidud loxP järjestuste vahele. Kui elektroporatsiooniga viiakse rakkudesse Cre-rekombinaas, siis lõigatakse välja neli loxP järjestuste vahele jäävat *Ric8* eksonit. Musta noolega on näidatud genotüüpiseerimiseks kasutatud primerite seondumiskohad. (B) *Ric8*^{lox/lox} (LOX) rakkudes tekib produkt pikkusega 2500 bp ning *Ric8*^{-/-} (-/-) rakkudes pikkusega 300 bp. Pikkusmarkerina on kasutatud 1 kb *Ladder*'it (Thermo Scientific). (C) *Ric8*^{lox/lox} rakkudes tekib produkt pikkusega 350 bp ning *Ric8*^{-/-} rakkudes ei tekkinud produkti. Pikkusmarkerina on kasutatud 100 bp *Ladder*'it (Thermo Scientific). (D) *Ric8* mRNA suhtelise ekspressiooni võrdlus *Ric8*^{lox/lox} ja *Ric8*^{-/-} rakkudes qRT-PCRil. ** P<0,01.

2.3.2. Neuraalse diferentseerumisraja markerite ekspressiooni kirjeldamine

Diferentseerumata embrüonaalsed tüvirakud ekspresseerivad mitmeid erinevaid gene, mis aitavad neid hoida pluripotentsena. Käesolevas töös kasutati ES rakkude tuvastamiseks *Esrrb* (*estrogen-related receptor beta*) markerit. ESRRB valk seondub koos OCT4 valguga olulise pluripotentsuse geeni *Nanog*'i promooteralale ja aktiveerib selle ekspressiooni (van den Berg jt., 2008). Nii *Ric8*^{lox/lox} kui *Ric8*^{-/-} rakkude puhul oli *Esrrb* ekspressioon kõrge ES raku staadiumis (D0) ja rakkude kasvatamisel neuraalset diferentseerumist soodustavas söötmes langes see järsult (joonis 4A). *Esrrb* markeri langusele järgnes *Fgf5* (*fibroblast growth factor 5*) tõus. *Fgf5* on primitiivse ektodermi marker, mis rakukultuuris tähistab varase primitiivse ektodermi sarnast rakustaadiumit. Nii *Ric8*^{lox/lox} kui ka *Ric8*^{-/-} rakkudes oli *Fgf5* ekspressioon kõrge diferentseerumise 2-4. päeval (joonis 4B), nii nagu kirjanduse põhjal oodata võis (Abranches jt., 2009). Ka neuraalsete eellasrakkude markeri *Blbp* (*brain lipid binding protein*) ekspressioonis polnud *Ric8*^{lox/lox} ja *Ric8*^{-/-} rakkude vahel erinevust näha.

Mõlemas rakuliinis hakati *Blbp*'d ekspresseerima kolmandal päeval, neljandal päeval ekspressioonitaseme kasv peatus (*Ric8^{lox/lox}* rakkude puhul isegi langes), kuid viiendaks päevaks saavutati kõrge ekspressioonitase (joonis 4C). BLBP valku sünteesitakse neuuraalsetes eellasrakkudes ja see on vajalik radiaalglia tekkeks. Seega, võrreldes *Ric8^{-/-}* ja *Ric8^{lox/lox}* rakke, võib järeldada, et RIC8 puudumine ei mõjuta ES rakkude võimet diferentseeruda neuuraalseteks eellasrakkudeks.

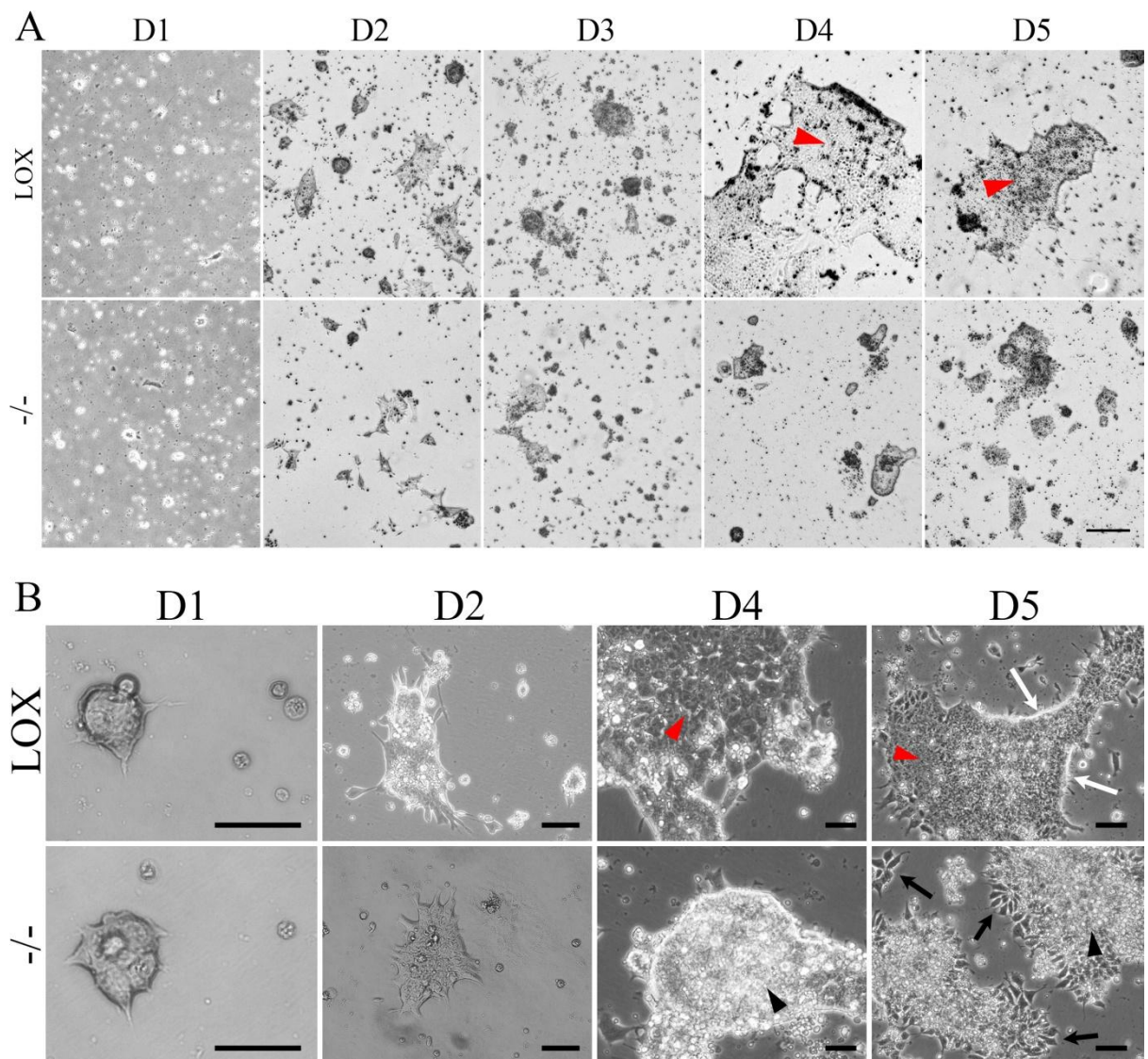


Joonis 4. Diferentseerumisraja markerite suhteline mRNA ekspressioon. Vasakus veerus on näidatud *Ric8^{lox/lox}* ja paremas *Ric8^{-/-}* ES rakkudes vastavate markerite suhteline ekspressioonitase. (A) Embrüonaalsete tüvirakkude markeri *Esrrb* suhteline ekspressioon (B) Varase primitiivse ektodermi sarnase rakustaadiumi markeri *Fgf5* suhteline ekspressioon (C) Neuuraalsete eellasrakkude markeri *Blbp* suhteline ekspressioon. *Esrrb* ja *Fgf5* graafikutel on kujutatud suhtelised ekspressioonitasemed D0 päeva suhtes ning *Blbp* graafikul D5 päeva suhtes.

