

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

Piia Hurt

***Nestin-cre;Ric8a* konditsionaalse mutantse hiire (*Mus musculus*) kaasasündinud südame  
arengudefektid**

Bakalaureusetöö

Juhendaja: Raivo Raid

TARTU 2015

# Sisukord

Sisukord.....	2
Kasutatud lühendid.....	4
SISSEJUHATUS.....	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....	7
1.1. Kardiogenees ja kaasasündinud südamedefektid.....	7
1.1.1. Südame neuraalhari ja derivaadid .....	8
1.1.2. Nestin arenevas embrüos .....	8
1.1.3. Epikardi päritolu ja areng .....	9
1.1.4. ECM roll südame arengus.....	10
1.2. Guaniini nukleotiidivahetusfaktor RIC8 .....	11
1.2.1. G valgud ja RIC8 üldine iseloomustus .....	11
1.2.2. RIC8A funktsioonid .....	13
1.2.3. RIC8 funktsioonid adhesioonis ja migratsioonis .....	14
2. EKSPERIMENTAALNE TÖÖ.....	16
2.1. Töö eesmärgid.....	16
2.2. Materjal ja meetodika.....	16
2.2.1. Töös kasutatud hiireliinid .....	16
2.2.2. Embrüote dissekteerimine .....	17
2.2.3. Embrüote genotüpiseerimine .....	17
2.2.4. Parafiinlõikude valmistamine .....	18
2.2.5. LacZ värvimine.....	18
2.2.6. Histoloogiliste preparaate valmistamine .....	18
2.2.7. Immunohistokeemiline analüüs parafiinlõikudele.....	19
2.2.8. Embrüote vaatlemine ja pildistamine .....	19
2.3. Tulemused.....	20
2.3.1. Kardiovaskulaarsed väärarengud <i>Nes;Ric8a<sup>CKO</sup></i> hiirtes.....	20
2.3.2. RIC8A ja Nestini ekspressiooni analüüs <i>Nes;Ric8a<sup>CKO</sup></i> hiire embrüotes.....	23
2.3.3. Laminiini lokalisatsiooni analüüs <i>Nes;Ric8a<sup>CKO</sup></i> hiirtes.....	24
2.4. Arutelu.....	26
Kokkuvõte .....	28
Summary .....	29

Tänu avaldused.....	30
Taotlus lõputöö avaldamisele piirangute kehtestamiseks .....	31
Kasutatud kirjandus.....	32
Kasutatud veebiaadressid .....	37

## Kasutatud lühendid

ASD – kodade vaheseina defekt, *atrial septal defect*

AV – atrioventrikulaar

BAV – bikuspidaalne aordi klapp

CHD – kaasasündinud südame defekt, *congenital heart defect*

CKO – konditsionaalne *knock-out*

CNC – kardiaalne neuraalhari, *cardiac neural crest*

DORV – topelt väljavool paremast vatsakesest, *double outlet right ventricle*

E7.5 – embrüonaalne vanus 7.5 päeva

ECM – ekstratsellulaarne maatriks

EMT – epiteel-mesenhüümtransformatsiooni

FHF – primaarne südamevälja, *first heart field*

GDP – guanosiindifosfaat

GEF – guaniini nukleotiidvahetusfaktor, *guanine nucleotide exchange factor*

GPCR – G valkudega seotud retseptor, *G protein-coupled receptor*

GTP – guanosiintrifosfaat

IAA – katkestatud aordikaar, *interrupted aortic arch*

IF – intermediaarsed filamendid

KO – *knock-out*

LM – pesakonnakaaslane, *littermate*

NC – neuraalhari, *neural crest*

NSC – neuraalsed eelasrakud, *neural stem cells*

OFT – väljavoolu kulgla, *outflow tract*

PTA – püsiv *truncus arteriosus*

RIC8 – *Resistance to Inhibitors of Cholinesterase 8*

*Ric8a* on geeni tähistus ja RIC8A on valgu tähistus

SHF – sekundaarne südameväli, *secondary heart field*

TGA – pärgarterite transpositsioon, *transposition of the great arteries*

TOF – Fallot'i tetraloogia, *tetralogy of Fallot*

VSD – vatsakeste vahelise seinä defekt, *ventricular septal defect*

## SISSEJUHATUS

*Ric8a* tuntakse kui G valkudega seotud guaniini nukleotiidivahetusfaktorit, mis on laialt levinud loomariigis (ümaruss, äädikakärbes, kannuskonn, imetajad) reguleerides erinevaid füsioloogilisi ja arengulisi protsesse rakkudes. Arengubioloogia õppetoolis on loodud ja kasutatud mitmeid transgeenseid hiireliine selle rolli uurimiseks erinevate organite arengus ja talitluses. Kuna homosügootsed *Ric8a knock-out* hiired surevad varajases embrüogeneesis vanuses E6-E8 tõsiste gastrulatsiooni defektide tõttu, siis *Ric8a* rolli uurimiseks vanemates organismides tuleb kasutada konditsionaalseid *knock-out* mutante, kus *Ric8a* on välja lülitatud koetspetsiifiliselt. *Nes;Ric8a<sup>CKO</sup>* on konditsionaalne mutant, kelles *Ric8a* on välja lülitatud kõigis *Nestin-Cre*'d ekspresseerivates rakkudes. Neid hiiri on seni edukalt kasutatud *Ric8a* välja lülitamiseks neuraalsetest eellasrakkudest ja neokorteksi embrüonaalse arengu uurimiseks. Mutantsed hiired küll sünnivad, aga surevad esimesel neonataalses elupäeval. Sarnase embrüonaalse ja neonataalse surevuse põhjuseks on sageli kardiovaskulaarse süsteemi arengu- ja talitlushäired.

Inimesel on kaasasündinud südamedefektid suhteliselt sagedased, esinedes 0.4%-5% elussündinutest ja umbes 30% katkenud rasedustest on põhjustatud nende poolt. Defektid võivad esineda enamustes südamestruktuurides ja umbes ainult 20% neist on teada geneetiline põhjus. Seega on meie arusaamine südamedefektide olemusest veel „lapsekingades“ ja nende uurimine vaieldamatult prioriteetne.

Käesoleva bakalaaurusetöö eksperimentaalosa peamiseks ülesandeks oli kontrollida kas ja milliseid südame arengudefekte esinevad *Nes;Ric8a<sup>CKO</sup>* mutantsetel vastsündinud hiirtel.

Töö kirjanduse ülevaade jaguneb kaheks. Esimese osas antakse ülevaade südame embrüonaalsest arengust ja kaasasündinud südamedefektidest. Kuna andmed *Ric8a* rolli kohta südame arengus puuduvad, siis antakse teises osas ülevaade *Ric8a* ja temaga seotud valkude üldisest rollidest teistes süsteemides.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1. Kardiogenees ja kaasasündinud südamedefektid

Süda on üks esimestest organitest, mis hakkab funktsioneerima arenevas embrüos. Südame mesodermi eellasrakud liiguvad gastrulatsiooni käigus läbi ürgjuti ja moodustavad hiire embrüonaalses vanuses 7.5 (E7.5) südamevälja (Tam *et al.*, 1997). Hiire E8 staadiumis eristuvad sellest primaarne (FHF) ja sekundaarne südameväli (SHF). FHF'st moodustub lineaarne südameatoru, mis alustab koheselt kokkutõmbeid. FHF rakud panustavad definitiivses südames vasaku vatsakese arengusse (Zaffran *et al.*, 2004). Peale südameatoru formeerumist staadiumis E8 toimub selle lingustumine ja kiire kasv, mis toimub tänu kahele protsessile: rakkude proliferatsioonile ja uute rakkude lisandumisele nii anteriooselt kui ka posteriooselt. Sekundaarsest südameväljast liituvad rakud müokardi arteriaalsele ja venoossele poolele ning panustavad tulevase väljavoolu kulgla (OFT), parema vatsakese ja kodade kujunemisse (Waldo *et al.*, 2001; Kelly, 2012). Välja arenenud vaheseintega neljakambriline embrüonaalne süda areneb kardiomüotsüütide, epikardi, endokardi ja kardiaalse neuraalharja (CNC) rakkude interaktsioonide tulemusel. E10 staadiumis toimub kambrite areng, trabeekulite ja padjandite moodustumine, samuti väljavoolukulgla vaheseina arenemine. E14.5 staadiumiks on südames välja arenenud kambrite vaheseinad ja ühendus kopsutüve ja aordiga (Brade *et al.*, 2013).

Kaasasündinud südamedefektiga (CHD) on 0.4%-5% vastsündinutest ja umbes 30% katkenud rasedustest on põhjustatud südamedefektide poolt (Hoffman ja Kaplan, 2002; Bruneau, 2008). CHD nimetatakse tavaliselt südame struktuuri või funktsiooni ebanormaalseid iseärasusi, mis saavad alguse embrüonaalse arengu käigus. CHD mõjutavad enamusi südame struktuure ja neid võib klassifitseerida kolme kategooriasse: tsüanootilisust põhjustavad südame defektid, suure vereringe häired ja vaheseinte defektid (Bruneau *et al.*, 2008). Vastsündinud, kellel esineb tsüanootiline defekt, on sinaka nahatooniga, mis on põhjustatud vere üldisest hapnikuvaesusest. Selle põhjusteks võivad olla suurte arterite transpositsioonid (TGA), Fallot'i tetraloogia (TOF), topelt väljavool paremast vatsakesest (DORV), püsiv *truncus arteriosus* (PTA), klappide defektid või kopsu arterite anomaaliad (Bruneau *et al.*, 2008). Suure vereringe häired võivad olla põhjustatud hüpoplastilise vasaku vatsakese sündroomist (HLHS), mitraalklapi või aordi kitsenemisest või katkestatud aordikaarest (IAA). Vaheseinte defektid võivad tekkida kodade vahel (ASD), vatsakeste vahel (VSD) või atrioventrikulaarseinas (AVSD). Neile kategooriatele lisandub veel kahehõlmne e

bikuspidaalne aordiklapp (BAV), mis on vaheseina defektide järel sageduselt teisel kohal (Bruneau *et al.*, 2008, Brade *et al.*, 2013).

Nende defektide põhjuseks võivad olla südame eellasrakkude signalisatsiooni-, migratsiooni-, proliferatsiooni- ja spetsifikatsioonihäired. Mutatsioonid *GATA4* geenis põhjustavad ASD ja VSD, mis arvatakse pärinevat kardiogeense mesodermi eellasrakkudest (Garg *et al.*, 2003). *Tbx1* geeni defekt viib kardiaalse neuraalharja (CNC) derivaatide arengu häireteni (Merscher *et al.*, 2001), epikardi defektid aga võivad põhjustada vasaku vatsakese hüpoplaasiat (Gittenberger-de Groot *et al.*, 2012; Brade *et al.*, 2013).

