

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIA TEADUSKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
ARENGUBIOLOOGIA ÕPPETOOL

Laura Tikker

**RIC8 funktsioon koduhiire (*Mus musculus*) läätse ja reetina arengus**

Magistritöö

Juhendajad: Keiu Kask, MSc

Tambet Tõnissoo, PhD

Tartu, 2014

# SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID.....	4
SISSEJUHATUS.....	5
1.1. Hiire silma varajane areng.....	6
1.2. Läätsse areng .....	8
1.2.1. Läätsse areng läätse plakoodist.....	8
1.2.2. Läätsse rakkude diferentseerumine.....	9
1.2.3. Rakkude planaarne polaarsus läätses .....	12
1.3. Reetina areng.....	13
1.3.1. Reetina arenemine silmakarikast.....	13
1.3.2. Reetina eellasrakkude jagunemine .....	16
1.4. RIC8 .....	18
2. EKSPERIMENTAALNE TÖÖ.....	21
2.1. Töö eesmärgid.....	21
2.2. Materjal ja meetodika.....	21
2.2.1. Kasutatud hiireliinid, nende ristamine ja genotüüpiseerimine .....	21
2.2.2. Embrüote dissekteerimine ja parafiinlõikude valmistamine .....	23
2.2.3. Kudedest totaalse RNA eraldamine .....	24
2.2.4. cDNA süntees totaalsest RNA-st .....	24
2.2.5. Kvantitatiivne reaal-aja PCR (qRT-PCR).....	24
2.2.6. Fluoresseeruv <i>Western blot</i> .....	25
2.2.7. $\beta$ -galaktosidaasi värvusreaktsioon.....	26
2.2.8. Immuunohistokeemia parafiinlõikudel.....	26
2.2.9. <i>Whole-mount</i> immuunohistokeemia.....	27
2.2.10. Immuunohistokeemia Vectastain <i>Elite ABC</i> kitiga .....	28
2.2.11. Hematoksüliini ja eosiiniga värvimine.....	29
2.2.12. Mitoosikävi orientatsiooni määramine jagunevates rakkudes .....	29
2.2.13. Rakkude loendamine ja statistika.....	30
2.3. TULEMUSED.....	31
2.3.1. <i>Ric8</i> ekspresseerub läätse primaarsetes ja sekundaarsetes fiibrites.....	31
2.3.2. <i>NestinCre</i> ekspresseerub arenevas läätses ja reetinas alates vanusest E11.5 .....	32
2.3.3. <i>Ric8</i> ekspressioon on <i>NestinCre;Ric8<sup>lacZ/lox</sup></i> hiireliini läätses ja reetinas vähenenud .....	34
2.3.4. <i>NestinCre;Ric8<sup>lacZ/lox</sup></i> läätses esinevad rakkudevahelised vakuolid.....	34
2.3.5. <i>NestinCre;Ric8<sup>lacZ/lox</sup></i> läätse fiibrid on ebakorrapäraselt organiseeritud .....	36
2.3.6. <i>NestinCre;Ric8<sup>lacZ/lox</sup></i> läätse epiteelirakkudes on säilinud rakkude planaarne polaarsus .....	37

2.3.7.	<i>NestinCre;Ric8<sup>lacZ/lox</sup></i> läätse sekundaarsed fiibrid on heksagonaalse kujuga .....	38
2.3.8.	<i>Ric8</i> ekspressiooni puudumine ei mõjuta reetina eellasrakkude mitoosikävi orientatsiooni.....	39
2.3.9.	<i>NestinCre;Ric8<sup>lacZ/lox</sup></i> hiire reetina on vanuses P0 pesakonnakaaslase reetinast paksem	41
2.3.10.	<i>NestinCre;Ric8<sup>lacZ/lox</sup></i> hiire reetinas on suurenenud TBR2 <sup>+</sup> rakkude hulk.....	42
2.3.11.	<i>NestinCre;Ric8<sup>lacZ/lox</sup></i> hiire reetina amakriinrakkude hulk ei ole muutunud vanuses P0	43
2.4.	ARUTELU .....	45
KOKKUVÕTE.....		50
Function of RIC8 in the development of mouse ( <i>Mus musculus</i> ) lens and retina.....		51
TÄNUSÕNAD.....		52
KASUTATUD KIRJANDUS .....		53
LIHTLITSENTS .....		70