2.3.3. Rakkude morfoloogia kirjeldamine diferentseerumisel neuuraalseteks eellasrakkudeks

ES rakkude kasvatamisel neuuraalset diferentseerumist soodustavas söötmes oli juba teisel päeval märgata, et *Ric8^{-/-}* rakke oli kontrollrakkudega võrreldes silmnähtavalt vähem ning samuti olid tekkinud kolooniad väiksemad (joonis 5A). Samuti võis märgata morfoloogilisi

erinevusi *Ric8^{-/-}* ja kontrollrakkude kolooniate vahel. Seerumi- ja toiterakkude vabades tingimustes želatiiniga kaetud plastikul peaksid nii ES rakud kui ka neuraalses suunas diferentseeruvad tüvirakud kasvama ühekihilisena ehk *monolayer*'ina (Ying jt., 2003). *Ric8^{lox/lox}* rakkude puhul see nii oligi ja moodustusid suured ühekihilised kolooniad (punased nooleotsad joonistel 5A ja 5B). *Ric8^{-/-}* rakkude kolooniad olid väiksemad ja oli näha, et rakud ei moodusta *monolayer*'it vaid mitmekihilisi kolooniaid (mustad nooleotsad joonisel 5B). Lisaks oli 4-5. päeval pärast neuraalset diferentseerumist soodustavas söötmes kasvamist *Ric8^{-/-}* kolooniate servades näha hulgaliselt lamendunud rakke (mustad nooled joonisel 5B), *Ric8^{lox/lox}* kolooniate servades leidis neid vähemal määral (valged nooled joonisel 5B).

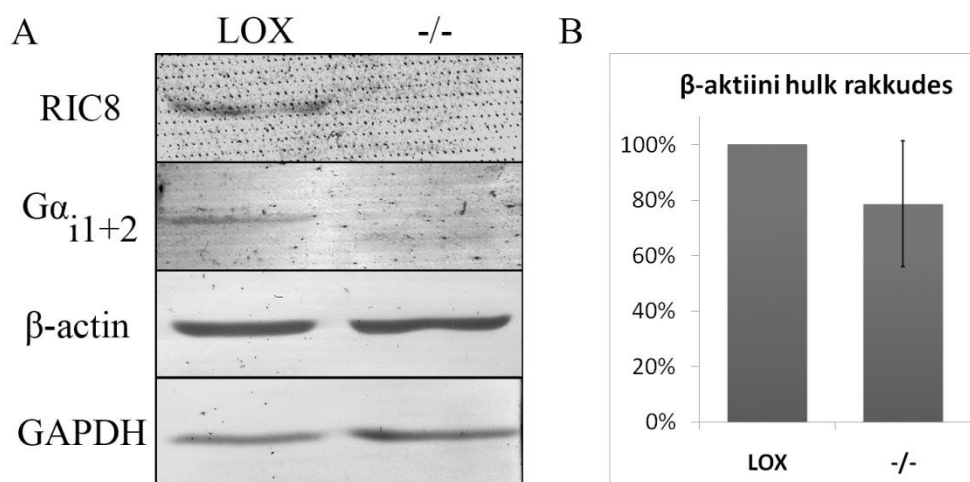


Joonis 5. Embrüonaalsete tüvirakkude diferentseerumine neuraalseteks eellasrakkudeks (A) Rakkude arvukuse ja kolooniate suuruse võrdlus. (B) Kolooniate morfoloogia võrdlus *Ric8^{lox/lox}* ja *Ric8^{-/-}* rakkudega kultuurides. D1-D5 tähistab päevade arvu, kui kaua rakud on kasvanud neuraalset diferentseerumist soodustavas söötmes. Mustade nooltega on näidatud tumedad ja lamendunud rakud kolooniate servades. Valgete nooltega on

näidatud siledad kolooniate servad. Mustad nooleotsad viitavad mitmekihilistele kolooniatele, punased nooleotsad aga ühekihilistele kolooniatele. Mõõtlõigud: (A) 200µm, (B) 50µm.

2.3.4. $G\alpha_i$ ja aktiini hulga kirjeldamine *Western blot*'iga

$Ric8^{lox/lox}$ ja $Ric8^{-/-}$ ES rakkudes määrati *Western blot* meetodiga β -aktiini, $G\alpha_{i1+2}$ ja RIC8 valgu hulk. *Western blot* kinnitas, et $Ric8^{-/-}$ rakkudes ei sünteesita RIC8 valku (joonis 6A). Järgnevalt määrati rakkudes $G\alpha_{i1+2}$ tase. $Ric8^{lox/lox}$ rakkudes oli $G\alpha_{i1+2}$ valk küll ekspresseeritud, kuigi tase oli suhteliselt madal. Samas $Ric8^{-/-}$ ESrakkude puhul $G\alpha_{i1+2}$ valk ei olnud detekteeritav (joonis 6A). Ka varasemalt on näidatud $G\alpha$ subühikute hulga drastilist vähenemist $Ric8^{-/-}$ rakkudes valgu tasemel (Hampoelz jt., 2005; Gabay jt., 2011). Lisaks on varasemalt $Ric8^{-/-}$ rakkude puhul näidatud β -aktiini vähenemist 40% võrra (Gabay jt., 2011). β -aktiini detekteerimisel visuaalselt eriärasusi $Ric8^{-/-}$ ja $Ric8^{lox/lox}$ rakupopulatsioonide vahel ei täheldatud (joonis 6A). Seetõttu kasutati β -aktiini hulga kvantifitseerimiseks arvutiprogrammi ImageJ, kus iga pildiga viidi läbi kaks sõltumatut mõõtmist ning tulemused keskmistati. Kolme katse keskmisena oli $Ric8^{-/-}$ ES rakkudes β -aktiini hulk 21% väiksem kui $Ric8^{lox/lox}$ rakkudes, olles statistiliselt olulise piirimail ($P=0,055$) (joonis 6B). Valgu koguse hindamiseks kasutati kontrollina ES rakkudes laialdaselt ekspresseeritavat GAPDHd, mis näitas, et $Ric8^{-/-}$ proovis on veidi rohkem materjali (joonis 6A).



Joonis 6. β -aktiini ja $G\alpha_i$ valgu taseme võrdlus *Western blot*'iga $Ric8^{-/-}$ ja $Ric8^{lox/lox}$ ES rakkudes. (A) RIC8 ja $G\alpha_{i1+2}$ ning β -aktiini valkude tase on $Ric8^{-/-}$ ES rakkudes võrreldes $Ric8^{lox/lox}$ ES rakkudega alla reguleeritud. Valgulis saadi kontrolliks kasutati GAPDHd. (B) β -aktiini suhteline tase $Ric8^{-/-}$ rakkudes $Ric8^{lox/lox}$ rakkude suhtes. $P=0,055$.

2.4. Arutelu

G valkude nukleotiidivahetusfaktor RIC8 on loomariigis konserveerunud valk, millel on kirjeldatud olulist rolli mitmetes mudelorganismides. RIC8 funktsiooni on kirjeldatud rakkudes käävi orientatsioonil, närviülekanedes, adhesioonil ja migratsioonil (Nurrish jt., 1999; Miller jt., 2000; Miller ja Rand, 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).