#### 1.1.1. Südame neuraalhari ja derivaadid

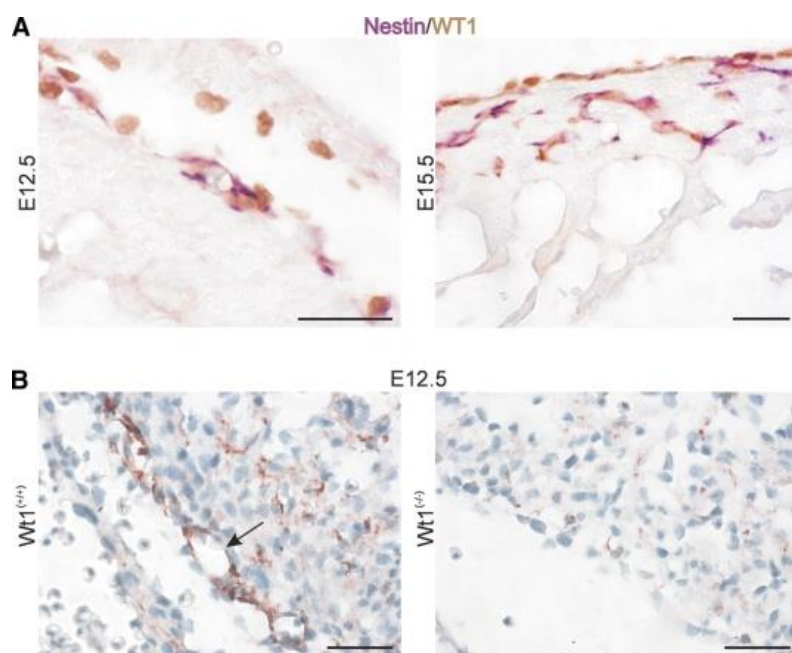
Neuraalhari (NC) on multipotentsete rakkude populatsioon, mis pärineb neuraaltorst ja mille rakud migreeruvad üle kogu keha. NC rakud võivad diferentseeruda paljudeks erinevateks rakutüüpideks: neuronid, gliia- ja pigmendirakud - samuti näo luudeks ja kõhreteks. Neuraalhari jagatakse muuhulgas kraniaalseks ja trunkaalseks regiooniks. Seda osa kraniaalneuraalharjast, mis on oluline südame korrektseks arenguks, nimetatakse kardiaalneuraalharja rakkudeks (Kirby, 2007). CNC rakud on vajalikud OFT arenguks, aordikaarte korrektseks moodustumiseks, ning müokardi õigeks funktsioneerimiseks. Samuti diferentseeruvad osad CNC rakud pärgarterite silelihasrakkudeks ja neist moodustub aordikopsutüve vahesein, samuti panustavad need CNC rakud südameklappide arengusse ja varustavad südant parasümpaatiliste närvikiududega. CNC eemaldamine põhjustab aordikaarte anomaaliaid, püsivat *truncus arteriosus* ja pärgarterite arengudefekte. Arvatakse, et südame arengus on olulisel kohal CNC rakkude poolt saadetatavad signaalid, mis panustavad arengusse rohkem kui hetkel teatakse (Brade *et al.*, 2013; Arima *et al.*, 2012).

#### 1.1.2. Nestin arenevas embrüos

Eukarüootide tsütoskelett koosneb kolmest filamentsest struktuurist: aktiini mikrofilamendid, mikrotuubilid ja intermediaarsed filamendid (IF). Nestin on valk, mis kuulub intermediaarsete filamentide perekonda ning mida on leitud ainult selgroogsetes (Park *et al.*, 2010). Nestinit kasutatakse neuraalsete eellasrakkude (NSC) markerina nii embrüogeneesis kui ka täiskasvanud ajus (Park *et al.*, 2010). Nestin ei suuda polümeriseeruda oma lühikese N-terminaalse osa tõttu ja seepärast kopolümeriseerub koos tüüp III ja IV IF valkudega, et osaleda erinevates rakulistes protsessides, näiteks rakkude jagunemises koos Vimetiiniga (Chou *et al.*, 2003). Südame ja aju arengus osaleb Nestin rakkude proliferatsiooni

protsessides. Nestini üleekspressiooniga korral muutuvad areneva aju- ja südame rakud mõõtnetelt suuremaks võrreldes kontroll-rakkudega (Liu *et al.*, 2015).

Nestinit peetakse tüvi- ja algrakkude markeriks paljudes organites. Nestini ekspresiooni on leitud neuraalsetes eellasrakkudes, arenevates skeleti- ja südamelihastes, vaskulaarses endoteelis, nahas ja arenevates neerudes. Täiskasvanud organismis on Nestinit ekspresseerivaid rakke leitud uuenevates/taastuvates kudedes, ajus ja arenevates vähirakkudes (Wagner *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2010). On näitatud, et staadiumis E12.5 ja E15.5 ekspresseeritakse Nestinit hiirte südames epikardis, arenevates veresoontes ja müotsüütides (Joonis 1) (Wagner *et al.*, 2006).



Joonis 1. Nestin ekspresioon E12.5 ja E15.5 hiire südames, lilla värvusega on Nestin (A) pruuniga Wt1 (A) ja Nestin (B). A) E12.5 ekspresseerub Nestin subepikardiaalkihis, E15.5 epikardis B) E12.5 arenevates pärgarterites (Wagner *et al.*, 2006).

### 1.1.3. Epikardi päritolu ja areng

Epikard koosneb ühekihlisest epiteelist, mida nimetatakse mesoteeliks, mis asetseb basaalmembraanil ja subepikardiaalkihist, milles asetsevad sidekoerakud, vere- ja lümfisooned ning närvi- ja rasvarakud (Krstic, 1997). Toruja südame staadiumis koosneb süda kahest rakukihist – müokardist ja endokardist – mis on eraldatud üksteisest mitterakulise kihiga ehk kardiaaltarrendiga. Kolmas kiht ehk epikard areneb hiljem ekstrakardiaalsest rakupopulatsioonist.

Epikard pärineb kahest erinevast rakupopulatsioonist. Esmalt proepikardiaalorganist, mis areneb vistseraalsest mesenhüümist väljakasvudena *septum transversum* pinnalt. Staadiumis E9-E11 liiguvad vesikulaarsed ja mitmerakulised agregaadid läbi kehaõõne südameni ning kinnituvad müokardi pinnale, moodustades E10.5 üherakulise kihikojale, vatsakestele ja atrioventrikulaarkanalile. Väljavoolu epikard on pärit väljavoolukulga lähedusest ja katab arteriaalpoolust. Osa epikardi rakkudest läbivad epiteliaal-mesenhümaal-transitsiooni (EMT), mis sisenevad müokardi ja moodustavad kapillaaride endoteeli, müokardi fibroblastid, atrioventrikulaarpadjandite mesenhüümi ja pärgarterite silelihasrakud. Samuti vastutab epikard müokardi normaalse arengu eest. Normaalse epikardi puudusel on müokard õhuke ja vatsakeste vaheline sein ei arene korralikult (Kirby, 2007).

Südame arengus on oluline funktsionaalse südameveresoonkonna moodustumine. See sõltub epikardi rakkudest, mis läbivad EMT ning millele järgneb vaskulogenees subepikardiaalkihis, kapillaarse pleksuse moodustumine ja veresoonte silelihasrakkude diferentseerumine. Subepikardiaalse südameveresoonkonna pleksuse moodustumine toimub E11.5-E13.5, mil see haruneb piki müokardi kasvades kokku aordiga E13.5's (Kirby, 2007; Wu *et al.*, 2013).

#### 1.1.4. ECM roll südame arengus

Südame ekstratsellulaarne maatriks (ECM) on kompleksne valguline kiudsüsteem, mille vahel asuvad müotsüüdid, fibroblastid, leukotsüüdid ja veresoonte rakud. Lisaks struktuursele rollile sisaldab ECM ka mitmeid kasvufaktoreid ja rakupinna retseptoreid siduvaid omadusi (Rienks *et al.*, 2014). Südame ECM koosneb kiulisest kollageenist, basaalmembraani komponentidest ja proteoglükaanidest, mis on olulised südame korrektseks moodustumiseks ja funktsioneerimiseks. Kollageenid tüüp I ja III vastutavad kardiomüotsüütide struktuurse terviklikuse ja vatsakeste lihaste funktsioneerimise eest. Kollageenide korrektne omavaheline suhe aga müokardi jäikuse eest, samuti ka kapillaarse stabiilsuse eest. Basaalmembraani komponendid on laminiin, fibronektiin, entaktiin, kollageen tüüp IV ja fibrilliin. Fibronektiin ja laminiin on olulised rakkude adhesiooni ja rakk-rakk interaktsioonide jaoks. Proteoglükaanide hulka kuuluvad kondroitiinsulfaat, dermataanisulfaat, heparaanisulfaat ja sündekaanid. Veresoontes on põhilisteks ECM komponentideks kollageen ja elastiin, mis veresoonkonna haiguste puhul on häirunud olekus (Kassiri ja Khokha, 2005).

ECM leidub AV ja OFT padjandites, epikardi mesenhüümis ja müokardis, kus ECM ümbritseb kardiomüotsüüte ja teisi müokardi struktuure. ECM ümbritseb ka OFT'ile migreeruvaid CNC rakke ja kardiaalarendis arenevaid trabeekuleid. ECM on olulisel kohal EMT's, rakk-rakk ning rakk-maatriks adhesioonil ja signaliseerumisel. Need on olulised

organite moodustumises, ning kudede terviklikkuse ja funktsiooni säilitamises. Teatud ECM komponentide puudumine viib südame arengudefektideni (Lockhart *et al.*, 2011).

Basaalmembraan on õhuke ja tihe ekstratsellulaarse maatriksi kiht, mille põhilisteks komponentideks on laminiin ja kollageen tüüp IV (Timpl, 1996). Basaalmembraan reguleerib erinevaid bioloogilisi protsesse nagu rakkude areng, jagunemine, diferentseerumine, kasv, migratsioon, polaarsus ja adhesioon (Erickson ja Couchman, 2000).

Laminiinid on üheks kõige tähtsamaks BM komponendiks. Laminiinid asetsevad ECM kihina, mis ümbritseb epiteeli, endoteeli, lihaseid, rasvarakke, Schwanni- ja perifeerse närvisüsteemi rakke, samuti kogu kesknärvisüsteemi (KNS) (Timpl, 1996). Kõik laminiinid on heterotrimeerid, mis koosnevad  $\alpha$ ,  $\beta$ , ja  $\gamma$  subühikutest. Nad moduleerivad rakkude adhesiooni seondudes erinevate rakkude retseptoritega (näiteks integriinidega), moodustades transmembraanseid ühendusi intratsellulaarse tsütoskeletiga. Laminiinid osalevad veel migratsiooni protsessides, rakkude kasvamisel ja diferentseerumisel. Praeguseks on kirjeldatud 16 erinevat laminiini isovormi, millest laminiin-1 on oluline gastrulatsioonis ja varajastes embrüo arenguetappides, laminiin-10 neurulatsioonis ning organogeneesis, teised laminiinid on aga olulised erinevates postnataalsetes organite küpsemistes ja kudede organiseerumises. Südames leidub laminiini kapillaaride endoteelirakkude, arterite silelihasrakkude ja kardiomyotsüütide basaalmembraanis, ka endo- ning epikardis ja fibroblastide basaalmembraanis.  $\alpha$  subühikutest leidub  $\alpha 1$  epiteeli-, endoteeli- ja silelihasrakkude basaalmembraanis,  $\alpha 2$  aga skeleti- ja südamelihase rakkudes ning perifeersetes närvides.  $\alpha 2$  vähesus põhjustab lihasdüstroofiat ja laienenud kardiomyopaatiat (Oliviero *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 1999; Miner, 2008; Hohenester ja Yurchenco, 2013).