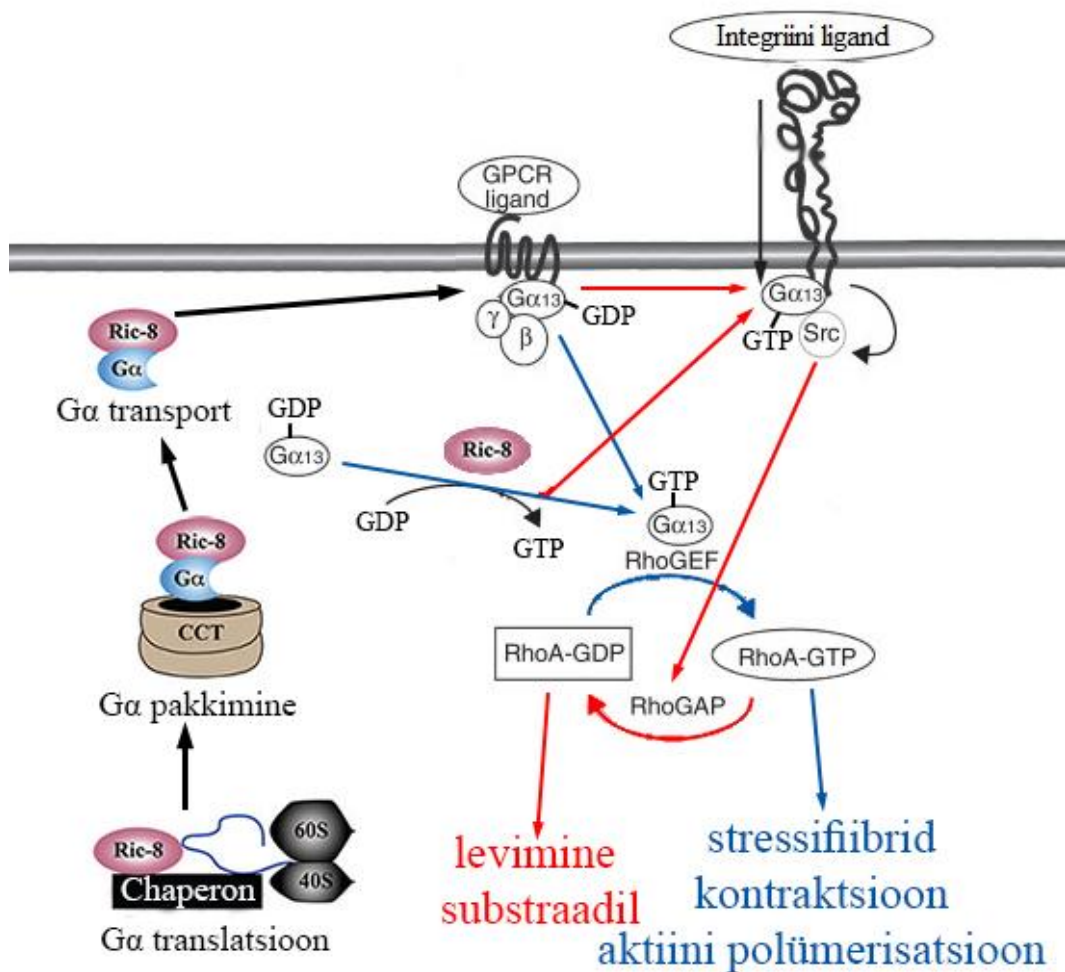
Antud töö üheks eesmärgiks oli uurida, kas *Ric8^{-/-}* ES rakuliin on võimeline diferentseeruma neuraalseteks eellasrakkudeks (NP rakud) ning nendest edasi moodustama neuraalseid rosette, mis on heaks mudeliks mõistmaks *in vivo* toimuvat neuraalset moodustumist ja närvisüsteemi arengut (Abranches jt., 2009). Kuna varasemalt on kirjeldatud RIC8 funktsiooni asümmeetrilisel jagunemisel, mis on oluline ka neuraalses diferentseerumisrajas, siis otsustati käesolevas töös varasemalt tekitatud *Ric8^{-/-}* rakke neuraalses suunas diferentseerida.

Varasemalt ei ole näidatud, et RIC8 mõjutaks rakkude diferentseerumist. Käesolevas töös tehtud diferentseerumisraja markerite analüüs qRT-PCRiga näitas, et *Ric8^{-/-}* ES rakud olid võimelised diferentseeruma NP rakkudeks, läbides ka eelnevalt varase primaarse ektodermi sarnase staadiumi. NP rakkude markeri *Bibp* puhul toimus neljandal diferentseerumispäeval ekspressiooni kasvu pidurdumine ning *Ric8^{lox/lox}* rakkudes isegi langus, kuid see on ilmselt tingitud nende proovide eripäradest ning ei näita üldist tendentsi. Saadud tulemustest võib järeldada, et RIC8 ei mõjuta rakkude võimet diferentseeruda neuraalses suunas. *Ric8^{-/-}* ES rakkude diferentseerumine ei kulgenud siiski probleemideta, sest nii ES kui ka diferentseeruvate rakkude staadiumis oli märgata erinevusi *Ric8^{-/-}* ja kontrollrakkude morfoloogias. Täheledatai, et *Ric8^{-/-}* rakkude kolooniate servades on hulgaliselt tumedaid lamendunud rakke, samas kontrollrakkude kolooniate servades ei olnud selliseid rakke märgata. Kirjanduses leiduvate kirjelduste põhjal võib oletada, et need lamendunud rakud on läinud diferentseeruma mitteneuraalses suunas (Abranches jt., 2009; Stavridis jt., 2010). Põhjus, miks *Ric8^{-/-}* kolooniates on rohkem mitteneuraalses suunas diferentseerunud rakke, on hetkel teadmata. Lisaks täheledatai, et *Ric8^{-/-}* rakud ei suuda kasvada ühekihiliste kolooniatena nagu kontrollrakud, vaid moodustavad mitmekihilisi rakukogumikke. Samuti olid *Ric8^{-/-}* rakkude kolooniad silmnähtavalt väiksemad kui kontrollrakkude kolooniad. Loendatud rakkude üldarv aga ei olnud *Ric8^{-/-}* rakkude puhul nii palju väiksem kui kolooniate erinevuse järgi eeldada võiks. Seda ebakõla võiks põhjendada *Ric8^{-/-}* kolooniate mitmekihilisus, sest *Ric8^{-/-}* mitmekihilisse kolooniasse võib koonduda pindala kohta rohkem rakke kui ühekihilisse kontrollrakkude kolooniasse. Need erinevused *Ric8^{-/-}* ja kontrollrakkude vahel ilmnid

toiterakkude (hiire embrüonaalsed fibroblastid) vabas keskkonnas, kus rakud kinnituvad substraadile. Samas ES rakkude kasvatamisel Petri tassil, mis oli kaetud toiterakkudega, ei olnud erinevusi kontrollrakkude ja *Ric8^{-/-}* rakkude vahel märgata. Eelnevad tulemused andsid põhjuse oletada, et *Ric8^{-/-}* rakud ei ole võimelised korralikult substraadile kinnituma, kuid rakk-rakk kontaktid on säilinud. Kuna rakud ei suuda korralikult moodustada fokaalseid adhesioone ja substraadil laiali minna, siis nad pigem moodustavad mitmekihilisi kolooniaid. Varasemalt on kirjanduses näidatud, et *Ric8^{-/-}* rakud ei suuda kinnituda ekstratsellulaarse maatriksi komponentidele, nagu fibronektiin ja laminiin (Ma jt., 2012; Fuentealba jt., 2013). Seega antud töö tulemused näitasid, et *Ric8^{-/-}* ES rakuliini diferentseerimine neuraalses suunas neil tingimustel on raskendatud. Seetõttu loobuti käesolevas töös rakkude kasvatamisest rosetideks. Edasistes uuringutes võiks eraldada neuraalseid tüvirakke (NS rakud) hiire embrüotest, kellel on *Ric8* geen neuraalsetes eellasrakkudes välja löödud ning kasvatada neurosfääre (Louis ja Reynolds, 2010). Neurosfäärid on hõljuvad NS rakkude kogumikud, mida kasvatatakse söötmes ilma rakkude kinnitumist võimaldava substraadita. Tõstes neurosfäärid ümber substraadiga kaetud Petri tassidele, peaksid neurosfäärid hakkama lamenduma. Seega oleks võimalik uurida, kas RIC8 olemasolu mõjutab NS rakkude võimet substraadile kinnituda, neurosfäärist välja migreeruda ja neuraalseteks rakkudeks diferentseeruda (Youn jt., 2009; Luo jt., 2011).