## 1.2. Guaniini nukleotiidivahetusfaktor RIC8

### 1.2.1. G valgud ja RIC8 üldine iseloomustus

Heterotrimeersed G valgud on laialtlevinud ja olulised membraanseoselised signaalmolekulid, mis on keskselt mediaatoriteks mitmetele signaaliradadele ja rakkude funktsioonidele. G valgud võtavad vastu signaale G valkudega seotud retseptoritega (GPCR), millega seonduvad ekstratsellulaarsed ligandid, nagu hormoonid, neurotransmitterid ja kemokiinid (Neves *et al.*, 2002). G valgud osalevad olulistest signaali ülekande radades, mis reguleerivad metaboolsete ensüümide, ionkanalite ja teiste rakuliste komponentide funktsioneerimist, mõjutades protsesse nagu transkriptsioon, rakkude liikuvus ning sekretsioon. Seetõttu on G valgud

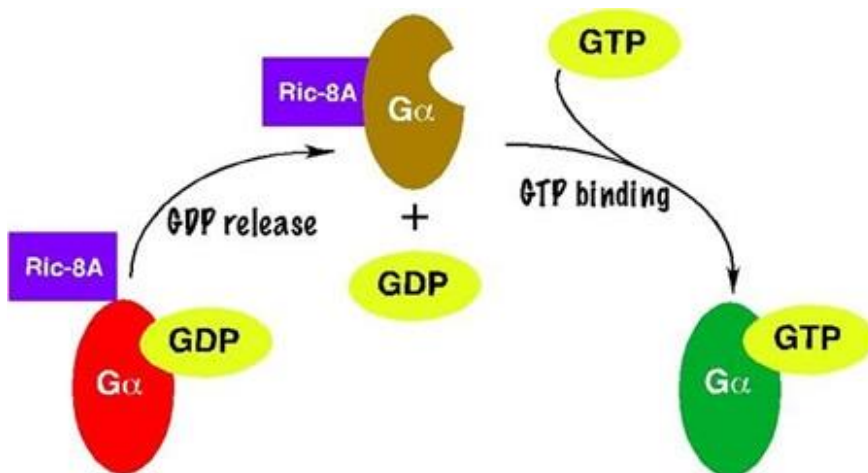
olulised embrüonaalses arengus, õppimise ja mälu väljakujunemises ning organismi homeostaasis (Neves *et al.*, 2002).

Heterotrimeersed G valgud koosnevad kolmest subühikust  $\alpha$ ,  $\beta$  ja  $\gamma$ .  $G\alpha$  subühikuid jagatakse geeni aminohappelise järjestuse, struktuuri ja efektormolekulide alusel neljaks perekonnaks:  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_i$ ,  $G\alpha_q$  ja  $G\alpha_{12/13}$  (Simon *et al.*, 1991). G valgud viivad signaale GPCR'itelt allavoolu efektormolekulideni, mille kaudu aktiveeritakse edasised signaalrajad. Ligandi seondumisega aktiveeritakse GPCR, mis katalüüsib guanosiindifosfaadi (GDP) vabanemist  $G\alpha$  subühikult ja guanosiintrifosfaadi (GTP) sidumist, andes GPCR'ile guaniini nukleotiidivahetusfaktori (GEF) funktsiooni. GTP sidumine  $G\alpha$ 'le viib G valgu aktivatsioonini ja  $G\alpha$  eraldumiseni  $G\beta\gamma$  kompleksist.  $\beta$  ja  $\gamma$  subühikud jäävad seotuks ning funktsioneerivad dimeerina, samas kui  $G\alpha$  funktsioneerib monomeerina. Retseptorist vabanenud  $G\alpha$ -GTP ja  $G\beta\gamma$  seovad ja aktiveerivad allavoolu sihtmärke.  $G\alpha$  subühik omab sisemist GTPaasi aktiivsust, mis hüdrolyüsib GTP GDP-ks, mille tõttu seondub  $G\alpha$  subühik  $G\beta\gamma$  dimeeriga, moodustades inaktiivse G- $\alpha\beta\gamma$  heterotrimeeri ja lõppeb G valgu signaaliülekanne tsüklil (Hewavitharana ja Wedegaertner, 2012; Preininger ja Hamm, 2004).

Lisaks retseptoritele reguleerivad G valkude aktivatsiooni ka teised modulaatorvalgud. Üheks GPCR retseptorist mittesõltuvaks valguks on RIC8 (*Resistance to Inhibitors of Cholinesterase* 8) 63kDa-line valk, mis funktsioneerib samuti guaniini nukleotiidivahetusfaktorina (Tall *et al.*, 2002). RIC8, alternatiivselt ka nimega Synembryn, avastati esmakordselt *Caenorhabditis elegans*'i (*C.elegans*) sõeluuringust, kus otsiti neurotransmissiooniga seotud mutatsioone (Miller *et al.*, 1996). RIC8 on tugevalt konserveerunud ja funktsioneerib mudelorganismides seentest imetajateni (Miller *et al.*, 2000; Tall *et al.*, 2003; Afshar *et al.*, 2005; David *et al.*, 2005; Tõnissoo *et al.*, 2010) ning seda on kirjeldatud ka inimese rakkudes (Nishimura *et al.*, 2006; Muggerud *et al.*, 2009).

Imetajates on leitud kaks *Ric8* geeni, *Ric8a* ja *Ric8b*. RIC8A stimuleerib nukleotiidivahetamist kolmes  $G\alpha$  subklassis  $G\alpha_i$ ,  $G\alpha_q$ , ja  $G\alpha_{12/13}$ , RIC8B aga  $G\alpha_s$  (Tall *et al.*, 2003). RIC8A mängib olulist rolli erinevates G valkude poolt vahendatud rakulistes protsessides, nagu rakkude jagunemine, migratsioon ja sünapside signaaliseerimine (Miller ja Rand, 2000; David *et al.*, 2005). Samuti kontrollivad RIC8 valgud G valkude taset ja funktsioneerimist, ning töötavad molekulaarsete tsäperonidena, mis on vajalikud uute  $G\alpha$  subühikute sidumiseks raku membraanile (Gabay *et al.*, 2011).

RIC8A moodustab kompleksi inaktiivse  $G\alpha$  subühikuga, mis on seotud GDP'ga, stimulseerides GDP vabanemist ja stabiliseerides nukleotiidist vaba  $G\alpha$  subühiku tekkimist. GTP seondumisega  $G\alpha$ 'le RIC8A eraldub ja  $G\alpha$  subühik aktiveeritakse (Tall *et al.*, 2003).



Joonis 2. RIC8A roll G valkudes. RIC8 moodustab kompleksi vabanenud, kuid inaktiivse GDP'ga seotud  $G\alpha$  subühikuga, stimulseerib GDP vabanemist ja stabiliseerib nukleotiidist vaba  $G\alpha$  subühiku tekkimist. GTP seondumisega  $G\alpha$ 'le RIC8 eraldub ja  $G\alpha$  subühik aktiveeritakse. Talli uurimislabori koduleht<sup>1</sup>

### 1.2.2. RIC8A funktsioonid

RIC8A on evolutsiooniliselt konserveerunud tsütosoolne GEF, mis mängib olulist rolli sünaptilistes signaaliülekannetes ja asümmeetrilises raku jagunemises nematoodil ja *C.elegans* (Miller ja Rand, 2000), samuti neuroblastide moodustumisel *Drosophila*'s (David et al, 2005). Mudelorganismide ja imetaja rakkudega läbi viidud katsetes on näidatud, et RIC8A mõjutab kõik nelja klassi  $G\alpha$  subühikuid. *C. elegans*'is on RIC8A oluline mitoosikävi moodustumisel, tsentrosoomide rotatsioonil, tuumade migratsioonil ja teistes tsentrosoomi vahendatud protsessides (Miller ja Rand, 2000). RIC8A funktsiooni on kirjeldatud ka *C. elegans*'i närvisüsteemis – pea ganglionites ja kõhtmises närviketis (Miller *et al.*, 2000). Imetajates mõjutab RIC8 käävi paigutust ja reguleerib mikrotobulite poolt tekitatud tõmbejõudu, mis on vajalik, et tõmmata tsentrosome ja käävi raku korteksi poole (Tall ja Gilman, 2005). Hiirte RIC8A on vajalik embrüonaalsete tüvirakkude aktiivsuse reguleerimiseks (Gabay *et al.*, 2011) ja rakkude migratsioonis (Wang *et al.*, 2011). G valkude biosüntees algab  $G\alpha$ ,  $G\beta$  ja  $G\gamma$  subühikute translatsiooniga ribosoomides. G valkude voltumine toimub tsütosoolis, millele järgneb heterotrimeeri kokkupanek ER ja Golgi

kompleksis, mille järel toimub plasma membraanile liikumine. RIC8A käitub  $G\alpha$  valkude molekulaarse tsaperonina, osaledes ribosoomidelt sünteesitud  $G\alpha$  subühikute kokku voltimises ja nende plasmamembraanile transportimises. Ebakorrektnel  $G\alpha$  subühikute voltimine *knock-out* imetajarakkudes põhjustab nende lagundamist tsütoplasmas ja takistab nende jõudmist membraanile (Gabay *et al.*, 2011; Chan *et al.*, 2013; Tall, 2013).

Kannuskonna *Xenopus laevis*'e arengus on RIC8A ekspresseerunud migreeruvate kraniaalse neuraalharja rakkude rakumembraanis, kus ta reguleerib NC rakkude migratsiooni, adhesiooni ja kinnitumist heterotrimeersete G valkude abil. RIC8A puudumine kahjustab NC rakkude migreerumist ligandi suunas ja tekivad defektid rakkude adhesioonis (Fuentealba *et al.*, 2013).

Homosügootsed RIC8A *knock-out* hiired surevad varajases embrüogeneesis vanuses E6-E8 tõsiste gastrulatsiooni defektide tõttu (Tall, 2013). Hiire arengus E9.5 saab RIC8A ekspressioon alguse arenevas närvisüsteemis, E10.5 ekspresseerub RIC8A kraniaalganglionites, sümpaatilises tüves, dorsaalse juure ganglionites ja neuraaltorus. E11.5 on RIC8A ekspresseerunud üle kogu areneva aju, silma läätse ja vomeronasaalorgani (Tõnissoo *et al.*, 2003). Täiskasvanud hiire aju ekspresseeritakse RIC8A'd neokorteksis, hipokampus, käbikehas ja väikeajus, mis on olulised hiire käitumise reguleerimisel. Heterosügootsetes *Ric8a knock-out* hiirtes põhjustab RIC8A vähesus käitumuslikke iseärasusi nagu suurenenud ärevust ja ruumilise mälu häireid (Tõnissoo *et al.*, 2003 ja 2006). Katsed konditsionaalsete *knock-out* (CKO) hiirtega, kus *Ric8a* on välja lülitatud postmitootilistest neuronitest, põhjustasid hiirte sünnijärgset suremust vanuses P0-P6 (Ruisu *et al.*, 2013). *Ric8a* CKO hiirtel esines lihaskõhust ja spasme, kasvuprobleeme, kordinatsiooni- ja tasakaaluhäireid ning südamerütmi ebakorrapärasusi. Histoloogilised analüüsid näitasid skeletilihaste atroofiat ja südamelihaste hüpoplaasiat (Ruisu *et al.*, 2013).