RIC8 mõju erinevatele molekulaarsetele mehhanismidele ja ka adhesioonile on vahendatud $G\alpha$ subühikute kaudu. RIC8 funktsiooni nukleotiidivahetusfaktorina on näidatud $G\alpha_i$, $G\alpha_{13}$, $G\alpha_o$ ja $G\alpha_q$ subühikute juures ning see mõjutab mitoosikäevi orientatsiooni, virgatsainete vabanemist neuromuskulaarses sünapsis, maitseretseptorite signaali ülekannet ning mitmeid teisi protsesse. Lisaks RIC8 funktsioonile GEFina on kirjeldatud ka valgude käitumist tsaperonina G valkude erinevatele subühikutele. Ilma RIC8 valguta ei suudeta $G\alpha$ subühikuid korralikult kokku pakkida ja voltida. Seetõttu jääb valessti volditud valk tsütoplasmasse, kus ta ära tuntakse ja degradeeritakse. Seega ei jõua $G\alpha$ raku plasmamembraanile, kus ta edukaks funktsioneerimiseks olema peab (Gabay jt., 2011; Chan jt., 2013). Kirjanduses on näidatud, et *Ric8^{-/-}* ES rakkudes on vähenenud G valgu subühikute $G\alpha_i$, $G\alpha_{13}$, $G\alpha_q$, $G\alpha_o$ ja ka $G\beta$ hulk (Hampoelz jt., 2005; Gabay jt., 2011). Käesoleva töö tulemustest selgus, et *Ric8^{-/-}* rakkudes oli $G\alpha_{i1+2}$ valk võrreldes kontrollrakkudega alla reguleeritud. Siiani avaldatud andmete põhjal võib oletada, et RIC8 on universaalne G valkude funktsiooni reguleerija organismis. Seega võib RIC8 mõju rakkude adhesioonile seletada $G\alpha$ subühikute vahendatud signaaliradade kaudu. $G\alpha_{13}$ rolli on näidatud fokaalse adhesiooni põhivalgu integriini esimeses aktivatsioonis (Nieswandt jt., 2002) ja ligandi seondumisele järgnevas signaalirajas (Shen jt., 2012). Seega,

kui RIC8 puudumine põhjustab $G\alpha_{13}$ subühiku ebakorrektselt voltumist ja sellest tulenevat degradeerimist, siis väheneb selle subühiku hulk plasmamembraanil. $G\alpha_{13}$ suudab aga integriini signaalirada mõjutada vaid siis, kui paikneb plasmamembraanil ja on aktiveeritud GPCR retseptori või retseptorist sõltumatu RIC8 poolt. Seega võib RIC8 reguleerida $G\alpha$ hulka läbi RIC8 tšaperoni või retseptorist sõltumatu GEFi funktsiooni (joonis 7). $G\alpha$ subühikud on olulised integriini aktivatsiooni initsiatsioonis, muutes integriini ligandile afiinsemaks. $G\alpha$ subühikute puudumisel aktiveerub seega selles etapis vähem integriine, mis suudaks ligandi siduda (Nieswandt jt., 2002). Edasises töös saaks seda lihtsalt kontrollida *Western blot*'il või immuunotsütokeemilise analüüsiga, kasutades antikehi, mis tunnevad rakkudes ära totaalse integriini ja aktiveeritud integriini. Käesolevas töös see ei õnnestunud, sest olemasolevad inimese vastased totaalse ja aktiivse integriini antikehad hiire rakkudel ei töötanud. Oletada võib, et *Ric8*^{-/-} rakkudes on totaalse integriini hulk sama ja aktiivse integriini hulk väiksem kui kontrollrakkudes, mis tõestaks RIC8 olulist rolli integriinide aktivatsioonil. Kõik integriinid ei jää siiski aktiveerimata, sest aktivatsioonil mängib lisaks $G\alpha$ subühikutele rolli palju muid olulisi valke. Seega seovad aktiveeritud integriinid raku kokkupuutel ekstratsellulaarse maatriksiga ligandi, kuid sellest edasine signaalirada on RIC8 olemasoluta puudulik. Nimelt ei ole siis aktiivset $G\alpha_{13}$ subühikut, mis seonduks integriini β subühiku külge ja aktiveeriks c-*Src* kinaasi (Shen jt., 2012). See omakorda on aga vajalik, et fosforüülida mitmeid teisi fokaalse adhesiooni kompleksis olevaid valke ja kanda signaal edasi aktiini tsütoskeletile (Arthur jt., 2000). Üks sellistest fokaalse adhesiooni kompleksi valkudest, mille fosforüülitud vormi vähenemist on *Xenopus*'e *Ric8*^{-/-} rakkudes hiljuti näidatud, on paksilliin (Fuentealba jt., 2013). Lisaks on aktiveeritud c-*Src* vajalik RhoA signaaliraja inhibeerimiseks, et võimaldada rakkude levimist substraadil (Arthur jt., 2000; Gong jt., 2010) (joonis 7). Seega võib kirjanduse põhjal üsna kindlalt väita, et RIC8 puudumisel on inhibeeritud $G\alpha_{13}$ -vahendatud integriini signaalirada, mistõttu ei teki fokaalsed adhesioonid raku ja ekstratsellulaarse maatriksi vahel. Uute fokaalsete adhesioonide teke on aga vajalik rakkude kinnitumiseks ja levimiseks substraadil. Eelnev on ka tõenäoliselt põhjuseks, miks *Ric8*^{-/-} rakud ei suuda korralikult ekstratsellulaarsele maatriksile kinnituda ja moodustavad mitmekihilisi kolooniaid.



Joonis 7. RIC8 oletatav roll tsaperoni ja nukleotiivahetusfaktorina Gα subühikutel, mis on olulised integriini ja RhoA signaalirajas. RIC8 seondub ribosoomidelt sünteesitud Gα subühikule ja aitab koos teiste tsaperon valkudega (näiteks CCT) Gα subühikut voltida ja kokku pakkida. Edasi transporditakse nukleotiivaba Gα seotult RIC8-ga raku plasmamembraanile, kus ta moodustab inaktiivse kompleksi Gβγ subühikutega. Sellist inaktiivset kompleksi on võimeline aktiveerima ligandi seondumine GPCR retseptorile, vahetades GDP GTP vastu. GDP-GTP vahetust võib teostada ka retseptorist sõltumatu nukleotiivahetusfaktor RIC8. GTPga aktiveeritud Gα subühikul on edasi kaks võimalust: 1) siniste nooltega rada – Gα-GTP aktiveerib RhoGEF valgu ja põhjustab sellega RhoA signaaliraja aktiveerumise, mis viib rakkude kontraktsiooni, stressifiibrите tekke ja aktiini polümerisatsioonini. See rada on aktiivne rakkude migratsiooni ajal. 2) punaste nooltega näidatud rada – Kui integriin seob ligandi, milleks on mõni ekstratsellulaarse maatriksi komponent, seondub Gα-GTP hoopis integriini β subühiku külge. Seejärel aktiveerub integriiniga seotud c-Src kinaas, mis omakorda aktiveerib RhoGAP valgu, põhjustades RhoA signaaliraja inhibeerimise. See rada on aktiivne rakkude kinnitumisel substraadile, võimaldades rakkudel substraadil laiali minna. (Modifitseeritud Gabay jt., 2011 ja Shen jt., 2012 järgi).