### 1.2.3. RIC8 funktsioonid adhesioonis ja migratsioonis

Hiljutised uurimustööd on keskendunud ka RIC8A olulisuse uurimisele rakkude adhesioonis ja migratsioonis (Ma *et al.*, 2012; Tõnissoo *et al.*, 2010; Kask *et al.*, 2015).

Imetajate arengus on rakkude interaktsioonid basaalmembraaniga olulised rakkude EMT protsessis, mis on tähtis gastrulatsioonis, kus toimub ulatuslik rakkude migratsioon ja lootelehtede moodustumine. *Ric8a* KO hiirte embrüotel esineb gastrulatsioonis basaalmembraani katkendlikkust ja organiseerimatust, mille tõttu on rakkude adhesioon ja migratsioon gastrulatsioonis häiritud (Tõnissoo *et al.*, 2010). Samuti oli häirunud ka erinevate

rakkude adhesioon ekstraembrüonaalsetes struktuurides. Nende adhesioonihäirete põhjused võivad tuleneda basaalmembraani puudulikkusest ja sellega kaasnevatest häiretest EMT protsessis, mis põhjustab embrüote surma ja väärarenguid gastrulatsiooni staadiumis (Tõnissoo *et al.*, 2010).

RIC8A mängib rolli väikeaju arengus Bergmanni gliia adhesioonis basaalmembraanile. *In vitro* katsed *Ric8a knock-out* gliiarakkudega näitavad nende suutmatust kinnituda basaalmembraani põhikomponendile laminiinile. Sarnased tulemusid saadi ka hiirtega, kelle neuraalsetest eellasrakkudest oli RIC8A välja lülitatud, mis põhjustas defekte väikeaju kihtide moodustumises. Väikeaju Bergmanni gliiarakud ei kinnitunud basaalmembraanile, häiritud oli nende rakukehade paigutus ja jätkete organisatsioon (Ma *et al.*, 2012).

Hiljuti kirjeldati RIC8A rolli hiire neokorteksi arengus, kus RIC8A mängib rolli basaalmembraani terviklikkuse hoidmisel (Kask *et al.*, 2015). Uuringus kasutati CKO hiiri, kus *Ric8a* oli välja lülitatud neuraalsetest eellasrakkudest. Basaalmembraan moodustub normaalselt varajases arengus, aga RIC8A puudumisel laguneb hiljem. Selle põhjuseks võib olla nõrgenenud side ECM polümeeride vahel, mis rebenevad aju arenedes/suurenedes. Koos basaalmembraani defektidega ilmnevad ka migreeruvate rakkude lokaliseerumishäired (Kask *et al.*, 2015).

RIC8A funktsioneerib erinevate organismide füsioloogilistes protsessides olles G valkude molekulaarne tsäperon ja omades GEF aktiivsust. Tänu oma GEF aktiivsusele reguleerib RIC8A NC rakkude migratsiooni kontrollides nende adhesiooni (Fuentealba *et al.*, 2013). Tänu  $G\alpha$  subühikute kokku voltimises ja nende plasmamembraanile transportimises osalemisele mõjutab RIC8A G valkude interaktsioone teiste retseptoritega. Nendeks retseptoriteks võivad olla integriinid, mis vahendavad rakkude adhesiooni ja edastavad signaale. Südamelihastes mõjutavad integriinide ja BM interaktsioonid müokardi funktsioneerimist ja arenemist ning ka organogeneesi (Yang *et al.*, 2015). Ka RhoA-signaalarada mõjutab fokaalse adhesiooni induktsiooni ja aktiini polümeriseerumist (Chrzanowska-Wodnicka ja Burridge, 1996). Nendest omadustest tulenevalt on RIC8A oluline organite normaalsel arengul ja kompakteerumisel.

## 2. EKSPERIMENTAALNE TÖÖ

### 2.1. Töö eesmärgid

- Vastata küsimusele, kas *Nes;Ric8a<sup>CKO</sup>* mutantsetel vastündinud hiirtel esinevad kaasasündinud südame arengudefektid?
- Milline on leitud südame arengudefektide esinemissagedus?
- Leida koed, milledes toimuv konditsionaalne mutatsioon võiks põhjustada kirjeldatud südame arengudefektide.
- Läbi viia pilootuuring laminiin 1 ekspressiooni muutuste kohta *Nes;Ric8a<sup>CKO</sup>* mutantsetes embrüotes.

### 2.2. Materjal ja meetodika

#### 2.2.1. Töös kasutatud hiireliinid

Vastsündinud P0 *NestinCre;Ric8<sup>lacZ/lox</sup>* konditsionaalse *knock-out* (CKO) hiirte saamiseks kasutati järgmisi hiireliine:

- NestinCre, transgeenne hiireliin, kus neurospetsiifiline Cre-rekombinaasi ekspressioon on kontrollitud hiire *Nestini* promootori poolt.
- Ric8<sup>lox/lox</sup>, transgeenne hiireliin, kus märklaudgeen *Ric8* sisaldab LoxP järjestusi. NestinCre-rekombinaasi vahendatud rekombinaasi abil toimub LoxP järjestuste vahel olevate eksonite 1-4 eemaldamine *Ric8a* lookusest, mis inaktiveerib *Ric8a* geeni.
- Ric8<sup>lacZ/+</sup>, *lacZ knock-in* hiireliin, kus *Ric-8* lookusesse on viidud reportergeen *lacZ*, millelt sünteesitava  $\beta$ -galaktosidaasi ekspressioon jälgendab *Ric-8* ekspressioonimustrit.

NestinCre hiireliini Cre-rekombinaasi aktiivsuse iseloomustamiseks embrüonaasel perioodil kasutati reporterliinina B6.129S7-GT-ROSA26 (ROSA) hiireliini, mis sisaldab ROSA26 lookuses paiknevat loxP-STOP-loxP-lacZ konstrukti. Kui ristata uuritavat Cre-liini ROSA-liini hiirtega, siis lõigatakse Cre-rekombinaasi ekspresseerudes loxP järjestuste vaheline lõik Cre-spetsiifiliselt Nestinit ekspresseerivatest rakkudest välja (Zambrowicz *et al.*, 1997; Soriano, 1999).

Kontrollina kasutati C57B1/6J (Wt) hiireliini ja *NestinCre;Ric8<sup>lacZ/lox</sup>* pesakonnakaaslasti.

Kõik eksperimentides kasutatud katseloomi hoiti standardsetes tingimustes. Neile võimaldati ööpäevaringselt puhas jook ja söök. Katseloomad ohverdati vastavalt EL kehtestatud eeskirjadele (FELASA).

### 2.2.2. Embrüote dissekteerimine

Embrüote vanuseks märgiti 0.5 embrüonaalset päeva (E0.5) kui vaatlemise tulemusel oli kopulatsiooni järgselt näha vaginaalne limakork. Täpse vanuse hindamiseks loetleti lisaks ka somiidid. Embrüod dissekteeriti emakasarvedest ja asetati 1x fosfaatpuhvrissse (PBS e phosphate buffered saline). Embrüod eemaldati lootekestadest ning fikseeriti 4% PFA/PBSi (PFA e paraformaldehüüd) lahuses 1-2 h 4°C juures. Rebukott jäeti alles ja kasutati genotüpiseerimiseks.

### 2.2.3. Embrüote genotüpiseerimine

Genotüpiseerimiseks võetud koed lüüsiiti 0.5 mg/ml proteinaas K ensüümiga lüüsipuhvriss (180 mM Tris-HCl (pH 9.0); 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0.02% Tween 20) üleöö 55°C juures, segati ja kuumutati 20 minuti 98°C juures, et inaktiveerida ensüüm. Saadud lahuseid tsentrifuugiti 10-15 minutit 13000 x g tsentrifuugiga (Eppendorf) ja selles sisalduvat DNA-d kasutati polümeraasi ahelreaktsioonil (PCR).

PCR reaktsioonisegu maht oli 10 µl, mis koosnes: 1 µl DNAd,

1 µl Taq puhvrit (10mM Tris-HCl pH 7.5, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1mg/ml BSA (Bovine serum albumin) (Solis BioDyne) ), 1 µl 0.2mM dNTPd, 0.8 µl 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0.3 µl 0.3 µM praimer Cre1, 0.3 µl 0.3 µM praimer Cre2, 0.1 µl 0.05U/µl Taq-polümeraas, 5.5 µl MQ). 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 praimerid

NestinCre<sup>+/-</sup>:

NestinCre1 5'-AGGTGTAGAGAAGGCACTTAGC-3'

NestinCre2 5'CTAATCGCCATCTTCCAGCAGG-3'

Kasutatud PCR-i programmi parameetrid:

95°C 5 minutit

95°C 30 sekundit

58°C 40 sekundit 32 tsükli

72°C 1-2 minutit

72°C 10 minutit

4°C paus

#### 2.2.4. Parafiinlõikude valmistamine

Embrüod fikseeriti 4% PFA/PBS lahuses 1-2 h 4°C ning dehüdreeriti kasvava kontsentratsiooniga etanooli lahustes 1 h igas: 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96%, 2 x 100%. Järgmisena hoiti embrüosid 2 x 1 h ksüloolis. Seejärel viidi embrüod puhtasse parafiini ja inkubeeriti 65°C juures 1 h ning korrati puhta parafiiniga inkubatsiooni 3h. Embrüod sisestati puhtasse parafiini ja lasti taheneda toatemperatuuril, parafiinplokid säilitati 4°C juures.

Tahkunud parafiiniplokkidest valmistati 10µm lõigud kasutades automaatmikrotoomi HM355S. Koelõigud sirutati soojas vees ja kanti veetilgas polüsiiniga kaetud klaasile (Menzel-Gläser). Lõike lasti soojaplaadil kinnituda üleöö.

#### 2.2.5. LacZ värvimine

Kasutati *LacZ* ekspresiooni, et vaadelda Nestini ekspresiooni arenevas südames. *LacZ* geen kodeerib β-galaktosidaasi, mis hüdrolyüsib 5-bromo-4-kloro-3-indolüül-β-D-galaktopüranosiidi (X-gal) värvusetuks galaktoosiks ja 4-kloro-3-bromo-indigoks, mis annab intensiivse sinise värvuse rakkudele, kus ensümaatilise aktiivsuse avaldub.

Embrüosid pesti 3 korda PBS'iga ning inkubeeriti 24 h pimedas X-gal töölahuses. X-gal töölahus valmistamiseks lahjendatakse X-Gal (4% 40 mg · ml<sup>-1</sup>) ja DMF (N, N-dimetüülformamiid) lahjenduspuhvril kontsentratsiooniga 1 mg · ml<sup>-1</sup> (5 mM ferri-kaalium-ferritsüaniid-kristallin K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> (M<sub>w</sub> 329.2); 5 mM ferro-kaalium-ferritsüaniid-trihüdraat, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> · 3 H<sub>2</sub>O (M<sub>w</sub> 422.3); 1 x PBS). Lahus säilitati 4°C juures valguse eest kaitstult.