Kuna fokaalsete adhesioonide teke sõltub ümberkorraldustest aktiini tsütoskeletis, siis uuriti muutusi ka aktiini koguses. Eelnevalt on *Ric8*^{-/-} ES rakkudes näidatud β-aktiini vähenemist 40% võrra ja polümeriseerunud F-aktiini vähenemist 70% võrra, mis viitab sellele, et RIC8 mõjutab nii β-aktiini sünteesi kui ka selle polümeriseerumist (Gabay jt., 2011). Käesolevas

töös kasutatud *Ric8^{-/-}* ES rakkude puhul leiti, et β -aktiini hulk oli võrreldes kontrollrakkudega ligikaudu 20% võrra vähenenud, ehkki mitte statistiliselt olulisel määral ($P=0,055$). RIC8 rolli β -aktiini hulga reguleerimises pole täpsemalt uuritud ja seega on see hetkel ebaselge. Edaspidi võiks kontrollida, kas *Ric8^{-/-}* rakkudes on β -aktiin alla reguleeritud ka mRNA tasemel. Kui tulemus näitab, et mRNA tase on *Ric8^{-/-}* ja kontrollrakkudes sama, siis järelkult on probleem β -aktiini translatsioonil. Selles rajas on näidatud olulist rolli c-Src kinaasil (Hüttelmaier jt., 2005), mille aktivatsiooni võib seostada $G\alpha$ ja $G\beta\gamma$ valkudega (Ma jt., 2000; Gentili jt., 2006; Shen jt., 2012), mis on *Ric8^{-/-}* rakkudes alla reguleeritud (Hampoelz jt., 2005; Gabay jt., 2011). See võib olla üks võimalus, kuidas RIC8 mõjutab β -aktiini hulka, kuid seda tuleks kindlasti täpsemalt uurida. Kirjanduses näidatud F-aktiini osakaalu vähenemine *Ric8^{-/-}* rakkudes on seletatav RhoA signaaliraja kaudu. RhoA on väike G valk, mis on aktiivses olekus seotud GTPga. GDP vahetamist GTP vastu viivad läbi mitmed RhoGEFd. Eelnevalt on näidatud erinevate RhoGEFde aktiveerimist $G\alpha_{12/13}$ ja $G\alpha_{q/11}$ poolt (Vogt jt., 2003; Momotani ja Somlyo, 2012). *Ric8^{-/-}* rakkudes, kus $G\alpha$ subühikute hulk ja aktiveerimine on vähenenud, ei suudeta seega aktiveerida kõiki RhoGEFe ja väheneb RhoA-GTP hulk, mida on ka varasemalt näidatud (Gabay jt., 2011). RhoA-GTP vähenemine põhjustab aktiini kiiremat depolümeerisumist, sest ei inhibeerita depolümeerisumist faktorit kofiliini (Maekawa jt., 1999). Lisaks aktiveeritakse siis vähem profiiliini, mis on vajalik aktiini polümeerisumiseks (Watanabe jt., 1997). F-aktiini vähenemise tõttu on vähem ka aktiini filamentidest moodustunud struktuure: stressifibreid, membraanseid kurde ja filopoodid (Gabay jt., 2011; Wang jt., 2011). Need on olulised nii fokaalsete adhesioonide moodustamisel kui ka rakkude migratsiooni juhtimises.

Kirjanduse ja käesolevas töös leitud tulemuste põhjal võib järeldada, et RIC8 ei mõjuta ES rakkude diferentseerumist neuraalseteks eellasrakkudeks, kuid mõjutab rakkude adhesiooni ekstratsellulaarse matriksiga. Nimelt käitub RIC8 tsaperoni ja nukleotiidivahetusfaktorina $G\alpha$ valkude puhul, mis omakorda signaliseerivad nii integriinide kui ka RhoA signaalirajas. Integriini rada on vajalik rakkude kinnitumiseks ekstratsellulaarsele matriksile ja RhoA rada aktiini polümeerisumiseks ja erinevate aktiinist sõltuvate membraanstruktuuride tekkeks. Seetõttu võib väita, et *Ric8^{-/-}* rakkudel on probleeme ekstratsellulaarsele matriksile kinnitumisega ja migreerumisega. Tulevikus võikskeskenduda RIC8 puudusest tulenevate adhesiooniprobleemide täpsemale kirjeldamisele molekulaarsel tasemel.

KOKKUVÕTE

Heterotrimeersed G valgud on olulised mitmetes erinevates signaaliradades, osaledes näiteks fokaalseid adhesioone moodustavate integriinide rajas ja aktiini tsütoskeleti mõjutavas RhoA signaalirajas. Käesoleva töö eesmärgiks oli kirjeldada $G\alpha$ valkude juures tsiperoni ja nukleotiidivahetusfaktori rolli täitva RIC8 mõju ES rakkude diferentseerumisele neuraalses suunas ja rakk-maatriksi adhesioonile. Selleks kasutati töö eksperimentaalses osas hiire ES rakuliini, kus *Ric8* geeni neli esimest eksonit on Cre-rekombinaasi poolt välja lõigatud. ES rakkude diferentseerumise iseloomustamiseks kasutati qRT-PCRi, adhesiooni kirjeldamiseks vaadeldi diferentseeruvate rakkude morfoloogiat ning *Western blot*'iga tuvastati β -aktiini ja $G\alpha_i$ valgu kogused.

Töö kokkuvõtteks tehti järgmised järeldused:

- Eelnevalt tekitatud *Ric8*^{-/-} ES rakkudes on *Ric8* esimesed neli eksonit välja lõigatud ja mRNA-d ega valku ei sünteesita.
- RIC8 puudumine ei mõjuta ES rakkude võimet diferentseeruda neuraalseteks eellasrakkudeks.
- Neuraalses suunas diferentseeruvate *Ric8*^{-/-} rakkude kolooniad on võrreldes kontrollrakkude kolooniatega väiksemad ja mitmekihilised ning leidub rohkem mitteneuraalses suunas diferentseerunud rakke.
- *Ric8*^{-/-} rakkudes on vähenenud $G\alpha_{i1+2}$ valgu hulk ning tõenäoliselt ka β -aktiini hulk.

Characterization of mouse *Ric8*^{-/-} embryonic stem cells

Carolin Ruven

Summary

Heterotrimeric G proteins are important signalling molecules that have been discovered to play crucial role in mediating cellular processes in response to external signals. G protein signalling cascades regulate many processes that are important for the development of an organism. RIC8 has been proven to function as a chaperone and a nucleotide exchange factor for G α subunits. Identifying the roles of RIC8 is important because G α -mediated signalling is one of the key components of many different regulatory mechanisms in our bodies. Previously it has been described that *Ric8* mutant mice display many serious developmental defects and they die at early embryonic age. To find the exact reasons for these defects, the role of RIC8 in processes like cell proliferation, differentiation and migration should be identified.

The aim of the present study was to describe the role of RIC8 in neural differentiation, cell-matrix adhesion and actin cytoskeleton using the previously generated *Ric8*^{-/-} embryonic stem cells (ES cells).

Present study showed that the amount of G α_i in *Ric8*^{-/-} cells was downregulated confirming the role of RIC8 as a chaperone and nucleotide exchange factor for G α subunits. In differentiation experiment, RIC8 was shown not to affect the ability of ES cells to differentiate into neural progenitors. However, some morphological differences were seen between *Ric8*^{-/-} and control cells. *Ric8*^{-/-} cell colonies were remarkably smaller than control cell colonies and unable to grow as monolayers. It was inferred that this is due to the problems in cell-matrix adhesion caused by interruptions in integrin signalling pathway. Also, the probable reduction of β -actin proved the important role of RIC8 in the regulation of actin cytoskeleton. However, the exact molecular mechanisms by which RIC8 affects these processes still remain to be discovered.