#### 2.2.6. Histoloogiliste preparaatide valmistamine

Parafiinlõigud deparafiniseeriti ksülooliga 3x5 min ja hüdreeriti langeva kontsentratsiooniga etanooli lahuses, vastavalt 100%, 96%, 90%, 70% etanooliga 2 min ja MQ-veega 1 min. Lõike värviti 5 min hematoksüliiniga ning loputati kraaniveega 5 min. Seejärel värviti lõike

eosiiniga 1-2 min ja loputati kraaniveega 5 min. Värvitud lõigud veetustati tõusva kontsentratsiooniga etanooli vesilahustes, vastavalt 50%, 60%, 70%, 80% etanool (2 min igas lahuses) ning see järel 96% ja 100% etanoolis 2 x 1 – 2 min. Lõpliku veetustamise saavutamiseks pesti lõike ksülooliga ning sulundati kattedklaasiga Kanada palsamisse.

#### 2.2.7. Immunohistokeemiline analüüs parafiinlõikudele

Deparafiniseeritud lõigud asetati antigeensuse taastamiseks 30 minutiks 95°C 10mM Na-tsitraatpuhvrisse, millesse oli lisatud 0.05% Tween20 (pH=6). Seejärel permeabiliseeriti lõike 0.01% Triton X-100 PBS-s 2 x 5 min. ning pesti 2 x 5 min PBS. Järgnevalt blokeeriti lõike ebaspetsiifilise seondumise vältimiseks 5% kitseseerum/1%BSA PBS lahuses 1h niisutuskambris. Lõigud inkubeeriti primaarse antikehaga 1%BSA-PBS lahuses üleöö 4°C juures. Kasutatud antikehad: küülikus valmistatud anti-Laminiin1 antikeha (Sigma Aldrich; lahjendus 1:500) ja hiires valmistatud anti-RIC8A antikeha (Proteintech Group, Inc; lahjendus 1:80). Seejärel pesti lõike PBT'ga (0.1% Tween-20 PBS-s) 3 x 10 min ning inkubeeriti fluorofooriga konjugeeritud sekundaarse antikehaga 1%BSA-PBS's 2h niisutuskambris. Kasutatud sekundaarsed antikehad: kitses valmistatud hiire vastane Alexa FluorV<sub>R</sub>555 (lahjendusega 1:800); kitses valmistatud küüliku vastane Alexa FluorV<sub>R</sub>555(lahjendusega 1:800).

Järgnevalt lõike pesti PBT'ga 3 x 10 min. ning tuumade värvimiseks kasutati DAPI (4'6'-diamidino-2-phenylindole, Sigma Aldrich) reagenti PBS's (lahjendusega 1:1000) 1 min jooksul. Lõigud loputati 2 x 5 min. PBS's ning sulundati Fluoromount (Calbiochem) geeliga. Lõikude kuivamise takistamiseks lakiti kattedklaasi ääred läbipaistva lakiga.

#### 2.2.8. Embrüote vaatlemine ja pildistamine

Kõiki antud töös kasutatuid embrüoid vaadeldi ning pildistati binokulaarmikroskoobiga Olympus SZX12 ning kujutise saamiseks kasutati Olympus XC50 kaamerat koos lisatarvikutega (Olympus U-RFL-T, U-ULH). Histoloogilisi preparaate analüüsiti mikroskoobiga Olympus BX51 ja, kaamera Olympus DP71. Immunohistokeemia läbinud koelõike vaadeldi ja pildistati lisaks ka konfokaalmikroskoobiga Olympus FV1000. Piltide dokumenteerimiseks ja järeltöötlemiseks kasutati arvutiprogrammi Adobe Photoshop 7.0.

## 2.3. Tulemused

### 2.3.1. Kardiovaskulaarsed vääraengud *Nes;Ric8a<sup>CKO</sup>* hiirtes

Südamedefektide tuvastamiseks kasutasime 12 eelnevalt välja dissekteeritud *Nes;Ric8a<sup>CKO</sup>* P0 hiire südant, milledest tehti 10µm paksused koronaarsed seerialõigud. Kõigil uuritud südametel esinesid struktuursed muutused, kuid erinevate kõrvalekallete arv ja ulatus varieerus suuresti (Tabel 1). Kõigil uuritud südametel oli epikard alaarenenud. Enamasti õnnestus tuvastada küll südame välispinnal paiknevad mesoteeli rakud, kuid subepikardiaalkiht oli vähearenenud (Joonis 3L, kontroll I).

Kompakteerumise häired esinesid kõigis vaadeldud mutantsetes südames. Kompakteerumise häireteks peeti olukorda, kus müokardi tihedus tervikuna oli oluliselt väiksem kui kontroll-südames, kompaktse müokardi osakaal oli vähenenud ja selles paiknesid rohked vere siinused nii südame välisseinas (Joonis 3F, nooled; kontroll C) kui ka vatsakeste vaheseinas (Joonis 3 J, nooled; kontroll G).

Vatsakesete vaheseina defekt (VSD) on vääraeng, kus parema ja vasaku vatsakese vahelise seinas on üks või mitu erineva suurusega auku. Vaadeldud 12 embrüo südamest esines 50% VSD. Vaheseina defektid olid sageli vatsakeste kraniaalsemas osas (Joonis 3 D, nool; kontroll A). VSD võib lugeda ka vatsakeste vaheseinas esinevaid suuri veresiinuseid, mis seerialõikudel tuvastatuna ulatusid ühest vatsakesest teise (pilte pole töös esitatud). Niisugused defektid esinesid rohkem vatsakeste kaudaalsemas osas (Joonis 3 J, nool; kontroll G), antud töös loeti neid defekte paralleelselt ka kompakteerumise häireks.

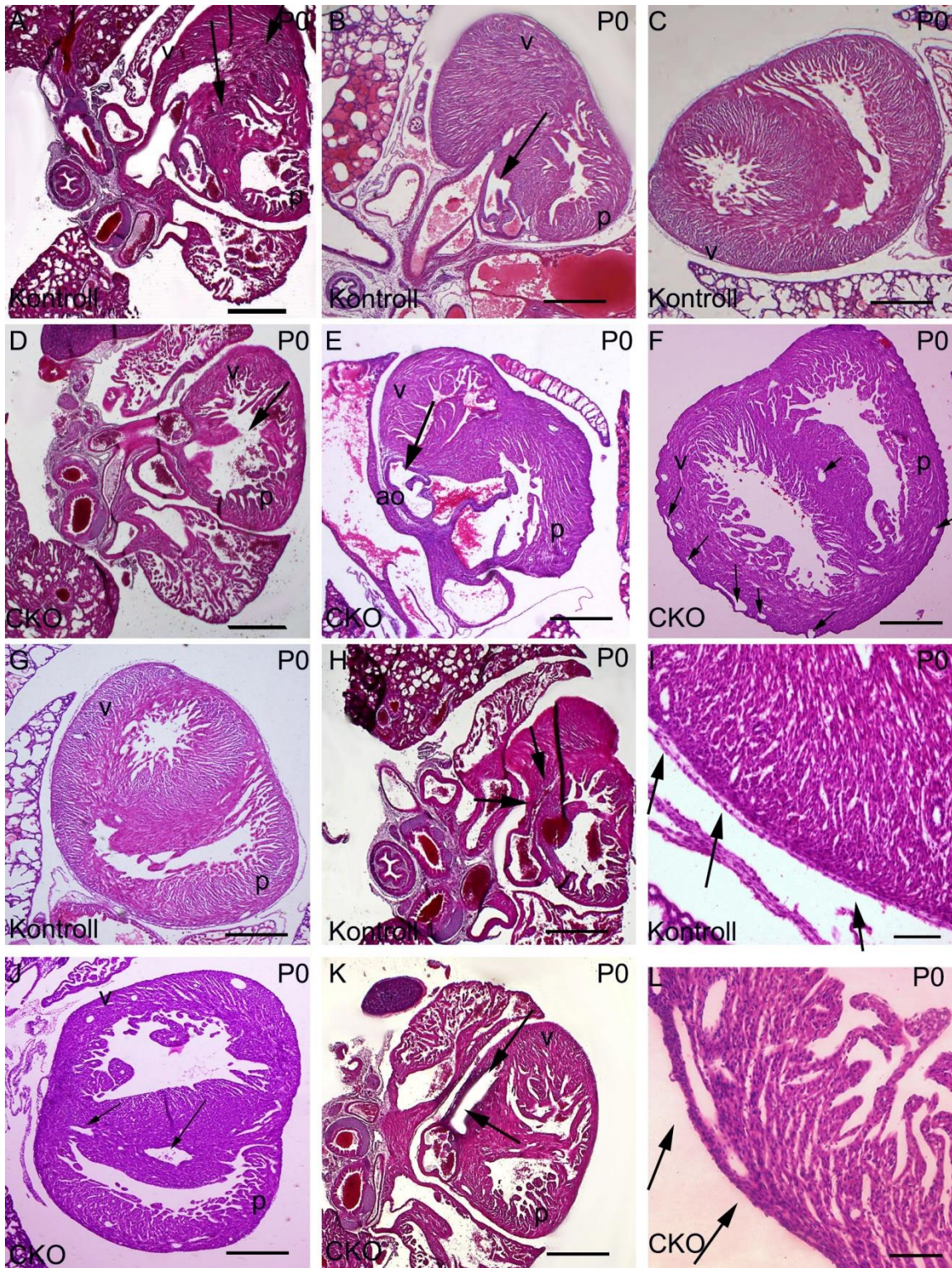
Müokardi hüpoplaasiaks peeti olukorda, kus vasaku vatsakese lihas oli õhem kui kontroll-südames. 92% CKO südames esines müokardi hüpoplaasiat.

Topelt väljavool paremast vatsakesest (DORV) on laiemalt südamedefekt, kus aort on nihkunud parema vatsakese kohale. Äärmuslikumal juhul on tekkinud otsene ühendus parema vatsakesega (Joonis 3E, nool näitab aorti ja p'ga on tähistatud parem vatsake) selle asemel, et ühenduda vasaku vatsakesega (Joonis 3B, nool tähistab aorti). Vaadeldud embrüotes esines sellist vääraengut 42% südametel.

Laienenud pärgarterite defektiks loeti olukorda, kus laienenud olid pärgarterite proksimaalse algusosa valendikud (Joonis 3 K, noolega on tähistatud algusosa valendiku laienemine; kontroll H) ja/või pärgarterite kaugemad osad võrreldes kontrollembrüotega. Selline olukord esines 92% *Nes;Ric8a<sup>CKO</sup>* P0 südametel.