TÄNUSÕNAD

Eelkõige tänan oma suurepärast juhendajat Katrin Ruisu't huvitava lõputöö teema, abivalmiduse, positiivsuse ja asjaliku juhendamise eest. Suured tänud oma teisele juhendajale Riho Meier'ile ning ka Tambet Tõnissoo'le väärt teadmiste ja nõuannete jagamise eest. Tänuõn nad Mario Plaas'ile, kelle tõttu sai võimalikuks rakkude kasvatamine antud töö eksperimentaalses osas. Lõpuks tänan kogu töökat laborikollektiivi lõbusa õhkkonna tekitamise eest laboris.

KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU

Artiklid:

Abranches, E., Silva, M., Pradier, L., Schulz, H., Hummel, O., Henrique, D. and Bekman, E. (2009). Neural differentiation of embryonic stem cells in vitro: a road map to neurogenesis in the embryo. PLoS One. 4(7): e6286.

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

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.

Amano, M., Ito, M., Kimura, K., Fukata, Y., Chihara, K., Nakano, T., Matsuura, Y. And Kaibuchi, K. (1996). Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). J. Biol. Chem. 271: 20246-20249.

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

Arthur, W. T. and Burridge, K. (2001). RhoA inactivation by p190RhoGAP regulates cell spreading and migration by promoting membrane protrusion and polarity. Mol. Biol. Cell. 12: 2711-2720.

Arthur, W.T., Petch, L. A. and Burridge, K. (2000). Integrin engagement suppresses RhoA activity via a c-Src-dependent mechanism. Curr. Biol. 10(12): 719-722.

Banno, A. and Ginsberg, M. H. (2008). Integrin activation. Biochem. Soc. Trans. 36(Pt 2): 229-234.

Burridge, K. and Chrzanowska-Wodnicka, M. (1996). Focal adhesions, contractility, and signaling. Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 12: 463-518.

Calderwood, D. A. (2004). Integrin activation. J. Cell. Sci. 117(Pt 5): 657-666.

Calderwood, D. A., Zent, R., Grant, R., Rees, D. J. G., Hynes, R. O. and Ginsberg, M. H. (1999). The talin head domain binds to integrin beta subunit cytoplasmic tails and regulates integrin activation. J. Biol. Chem. 274: 28071-28074.

- 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, L. and Daley, G. Q. (2008). Molecular basis of pluripotency. *Hum. Mol. Genet.* 17(R1): R23-R27.
- Chrzanowska-Wodnicka, M. and Burridge, K. (1996). Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J. Cell. Biol.* 133: 1403-1415.
- Couwenbergs, C., Spilker, A. C. and Gotta, M. (2004). Control of embryonic spindle positioning and Galpha activity by C. Elegans RIC-8. *Curr. Biol.* 14: 1871-1876.
- Crossin, K.L. and Krushel, L.A. (2000). Cellular signaling by neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Dev. Dyn.* 218: 260-279.
- David, N. B., Martin, C. A., Segalen, M., Rosenfeld, F., Schweisguth, F. and Bellaïche, Y. (2005). Drosophila Ric-8 regulates Galphai cortical localization to promote Galphai-dependent planar orientation of the mitotic spindle during asymmetric cell division. *Nat. Cell. Biol.* 7(11): 1083-1090.
- De Vries, L., Zheng, B., Fischer, T., Elenko, E. and Farquhar, M. G. (2000). The regulator of G protein signaling family. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40: 235-271.
- Erickson, A.C. and Couchman, J.R. (2000). Still more complexity in mammalian basement membranes. *J. Histochem. Cytochem.* 48: 1291-1306.
- Fenech, C., Patrikainen, L., Kerr, D. S., Grall, S., Liu, Z., Laugerette, F., Malnic, B. and Montmayeur, J. P. (2009). Ric-8A, a Galpha protein guanine nucleotide exchange factor potentiates taste receptor signaling. *Front. Cell. Neurosci.* 3: 11.
- Flevaris, P., Stojanovic, A., Gong, H., Chishti, A., Welch, E. and Du, X. (2007). A molecular switch that controls cell spreading and retraction. *J. Cell. Biol.* 179: 553-565.
- Frisch, S. M. and Francis, H. (1994). Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J. Cell. Biol.* 124(4): 619-626.
- Frisch, S. M. and Screaton, R. A. (2001). Anoikis mechanisms. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 13(5): 555-562.

- 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.
- Fujiwara, H., Hayashi, Y., Sanzen, N., Kobayashi, R., Weber, C.N., Emoto, T., Futaki, S., Niwa, H., Murray, P., Edgar, D. and Sekiguchi, K. (2007). Regulation of mesodermal differentiation of mouse embryonic stem cells by basement membranes. *J. Biol. Chem.* 282: 29701-29711.
- 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): ra79.
- Geiger, B., Bershadsky, A., Pankov, R. and Yamada, K. M. (2001). Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix-cytoskeleton crosstalk. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2: 793-805.
- Gentili, C., Boland, R. and Russo de Boland, A. (2006). Implication of Gbetagamma proteins and c-SRC tyrosine kinase in parathyroidhormone-induced signal transduction in rat enterocytes. *J. Endocrinol.* 188(1): 69-78.
- Gong, H., Shen, B., Flevaris, P., Chow, C., Lam, S. C., Voyno-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.
- Graus-Porta, D., Blaess, S., Senften, M., Littlewood-Evans, A., Damsky, C., Huang, Z., Orban, P., Klein, R., Schittny, J.C. and Müller, U. (2011). Beta1-class integrins regulate the development of laminae and folia in the cerebral and cerebellar cortex. *Neuron.* 31: 367-379.
- Hampoelz, B., Hoeller, O., Bowman, S. K., Dunican, D. and Knoblich, J. A. (2005). *Drosophila* Ric-8 is essential for plasma-membrane localization of heterotrimeric G proteins. *Nat. Cell. Biol.* 7(11): 1099-1105.
- Hart, M. J., Jiang, X., Kozasa, T., Roscoe, W., Singer, W. D., Gilman, A. G., Sternweis, P. C. and Bollag, G. (1998). Direct stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115 RhoGEF by Ga13. *Science.* 280: 2112-2114.

- Hato, T., Pampori, N. and Shattil, S. J. (1998). Complementary roles for receptor clustering and conformational change in the adhesive and signaling functions of integrin Alpha(Iib)Beta(3). *J. Cell. Biol.* 141: 1685-1695.
- Heo, J., Lee, J. S., Chu, I. S., Takahama, Y. and Thorgeirsson, S. S. (2005). Spontaneous differentiation of mouse embryonic stem cells in vitro: characterization by global gene expression profiles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 332(4): 1061-1069.
- Hogg, N. and Bates, P. A. (2000). Genetic analysis of integrin function in man: LAD.1 and other syndromes. *Matrix. Biol.* 19(3): 211-222.
- Huttenlocher, A., Sandborg, R. R. and Horwitz, A. F. (1995). Adhesion in cell migration. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 7(5): 697-706.
- Hüttelmaier, S., Zenklusen, D., Lederer, M., Dichtenberg, J., Lorenz, M., Meng, X., Bassell, G. J., Condeelis, J. and Singer, R. H. (2005). Spatial regulation of beta-actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1. *Nature.* 438(7067): 512-515.
- Jones, K. J., Morgan, G., Johnston, H., Tobias, V., Ouvrier, R. A., Wilkinson, I. and North, K. N. (2001). The expanding phenotype of laminin alpha2 chain (merosin) abnormalities: case series and review. *J. Med. Genet.* 38(10): 649-657.
- 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.
- Klattenhoff, C., Montecino, M., Soto, X., Guzmán, L., Romo, X., García, M. A., Mellstrom, B., Naranjo, J. R., Hinrichs, M. V. and Olate, J. (2003). Human brain synembryn interacts with Galpha and Gqalpha and is translocated to the plasma membrane in response to isoproterenol and carbachol. *J. Cell. Physiol.* 195: 151-157.
- Krueger, E.W., Orth, J.D., Cao, H. and McNiven, M.A. (2003). A dynamin-cortactin-Arp2/3 complex mediates actin reorganization in growth factor-stimulated cells. *Mol. Biol. Cell.* 14: 1085-1096.
- Lee, J., Ishihara, A. and Jacobson, K. (1993). Trends How do cells move along surfaces? *Cell. Biol.* 3(11): 366-370.
- Lo, S. H. (2006). Focal adhesions: what's new inside. *Dev. Biol.* 294(2): 280-291.