Tabel 1. Südame morfoloogilised defektid P0 embrüotes

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	%
VSD	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	50
Kompakteerumise häired	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
Müokardi hüoplaasia	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	92
DORV	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	42
Laienenud pärgarterid	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	92
Subepikardiaalkihi hüoplaasia	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100

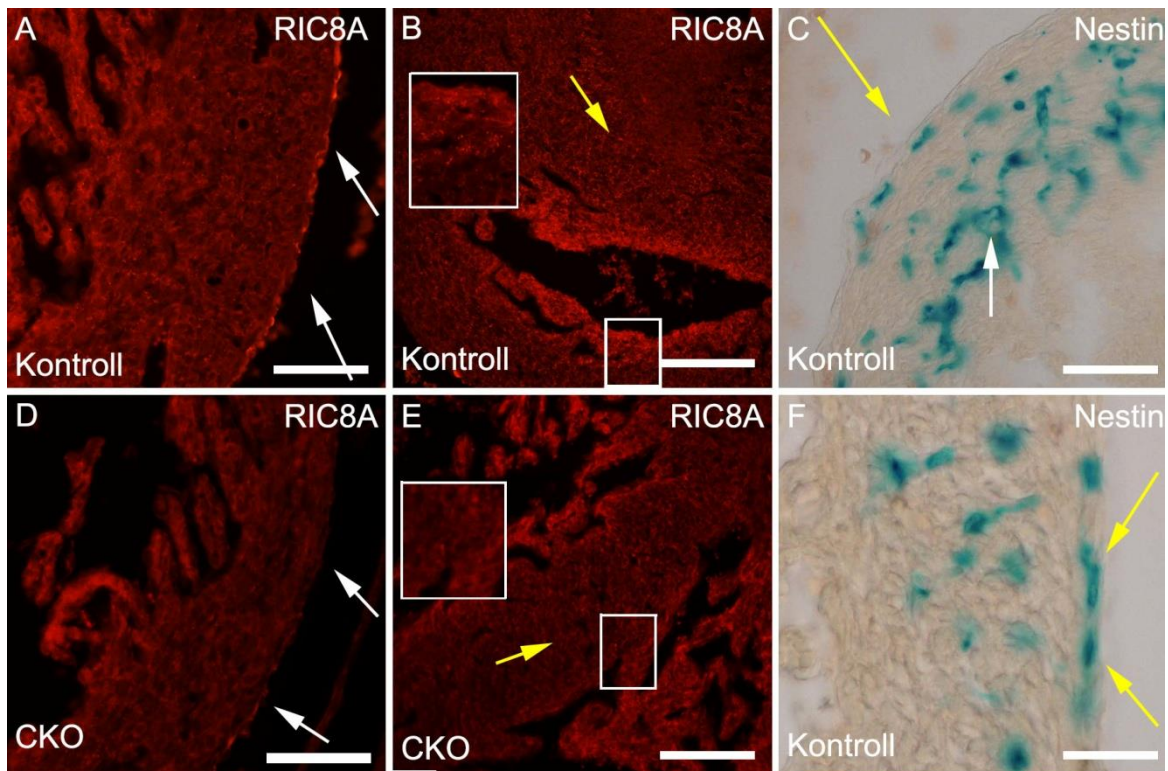


Joonis 3. Vastsündinud *RIC8;nestin-cre* CKO hiirte südame kaasasündinud arengudefektid (D–F, J–L). Mutantsetes südames on näha VSD defekt (D), DORV, kus aort (noolega tähistatud) suubub paremasse vatsakesse (E), siinused kompaktses müokardis (F, J), laienenud pärgarterid (K) ja vähenenud subepikardiaalkihiga epikard (L). Kontrollembrüotes on näha intaktne kraniaalne (A) ja kaudaalne (C) vatsakeste vahesein, normaalne aordi algus (B),

pärgarterite valendik (nooled H,) ja epikard (G, I). Lühendid: p – parem vatsake, v – vasak vatsake, ao – aort. Mõõtlõik: A-H, J, K on 500 µm; I ja L 80 µm.

2.3.2. RIC8A ja Nestini ekspressiooni analüüs *Nes;Ric8a<sup>CKO</sup>* hiire embrüotes  
RIC8A lokalisatsiooni ilmutasime E14.5 embrüotes, immunohistokeemiliselt, kontrollina kasutasime pesakonnakaaslaste (LM; *littermate*) südameid. Kontrollsüdames oli näha RIC8A ekspressiooni epikardis välimises rakukihis (Joonis 4 A, nooled). Südant katva epiteelirakkude kogu tsütoplasma oli tugevalt värvunud. Mutantsetes hiire südames sarnane värvumistüüp puudus täielikult (Joonis 4 D). Kontrollembrüote südame müokardi rakkudes on nähtav ka teistsugune ekspressioonimuster. Seal oli RIC8A koondunud väikesse tsütoplasmas paiknevatesse täppidesse (Joonis 4 B, väljalõige) Kontrollembrüote kardiomyotsüütides oli sarnast värvumist näha harva, aga enamasti puudus see täielikult (Joonis 4 E, väljalõige). Seega ka üldine RIC8A ekspressioonitase oli mutantsete embrüote südames vähenenud.

Kuna RIC8A lülitatakse konditsionaalselt välja just nendes rakkudes, kus ekspresseeritakse Nestin-Cre, siis analüüsisime ka  $\beta$ -galaktosidaasi aktiivsust Nestin-Cre;*Rosa26* hiirtes. E14.5 südames oli näha Nestin-Cre ekspressiooni epikardis (Joonis 4 C ja F, nooled) ja müokardis (Joonis 4 C). Kusjuures epikardi lokalisatsioon kattus vähemat osaliselt RIC8A ekspressiooniga kontrollembrüotes (Joonis 4 A, C, F).

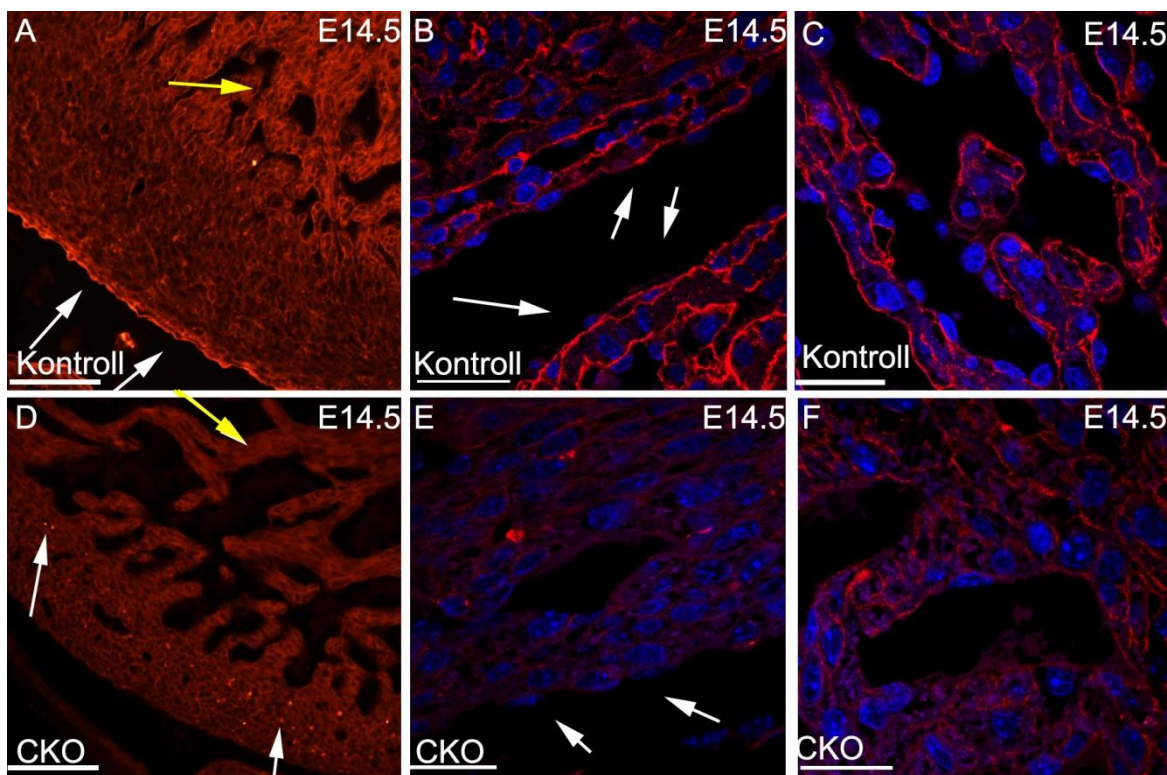


Joonis 4. RIC8A (A, B, D, E) immunohistokeemiline värvumine ja Nestin-Cre (C ja F) ekspresioon E14.5 südames. (A) RIC8A lokaliseerimine kontrollembriot südame epikardi epiteelis (nooled). (B) RIC8A täpiline lokaliseerimismuster kontrollembriot südames müokardis (väljalõikel). (D, E) RIC8A vähenenud ekspresioon CKO südame epikardis (D nooled) ja müokardis (väljalõikel). (C, F) Nestin-Cre ekspresioon Nestin-Cre;Rosa26 hiirte embrüonaalses epikardis (kollased nooled) ja müokardis (valge nool). Mõõtlõik: 100 µm

### 2.3.3. Laminiini lokaliseerimise analüüs *Nes;Ric8a<sup>CKO</sup>* hiirtes

P0 südames esines kardiomiopaatiale viitavaid müokardi kompakteerumise häireid ja vasaku vatsakese müokardi hüpoplaasiat. Varasemalt on seda seostatud ekstratsellulaarse matriksi ühe olulise komponendi laminiini geeni mutatsioonidega (Knöll et al., 2007). Seoses sellega võrreldi laminiini ekspresiooni kontroll-embryo ja CKO embryo südames E14.5 vanuses. Pilootuuringu immunohistokeemilised katsed viidi läbi ühe embryo kummastki grupist. Kontroll-embryo südames oli laminiini ekspresiooni üldine tase kõrge. Tugevamini olid ilmestunud epikardis (Joonis 5 A, B nooled) ja müokardi trabekulite ECM's (Joonis 5C). Selgelt nõrgem oli ekspresioon müokardi seinas kompaktses kihis. CKO embrüotes oli laminiini ekspresioon kontroll-embryo võrreldavate tingimuste juures konventsionaalse fluorestsents-mikroskoobiga vaevu detekteeritav (Joonis 5D). Suurema signaal/müra suhte ja parema lahutusega konfokaalmikroskoobiga õnnestus näha nõrka

ekspressiooni nii epikardis (Joonis 5 E, nooled) kui müokardis (Joonis 5E). Trabekulites oli fluorestsents mõnevõrra tugevam (Joonis 5F).



Joonis 5. Laminiini ekspressioon on CKO hiire embrüo südames vähenenud E14.5. (A, D) Laminiini immunofluorestsents kontroll-embrüo (A, valged nooled) ja CKO (D) südame epikardis, trabekulites (A ja D, kollane nool) ja kompaktses müokardi kihis (D, valged nooled). Laminiini ekspressioon kontrollembrüo (B—C) ja CKO (E—F) südame epikardis (B ja E valged nooled), trabekulites (C ja F) ja kompaktses müokardikihis kasutades visualiseerimiseks konfokaalmikroskoopi. Mõõtlõik: A ja D 100  $\mu\text{m}$ ; B, C, E, F 30  $\mu\text{m}$ .