- Loh, Y. H., Wu, Q., Chew, J. L., Vega, V. B., Zhang, W., Chen, X., Bourque, G., George, J., Leong, B., Liu, J., Wong, K. Y., Sung, K. W., Lee, C. W., Zhao, X. D., Chiu, K. P., Lipovich, L., Kuznetsov, V. A., Robson, P., Stanton, L. W., Wei, C. L., Ruan, Y., Lim, B. and Ng, H. H. (2006). The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat. Genet.* 38(4): 431-440.
- Loring, J. F., Porter, J. G., Seilhammer, J., Kaser, M. R. and Wesselschmidt, R. (2001). A gene expression profile of embryonic stem cells and embryonic stem cell-derived neurons. *Restor. Neurol. Neurosci.* 18(2-3): 81-88.
- Lunyak, V. V. and Rosenfeld, M. G. (2008). Epigenetic regulation of stem cell fate. *Hum. Mol. Genet.* 17(R1): R28-R36.
- Luo, R., Jeong, S. J., Jin, Z., Strokes, N., Li, S. and Piao, X. (2011). G protein-coupled receptor 56 and collagen III, a receptor-ligand pair, regulates cortical development and lamination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108(31): 12925-12930.
- 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.
- Ma, Y. C., Huang, J., Ali, S., Lowry, W. and Huang, X. Y. (2000). Src tyrosine kinase is a novel direct effector of G proteins. *Cell.* 102(5): 635-646.
- Maekawa, M., Ishizaki, T., Boku, S., Watanabe, N., Fujita, A., Iwamatsu, A., Obinata, T., Ohashi, K., Mizuno, K. and Narumiya, S. (1999). Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science.* 285: 895-898.
- Mainiero, F., Murgia, C., Wary, K. K., Curatola, A. M., Pepe, A., Blumentberg, M., Westwick, J. K., Der, C. J. and Giancotti, F. G. (1997). The coupling of alpha6beta4 integrin to Ras-MAP kinase pathways mediated by Shc controls keratinocyte proliferation. *EMBO. J.* 16(9): 2365-2375.
- Meredith, J. E. Jr., Fazeli, B. and Schwartz, M. A. (1993). The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol. Biol. Cell.* 4(9): 953-961.
- Miller, K. G. and Rand, J.B. (2000). A role for RIC-8 (Synembryn) and GOA-1 (G(o)alpha) in regulating a subset of centrosome movements during early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* 156(4): 1649-1660.

- Miller, K. G., Alfonso, A., Nguyen, M., Crowell, J. A., Johnson, C. D. and Rand, J. B. (1996). A genetic selection for *Caenorhabditis elegans* synaptic transmission mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93(22): 12593-12598.
- Miller, K.G., Emerson, M.D., McManus, J. 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.
- Miranti, C. K. and Brugge, J. S. (2002). Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction. *Nat. Cell. Biol.* 4(4): E83 - E90.
- Miyamoto, S., Akiyama, S. K. and Yamada, K. M. (1995). Synergistic roles for receptor occupancy and aggregation in integrin transmembrane function. *Science.* 267: 883-885.
- Miyamoto,S., Teramoto,H., Gutkind, J. S. and Yamada, K. M. (1996). Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosine kinases and MAP kinase activation: roles of integrin aggregation and occupancy of receptors. *J. Cell. Biol.* 135: 1633-1642.
- Miyata, T., Kawaguchi, A., Okano, H. and Ogawa, M. (2001). Asymmetric inheritance of radial glial fibers by cortical neurons. *Neuron.* 31: 727-741.
- Miyata, T., Kawaguchi, A., Saito, K., Kawano, M., Muto, T. and Ogawa, M. (2004). Asymmetric production of surface-dividing and non-surface-dividing cortical progenitor cells. *Development.* 131: 3133-3145.
- Momotani, K. and Somlyo, A. V. (2012). p63RhoGEF: a new switch for G(q)-mediated activation of smooth muscle. *Trends. Cardiovasc. Med.* 22(5): 122-127.
- Muggerud, A. A., Edgren, H., Wolf, M., Kleivi, K., Dejeux, E., Tost, J., Sørli, T. and Kallioniemi, O. (2009). Data integration from two microarray platforms identifies bi-allelic genetic inactivation of RIC8A in a breast cancer cell line. *BMC. Med. Genomics.* 2: 26.
- Nakaya, Y. and Sheng, G. (2008). Epithelial to mesenchymal transition during gastrulation: an embryological view. *Dev. Growth. Differ.* 50(9): 755-766.
- Needham, L. K. and Rozengurt, E. (1998). G-alpha-12 and G-alpha-13 stimulate Rho-dependent tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase, paxillin, and p130 Crk-associated substrate. *J. Biol. Chem.* 273: 14626-14632.

- Neves, S. R., Ram, P. T. and Iyengar, R. (2002). G protein pathways. *Science*. 296: 1636-1639.
- Nieswandt, B., Schulte, V., Zywiets, A., Gratacap, M. P. and Offermanns, S. (2002). Costimulation of Gi- and G12/G13-mediated signaling pathways induces integrin alphaIIb beta 3 activation in platelets. *J. Biol. Chem.* 277(42): 39493-39498.
- Nishimura, A., Okamoto, M., Sugawara, Y., Mizuno, N., Yamauchi, J. and Itoh, H. (2006). Ric-8A potentiates Gq-mediated signal transduction by acting downstream of G protein-coupled receptor in intact cells. *Genes. Cells.* 11(5): 487-498.
- Nurrish, S., Segalat, L. and Kaplan, J. M. (1999). Serotonin inhibition of synaptic transmission: Galpha(0) decreases the abundance of UNC-13 at release sites. *Neuron*. 24: 231-242.
- Otey, C.A. and Carpen, O. (2004). Alpha-actinin revisited: a fresh look at an old player. *Cell. Motil. Cytoskeleton.* 58: 104-111.
- Pelton, T. A., Sharma, S., Schulz, T. C., Rathjen, J. and Rathjen, P. D. (2002). Transient pluripotent cell populations during primitive ectoderm formation: correlation of in vivo and in vitro pluripotent cell development. *J. Cell. Sci.* 115(Pt 2): 329-339.
- Qian, X., Shen, Q., Goderie, S. K., He, W., Capela, A., Davis, A. A. and Temple, S. (2000). Timing of CNS cell generation: a programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells. *Neuron*. 28: 69-80.
- Qu, Q. and Smith, F.I. (2005). Neuronal migration defects in cerebellum of the *Largemyd* mouse are associated with disruptions in Bergmann glia organization and delayed migration of granule neurons. *Cerebellum*. 4: 261-270.
- Rougon, G. and Hobert, O. (2003). New insights into the diversity and function of neuronal immunoglobulin superfamily molecules. *Annu. Rev. Neurosci.* 26: 207-238.
- Ruoslahti, E. and Pierschbacher, M. D. (1987). New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science*. 238(4826): 491-497.
- Satz, J.S., Barresi, R., Durbejj, M., Willer, T., Turner, A., Moore, S.A. and Campbell, K.P. (2008). Brain and eye malformations resembling Walker-Warburg syndrome are recapitulated in mice by dystroglycan deletion in the epiblast. *J. Neurosci.* 28: 10567-10575.