## 2.4. Arutelu

Bakalaureusetöös kasutati *Nestin;Ric8a* CKO hiiri, kes olid saadud NestinCre transgeense hiireliini ja Ric8<sup>lox/lox</sup> transgeense hiireliini ristamisel, mille tulemusel lülitatakse välja *Ric8a* Nestinit ekspresseerivatest rakkudest. Kirjandusele tuginedes on teada, et Nestin ekspresseerub südames vanuses E12.5-E15.5 epikardis (Wagner *et al.*, 2006) ja prolifereeruvates kardiomiotsüütides (Liu *et al.*, 2015). Antud töös ilmnes Nestin-Cre ekspresioon E14.5 hiire südames nii epikardis kui ka müokardis. RIC8A ekspressiooni vaatlesime E14.5 hiirtes muuhulgas ka epikardis ja müokardis, millele tuginedes võib öelda, et RIC8A ja Nestin ekspresseerusid samades kohtades südames. Seega võime eeldada, et RIC8A on välja lülitatud südame epikardis ja osadest kardiomiotsüütidest, mida kinnitasid ka meie immunohistokeemilised katsed mutantsete embrüonaalsete südametega.

Morfoloogiliste defektide seas olid valdavad südamelihaskoe korrektse kompakteerumise ja formeerumise häired, nagu koevaheruumide suur osakaal vatsakeste seina ja vaheseina müokardis ning hüpoplastiline vasak vatsake. Seda tüüpi häired võivad olla seotud vähenenud adhesiooniga kardiomiotsüütide vahel. Kuna normaalsete kardiomiotsüütide kontakt ümbritsevate rakkudega toimub basaalmembraani (BM) kaudu (Langer jt., 1976; Roedriger jt., 2010; Yang jt., 2015) ja BM eraldab ka südame epiteelkudesid teistest kudedest, siis uurisime BM olulise markervalgu Laminiin-1 ekspressiooni. Selleks teostasime immunohistokeemilise töötuse kasutades Laminiin-1 antikeha, mida on laialt kasutatud basaalmembraani markerina embrüogeneesis (Aumailley *et al.*, 2000). Vaatlused fluorestsents- ja konfokaalmikroskoobiga näitasid, et laminiini ekspresioon oli vähenenud kogu CKO südames, eriti tugevalt tuli erinevus välja epikardis. Mutatsioonid laminiini valke kodeerivates geenides põhjustavad kardiomiopaatiat inimesel (Knöll jt., 2007). BM laminiini võrgustik on integriinide kaudu seotud sarkomeeridega. Hiljutises uuringus kasutades primaarseid kardiomiotsüütide kultuuri nädati, et BM-laminiini võrgustiku areng on seotud sarkomeeri moodustumisega ja kasvuga läbi integriinide ning seeläbi ka südamelihasku võimekusega tööd teha (Yang *et al.*, 2015).

Laminiinide ja integriinide omavaheline kontakt on oluline normaalseks BM moodustumises ja seega protsessides, milles BM osaleb, nagu rakkude adhesioon. Skeletilihaskudes on näidatud, et kaasasündinud lihasdüstroofia puhul on laminiini  $\alpha 2$  ja integriin  $\alpha 7$  subühikute osakaal vähenenud ja seetõttu on BM ebakorrapäraselt arenenud, mille tõttu laminiini  $\alpha 2$  subühik ei moodusta korrekseid sidemeid  $\alpha$ -düstroglükaani ja basaalmembraani vahele.

Düstroglükaan on aga oluline aktiini-tsütoskelti ja ECM omavahelises sidumises, defektid selles viivad kaasasündinud lihasedüstroofiani (Brockington *et al.*, 2001).

RIC8A mõju basaalmembraani organisatsioonile ja terviklikkusele toetavad uuringud teiste objektidega nagu hiire gastrula ja arenev neokorteks (Ma *et al.*, 2012; Tõnissoo *et al.*, 2010; Kask *et al.*, 2015). Tänu oma molekulaarse tsaperoni rollile mõjutab RIC8A G valkude interaktsioone erinevate retseptoritega, mille hulka kuuluvad ka integriinid (Gong *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2012). RIC8A on intratsellulaarne valk, mis mõjutab G valkude kaudu integriine.  $\alpha$  subühikute ebakorrapärane voltumine *Ric8a* mutantides võib viia muutusteni integriinide konformatsioonis, mille kaudu integriinide ja laminiinide omavaheline seondumine väheneb. Ülejäänud südamedefektide, nagu pärgarterite laienemine, VSD ja vasaku vastsakese hüpoplaasia, põhjused võivad olla tingitud epikardist pärit rakkude migreerumise ja diferentseerumise häiretest. Sest osad epikardi rakud läbivad pärast südamele kinnitumist epiteel-mesenhüümtransformatsiooni ning migreeruvad müokardi ja moodustavad kapillaaride endoteeli, müokardi fibroblaste ja pärgarterite silelihasrakke. (Kirby, 2007). RIC8A ei mõjuta neokorteksi arengul neuraalsete eelasrakkude teket, vaid neist pärit neurogeneesi läbivate rakkude migreerumist ja jagunemist (Kask *et al.*, 2015). Sarnaselt ka südames, võib RIC8A välja lülitamine häirida epikardist pärit rakkude migreerumist ja derivaatideks eristumist läbi G valkudega seotud signaalradade defektide.

## Kokkuvõte

Antud bakalaaurusetöö eksperimentaalosa eesmärgiks oli uurida P0 *Nes;Ric8a<sup>CKO</sup>* mutantsete hiirte südameid ja tuvastada seal tekkinud kaasasündinud südamedefekte. Koronaarsetelt seerialõikudelt leidsime järgmisi arenguhäireid:

- Alaarenenud epikard (100%)
- Kompakteerumise häired: müokardi koevaheruumide suhtosa suurenemine, kompaktse müokardi kihi vähenemine, rohkete veresiinused tekkimine südame välisseinas ja vatsakeste vaheseinas (100%)
- Vatsakesete vaheseina defekt (50%)
- Müokardi hüpoplaasia (92%)
- DORV (42%)
- Laienenud pärgarterid (92%)

Defektide tagamaid uurides leidsime, et *Nes;Ric8a<sup>CKO</sup>* hiirte südames on vähenenud laminiini ekspresioon. Eriti tugevalt väljendub see epikardis. Tõenäoliselt tingib laminiini ekspressioonihäire ka epikardi ja müokardi basaalmembraani organiseerumise häire tervikuna, mis omakorda võiks viia muutunud rakkudevahelise adhesioonini. Pärgarterite laienemine, VSD ja vasaku vatsakese hüpoplaasia, põhjused võivad olla tingitud epikardist pärit rakkude migreerumise ja diferentseerumise häiretest. Tuuakse analoogia põhjal välja võimalikke seoseid *Ric8a* ekspressiooni ja basaalmembraani struktuuri ja talitluse vahel.

## Summary

Congenital heart defects of *Nestin-cre;Ric8a* conditional *knock-out* mice (*Mus musculus*)

The goal of the Bachelor thesis was to examine the congenital heart defects of *Nes;Ric8a<sup>CKO</sup>* P0 mutant mice and the causes of these defects. From the histological serial sections we found the following developmental defects:

- Underdeveloped epicardium (100%)
- Defects in compartment: the decreased density of the myocardium - diminished proportions of the compact myocardium, blood sinuses in the heart wall and in the ventricular septum (100%)
- Ventricular septum defect (50%)
- Myocardial hypoplasia (92%)
- Double outlet right ventricle (DORV) (42%)
- Coronary artery anomalies (92%)

Examining these defects in the hearts of *Nes;Ric8a<sup>CKO</sup>* mice revealed an overall decline in the expression of laminin, mainly in the epicardium, where the difference was the highest. Therefore we can assume that the disorganized basal lamina plays a role in these developmental abnormalities and can be the reason of secondary defects that are caused by the defects in migration and differentiation of the epicardium derived cells.

## Tänu avaldused

Täna Keiu Kaske *Ric8a* teemalise nõustamise eest ja kiidan ta kriitilist silma. Veel täna Toomas Jagomäed praktilistes töödes juhendamise ja kannatlikkuse eest. Samuti kõiki positiivseid laborikaaslasi ning Carl-Martin Ivaskit. Ja loomulikult Raivo Raidi.

## Taotlus lõputöö avaldamisele piirangute kehtestamiseks

Tartu Ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia instituudi direktorile,

Toivo Maimets'le.

**Nimi:** Piia Hurt

**Sünniaeg:** 31.03.1992

**Õppekava:** Bioloogia (2463)

**Juhendaja:** Raivo Raid

**Lõputöö pealkiri:** *Nestin-cre;Ric8a* konditsionaalse mutantse hiire (*Mus musculus*) kaasasündinud südame arengudefektid

Palun mitte avaldada minu lõputööd kuni 25.05.2018.

Põhjuseks on see, et andmed on originaalsed ja me soovime neid avaldada artiklis.

25.05.15, Piia Hurt:

---

25.05.15, Raivo Raid:

---

## Kasutatud kirjandus

Afshar, K., Willard, F.S., Colombo, K., Siderovski, D.P., Gönczy, P. (2005) Cortical localization of the Galpha protein GPA-16 requires RIC-8 function during *C. elegans* asymmetric cell division. *Development*. 132(20):4449-59.

Arima, Y., Miyagawa-Tomita, S., Maeda, K., Asai, R., Seya, D., Minoux, M., Rijli, F.M., Nishiyama, K., Kim, K.S., Uchijima, Y., Ogawa, H., Kurihara, Y., Kurihara, H. (2012) Preotic neural crest cells contribute to coronary artery smooth muscle involving endothelin signalling. *Nat. Commun.* 3:1267.

Aumailley, M., Pesch, M., Tunggal, L., Gaill, F., Fässler, R. (2000) Altered synthesis of laminin 1 and absence of basement membrane component deposition in (beta)1 integrin-deficient embryoid bodies. *J. Cell. Sci.* 113 Pt 2:259-68.

Brade, T., Pane, L.S., Moretti, A., Chien, K.R., Laugwitz, K.L. (2013) Embryonic Heart Progenitors and Cardiogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 3(10):a013847.

Brockington, M., Blake, D.J., Prandini, P., Brown, S.C., Torelli, S., Benson, M.A., Ponting, C.P., Estournet, B., Romero, N.B., Mercuri, E., Voit, T., Sewry, C.A., Guicheney, P., Muntoni, F. (2001) Mutations in the fukutin-related protein gene (FKRP) cause a form of congenital muscular dystrophy with secondary laminin alpha2 deficiency and abnormal glycosylation of alpha-dystroglycan. *Am. J. Hum. Genet.* 69(6):1198-209.

Bruneau, B.G. (2008) The developmental genetics of congenital heart disease. *Nature.* 451: 943-948.

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

Chan, P., Thomas, C.J., Sprang, S.R., Tall, G.G. (2013) Molecular chaperoning function of Ric-8 is to fold nascent heterotrimeric G protein  $\alpha$  subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 110(10):3794-9.

Chou, Y.H., Khuon, S., Herrmann, H., Goldman, R.D, (2003) Nestin Promotes the Phosphorylation-dependent Disassembly of Vimentin Intermediate Filaments During Mitosis. *Mol. Biol. Cell.* (4): 1468–1478.

- David, N.B., Martin, C.A., Segalen, M., Rosenfeld, F., Schweisguth, F., Bellaïche, Y. (2005) *Drosophila* Ric-8 regulates Galphai cortical localization to promote Galphai-dependent planar orientation of the mitotic spindle during asymmetric cell division. *Nat. Cell. Biol.* 7(11):1083-90.
- 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., 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.
- 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  $\alpha$  Subunit Membrane Association. *Sci. Signal.* 4(200): 10.
- Garg, V., Kathiriya, I.S., Barnes, R., Schluterman, M.K., King, I.N., Butler, C.A., Rothrock, C.R., Eapen, R.S., Hirayama-Yamada, K., Joo, K., Matsuoka, R., Cohen, J.C., Srivastava, D. (2003) GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5. *Nature.* 424: 443-447.
- Gittenberger-de Groot, A.C., Winter, E.M., Bartelings, M.M., Goumans, M.J., DeRuiter, M.C., Poelmann, R.E. (2012) The arterial and cardiac epicardium in development, disease and repair. *Differentiation*, 84(1):41-53.
- Gong, H., Shen, B., Flevaris, P., Chow, C., Lam, S.C., Voyno-Yasenetskaya, T.A., Kozasa, T., Du, X. (2010) G protein subunit Galpha13 binds to integrin alphaIIbeta3 and mediates integrin "outside-in" signaling. *Science.* 327(5963):340-3.
- Hewavitharana, T., Wedegaertner, P.B. (2012) Non-canonical signaling and localizations of heterotrimeric G proteins. *Cell. Signal.* 24(1):25-34
- Hoffman, J.I.E., Kaplan, S. (2002) The incidence of congenital heart disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 39(12):1890-1900.
- Hohenester, E. and Yurchenco, P.D. (2013) Laminins in basement membrane assembly. *Cell. Adh. Migr.* 7(1):56-63.
- Kask K1, Ruisu K, Tikker L, Karis K, Saare M, Meier R, Karis A, Tõnissoo T, Pooga M. (2015) Deletion of RIC8A in neural precursor cells leads to altered neurogenesis and neonatal lethality of mouse. *Dev. Neurobiol.* doi: 10.1002/dneu.22264.

- Kassiri, Z., Khokha, R. (2005) Myocardial extra-cellular matrix and its regulation by metalloproteinases and their inhibitors. *Thromb. Haemost.* 93(2):212-9.
- Kelly, R. G. (2012) The second heart field. *Developmental Biology.* 100: 33–65.
- Kim, H., Yoon, C.S., Kim, H., Rah, B. (1999) Expression of extracellular matrix components fibronectin and laminin in the human fetal heart. *Cell. Struct. Funct.* 24(1):19-26.
- Kirby, M.L. (2007) Epicardium and Coronary Vessel Development, p. 133-144. *In Kirby, M.L. Cardiac Development.* Oxford University Press.
- Kirby, M.L. (2007) Neural Crest, Great Arteries, and Outflow Septation, p. 147-157 *In Kirby, M.L. Cardiac Development.* Oxford University Press.
- Knöll, R., Postel, R., Wang, J., Krätzner, R., Hennecke, G., Vacaru, A.M., Vakeel, P., Schubert, C., Murthy, K., Rana, B.K., Kube, D., Knöll, G., Schäfer, K., Hayashi, T., Holm, T., Kimura, A., Schork, N., Toliat, M.R., Nürnberg, P., Schultheiss, H.P., Schaper, W., Schaper, J., Bos, E., Den, Hertog, J., van Eeden, F.J., Peters, P.J., Hasenfuss, G., Chien, K.R., Bakkens, J. (2007) Laminin-alpha4 and integrin-linked kinase mutations cause human cardiomyopathy via simultaneous defects in cardiomyocytes and endothelial cells. *Circulation.* 116(5):515-25.
- Krstic, R.V. (1991) Cardiovascular System, p 42-44. *In Human Microscopic Anatomy: An Atlas for Students of Medicine and Biology.* Springer Science & Business Media.
- Langer, G.A., Frank, J.S., Nudd, L.M., Seraydarian, K. (1976) Sialic acid: effect of removal on calcium exchangeability of cultured heart cells. *Science.* 193(4257):1013-5.
- Liu, J., Ji, X., Li, Z., Zheng, H., Zheng, W., Jia, J., Shen, H., Zhang, Q., An, J. (2015) Nestin overexpression promotes the embryonic development of heart and brain through the regulation of cell proliferation. *Brain. Res.* 1610:1-11.
- Lockhart, M., Wirrig, E., Phelps, A., Wessels, A. (2011) Extracellular matrix and heart development. *Birth. Defects. Res. A .Clin. Mol. Teratol.* 91(6):535-50.
- Ma, S., Kwon, H.J., Huang, Z. (2012) Ric-8a, a guanine nucleotide exchange factor for heterotrimeric G proteins, regulates bergmann glia-basement membrane adhesion during cerebellar foliation. *J. Neurosci.* 32(43):14979-93.

- Merscher, S., Funke, B., Epstein, J.A., Heyer, J., Puech, A., Lu, M.M., Xavier, R.J., Demay, M.B., Russell, R.G., Factor, S., Tokooya, K., Jore, B.S., Lopez, M., Pandita, R.K., Lia, M., Carrion, D., Xu, H., Schorle, H., Kobler, J.B., Scambler, P., Wynshaw-Boris, A., Skoultschi, A.I., Morrow, B.E., Kucherlapati, R. (2001) TBX1 Is Responsible for Cardiovascular Defects in Velo-Cardio-Facial/DiGeorge Syndrome. *Cell*. 104(4):619-29.
- Miller, K.G., Alfonso, A., Nguyen, M., Crowell, J.A., Johnson, C.D., Rand J.B. (1996) A genetic selection for *Caenorhabditis elegans* synaptic transmission mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 93(22):12593-8.
- Miller, K.G., Rand, J.B. (200) 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):1649-60.
- Miller, K.G., Rand, J.B. (2000) A role for RIC-8 (Synembryn) and GOA-1 (G(o)alpha) in regulating a subset of centrosome movements during early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 156(4):1649-60.
- Miner, J. (2008) Laminins and Their Roles in Mammals. *MICROSCOPY RESEARCH AND TECHNIQUE* 71:349–356.
- Neves, S.R., Ram, P.T., Iyengar, R. (2002) G protein pathways. *Science*. 296(5573):1636-9.
- Nishimura, A., Okamoto, M., Sugawara, Y., Mizuno, N., Yamauchi, J., 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):487-98.
- Nishimura, A., Okamoto, M., Sugawara, Y., Mizuno, N., Yamauchi, J., Itoh, H. (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.
- Oliviéro, P., Chassagne, C., Salichon, N., Corbier, A., Hamon, G., Marotte, F., Charlemagne, D., Rappaport, L., Samuel, J.L. (2000) Expression of laminin alpha2 chain during normal and pathological growth of myocardium in rat and human. *Cardiovasc. Res*. 46(2):346-55.
- Park, D., Xiang, A.P., Mao, F.F., Zhang, L., Di, C.G., Liu, X.M., Shao, Y., Ma, B.F., Lee, J.H., Ha, K.S., Walton, N., Lahn, B.T. (2010) Nestin is required for the proper self-renewal of neural stem cells. *Stem. Cells*. 28(12):2162-71.

- Preininger, A.M., Hamm, H.E. (2004) G protein signaling: insights from new structures. *Sci. STKE*. 2004(218):re3.
- Rienks, M., Papageorgiou, A.P., Frangogiannis, N.G., Heymans, S. (2014) Myocardial extracellular matrix: an ever-changing and diverse entity. *Circ. Res.* 114(5):872-88.
- Roediger, M., Miosge, N., Gersdorff, N. (2010) Tissue distribution of the laminin beta1 and beta2 chain during embryonic and fetal human development. *J. Mol. Histol.* 41(2-3):177-84.
- Soriano, P. (1999) Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat. Genet.* 21(1):70-1.
- Tall, G.G. (2013) Ric-8 regulation of heterotrimeric G proteins. *J. Recept. Signal. Transduct. Res.* 33(3):139-43.
- Tall, G.G., Gilman, A.G. (2005) Resistance to inhibitors of cholinesterase 8A catalyzes release of G $\alpha$  and nuclear mitotic apparatus protein (NuMA) from NuMA/LGN/G $\alpha$ -GDP complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 102(46):16584-9..
- Tall, G.G., Krumins, A.M., Gilman, A.G. (2003) Mammalian Ric-8A (synembryn) is a heterotrimeric G $\alpha$  protein guanine nucleotide exchange factor. *J. Biol. Chem.* 278(10):8356-62.
- Tam, P.P, Parameswaran, M., Kinder, S.J. and Weinberger, R.P. (1997) The allocation of epiblast cells to the embryonic heart and other mesodermal lineages: the role of ingression and tissue movement during gastrulation. *Development.* 124: 1631-1642.
- Timpl, R. (1996). Macromolecular organization of basement membranes. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 8: 618-624.
- Tõnissoo, T., Lulla, S., Meier, R., Saare, M., Ruisu, K., Pooga, M., Karis, A. (2010) Nucleotide exchange factor RIC-8 is indispensable in mammalian early development. *Dev. Dyn.* 239(12):3404-15
- Tõnissoo, T., Meier, R., Talts, K., Plaas, M., Karis, A. (2003) Expression of ric-8 (synembryn) gene in the nervous system of developing and adult mouse. *Gene. Expr. Patterns.* 3(5):591-4.
- Wagner, N., Wagner, K.D., Scholz, H., Kirschner, K.M., Schedl, A. (2006) Intermediate filament protein nestin is expressed in developing kidney and heart and might be regulated by

the Wilms' tumor suppressor Wt1. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 291(3):R779-87.

Waldo, K.L., Kumiski, D.H., Wallis, K.T., Stadt, H.A., Hutson, M.R., Platt, D.H., Kirby, M.L. (2001) Conotruncal myocardium arises from a secondary heart field. *Development.* 128: 3179-3188.

Wang, L., Guo, D., Xing, B., Zhang, J.J., Shu, H.B., Guo, L., Huang, X.Y. (2011) Resistance to inhibitors of cholinesterase-8A (Ric-8A) is critical for growth factor receptor-induced actin cytoskeletal reorganization. *J. Biol. Chem.* 286(35):31055-61.

Wu, S.P., Dong, X.R., Regan, J.N., Su, C., Majesky, M.W. (2013) Tbx18 regulates development of the epicardium and coronary vessels. *Dev. Biol.* 383(2):307-20.

Yang, H., Borg, T.K., Liu, H., Gao, B.Z. (2015) Interactive relationship between basement-membrane development and sarcomerogenesis in single cardiomyocytes. *Exp. Cell. Res.* 330(1):222-32.

Zaffran, S., Kelly, R.G., Meilhac, S.M., Buckingham, M.E. and Brown, N.A. (2004) Right Ventricular Myocardium Derives From the Anterior Heart Field. *Circ. Res.* 95(3):261-8.

Zambrowicz, B.P., Imamoto, A., Fiering, S., Herzenberg, L.A., Kerr, W.G., Soriano, P. (1997) Disruption of overlapping transcripts in the ROSA beta geo 26 gene trap strain leads to widespread expression of beta-galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 94(8):3789-94.

Kasutatud veebiaadressid

<https://www.urmc.rochester.edu/pharmacology-physiology/research/labs/tall/Research.cfm#one><sup>1</sup> Vaadatud 2.05.15