- Schwartz, M. A. and Assoian, R. K. (2001). Integrins and cell proliferation: regulation of cyclin-dependent kinases via cytoplasmic signaling pathways. *J. Cell. Sci.* 114(Pt 14): 2553-2560.
- Sethi, T., Rintoul, R. C., Moore, S. M., MacKinnon, A. C., Salter, D., Choo, C., Chilvers, E. R., Dransfield, I., Donnelly, S. C., Strieter, R. and Haslett, C. (1999). Extracellular matrix proteins protect small cell lung cancer cells against apoptosis: a mechanism for small cell lung cancer growth and drug resistance in vivo. *Nat. Med.* 5(6): 662-668.
- 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.
- Sillitoe, R.V. and Joyner, A.L. (2007). Morphology, molecular codes, and circuitry produce the three-dimensional complexity of the cerebellum. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 23: 549-577.
- Simon, M. I., Strathmann, M. P. and Gautam, N. (1991). Diversity of G proteins in signal transduction. *Science.* 252: 802-808.
- Stavridis, M. P., Collins, B. J. and Storey, K. G. (2010). Retinoic acid orchestrates fibroblast growth factor signalling to drive embryonic stem cell differentiation. *Development.* 137: 881-890.
- Stein, G. S., Stein, J. L., Van Wijnen, A. J., Lian, J. B., Montecino, M., Croce, C. M., Choi, J. Y., Ali, S. A., Pande, S., Hassan, M. Q., Zaidi, S. K. and Young, D. W. (2010). Transcription factor-mediated epigenetic regulation of cell growth and phenotype for biological control and cancer. *Adv. Enzyme. Regul.* 50(1): 160-167.
- Stossel, T. P. (1993). On the crawling of animal cells. *Science.* 260(5111): 1086-1094.
- Sweeton, D., Parks, S., Costa, M. and Wieschaus, E. (1991). Gastrulation in *Drosophila*: the formation of the ventral furrow and posterior midgut invaginations. *Development.* 112(3): 775-789.
- Zhang, Z., Vuori, K., Reed, J. C. and Ruoslahti, E. (1995). The alpha 5 beta 1 integrin supports survival of cells on fibronectin and up-regulates Bcl-2 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92(13): 6161-6165.

- Zhou, Q., Chipperfield, H., Melton, D. A. and Wong, W. H. (2007). A gene regulatory network in mouse embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104(42): 16438-16443.
- Tall, G. G. and Gilman, A. G. (2004). Purification and functional analysis of Ric-8A: a guanine nucleotide exchange factor for G-protein alpha subunits. *Methods. Enzymol.* 390: 377-388.
- Tall, G. G. 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 Ric8A (synembryn) is a heterotrimeric G α protein guanine nucleotide exchange factor. *J. Biol. Chem.* 278: 8356-8362.
- Temple, S. (2001). The development of neural stem cells. *Nature.* 414(6859): 112-117.
- Timpl, R. (1996). Macromolecular organization of basement membranes. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 8: 618-624.
- Tõnissoo, T., Kõks, S., Meier, R., Raud, S., Plaas, M., Vasar, E. and Karis, A. (2006). Heterozygous mice with *Ric8* mutation exhibit impaired spatial memory and decreased anxiety. *Behav. Brain. Res.* 167: 42-48.
- 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: 3404-3415.
- Tõnissoo, T., Meier, R., Talts, K., Plaas, M. and Karis, A. (2003). Expression of Ric8 (synembryn) gene in the nervous system of developing and adult mouse. *Gene. Expr. Patterns.* 3: 591-594.
- van den Berg, D. L., Zhang, W., Yates, A., Engelen, E., Takacs, K., Bezstarosti, K., Demmers, J., Chambers, I. and Poot, R. A. (2008). Estrogen-related receptor beta interacts with Oct4 to positively regulate Nanog gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 28(19): 5986-5995.
- Wang, D., Tan, Y. C., Kreitzer, G. E., Nakai, Y., Shan, D., Zheng, Y. and Huang, X. Y. (2006). G proteins G12 and G13 control the dynamic turnover of growth factor-induced dorsal ruffles. *J. Biol. Chem.* 281: 32660-32667.

- 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-B., Guo, L. and Huang, X-Y. (2011). Resistance to inhibitors of cholinesterase-8A (RIC8) is critical for growth factor receptor-induced actin cytoskeletal reorganization. *J. Biol. Chem.* 286(35): 31055-31061.
- Watanabe, N., Madaule, P., Reid, T., Ishizaki, T., Watanabe, G., Kakizuka, A., Saito, Y., Nakao, K., Jockusch, B.M. and Narumiya, S. (1997). p140mDia, a mammalian homolog of *Drosophila* diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *EMBO. J.* 16: 3044-3056.
- Vellano, C. P., Shu, F. J., Ramineni, S., Yates, C. K., Tall, G. G. and Hepler, J. R. (2011). Activation of the regulator of G protein signaling 14-Galphai1-GDP signaling complex is regulated by resistance to inhibitors of cholinesterase-8A. *Biochemistry.* 50: 752-762.
- Wilkie, T. M. and Kinch, L. (2005). New roles for Galpha and RGS proteins: Communication continues despite pulling sisters apart. *Curr. Biol.* 15(20): R843-R854.
- Vogt, S., Grosse, R., Schultz, G. and Offermanns, S. (2003). Receptor-dependent RhoA Activation in G12/G13-deficient Cells. *J. Biol. Chem.* 278(31): 28743-28749.
- Woodard, G. E., Huang, N. N., Cho, H., Miki, T., Tall, G. G. and Kehrl, J. H. (2010). Ric-8A and Gi alpha recruit LGN, NuMA, and dynein to the cell cortex to help orient the mitotic spindle. *Mol. Cell. Biol.* 30: 3519-3530.
- Wu, C. (2007) Focal adhesion: a focal point in current cell biology and molecular medicine. *Cell. Adh. Migr.* 1(1): 13-18.
- Ying, Q., Stavridis, M., Griffiths, D., Li, M. and Smith, A. (2003). Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. *Nat. Biotechnol.* 21: 183-186.
- Youn, Y. H., Pramparo, T., Hirotsune, S. and Wynshaw-Boris, A. (2009). Distinct dose-dependent cortical neuronal migration and neurite extension defects in *Lis1* and *Ndel1* mutant mice. *J. Neurosci.* 29(49): 15520-15530.

Raamatud:

Bastiani, C. and Mendel, J. 2006. Heterotrimeric G proteins in *C. elegans*. p. 1-25. *In* WormBook, ed., The *C. elegans* Research Community, WormBook

Cooper, G. M., Hausman, R. E. 2009. The cell: a molecular approach, p. 484, 501, 586, 614. 5th ed., ASM Press, Washington, D. C.

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

Louis, S. A. and Reynolds, B. A. 2010. Neurosphere and Neural Colony-Forming Cell Assays, p. 1-28. *In* L.C. Doering (ed.), Protocols for Neural Cell Culture, Springer Protocols Handbooks, 4th ed. Humana Press

Sanes, D. H., Reh, T. A. and Harris, W. A. 2000. Development of the nervous system, p. 248. Academic Press, California, USA

Veebileheküljed:

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

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Carolin Ruven (sünnikuupäev: 26.oktoober 1991)

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

Hiire *Ric8^{-/-}* embrüonaalsete tüvirakkude iseloomustamine,

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, 27.05.2013