## KASUTATUD LÜHENDID

aPKC – *atypical protein kinase C*; ebatüüpiline proteiinkinaas C

cDNA – *complementary DNA*; komplementaarne DNA

E – embrüonaalne arengupäev

GAP - *GTPase activating proteins*; GTPaasse aktiivsuse aktiveerivad valgud

GEF – *guanine nucleotide exchange factor*; guaniini nukleotiidivahetusfaktor

GPCR – *G protein coupled receptor*; G-valk seoseline retseptor

LGN – *Leu-Gly-Asn Repeat-Enriched Protein*

*loxP* - *locus of X-over P1*; *X-over* lookus bakteriofaagis P1

mInsc – *mammalian Inscuteable*

NuMa – *Nuclear Mitotic Apparatus*

P – postnataalne arengupäev

Par – *partitioning defective protein*

pH3 – *phosphorylated histone H3*; fosforüleeritud histoon H3

RGS – *Regulators of G-protein signaling*; G-valgu signaali regulaatorid

RIC-8 – *Resistant to Inhibitors of Cholinesterase 8*

Shh – *Sonic hedgehog*

TF – *transcription factor*; transkriptsioonifaktor

$\beta$ -CAT –  *$\beta$ -catenin*;  $\beta$ -kateniin

$\gamma$ -TUB –  *$\gamma$ -tubulin*;  $\gamma$ -tubuliin

## SISSEJUHATUS

Silm on tähtis organismi meeleeelundkonna osa, mis on suuteline valgusele reageerima ning andma suure osa infost ümbritseva keskkonna kohta. Info saadakse valgusest, mille lainepikkust ja tugevust on silm võimeline eristama. Antud funktsiooni tagab silma keerukas ehitus, mis koosneb paljudest erinevatest kudedes. Silma funktsionaalsuse koha pealt on ülioluline arengu käigus spetsiifiliste rakutüüpide diferentseerumine ja paigutumine õigetesse piirkondadesse õigel ajahetkel. Silma oluliseks struktuuriks on lääts, mis koondab silma tuleva valguse ja reetina, mis võtab selle vastu, reageerib vastavalt ning saadab info aju. Tegemist on kudedega, mis omavad küll erinevat talitlust ja rakutüüpe, kuid mõjutavad arengu käigus siiski teineteise kujunemist. Silma funktsiooni täitmise ja ühtse arengu tõttu on lääts ja reetina lahutamatud.

Guaniini nukleotiidivahetusfaktor RIC8 on valk, mis läbi G-valkude vahendatud signaaliradade reguleerimises osaleb mitmetes organismi arengu jooksul toimuvates tähtsates protsessides. Varasemalt on näidatud, et valk RIC8 on vajalik gastrulatsioonis, samuti rakkude asümmeetrilises jagunemises, adhesioonis ja migratsioonis. Ühtlasi on näidatud ka, et RIC8 omab rolli närvisüsteemi arengus. Silma arengus ei ole RIC8 funktsiooni varasemalt uuritud. Kuna reetina ja läätse arengu käigus toimub samuti kontrollitud rakkude jagunemine ja migratsioon oma õigetesse positsioonidesse, kus määrav roll ka adhesioonil, siis võib RIC8 potentsiaalselt omada rolli ka reetina ja läätse arengus. RIC8 rolli uurimiseks imetajates on heaks mudeliks transgeensed hiired. Kasutades klassikalist Cre/Lox süsteemi on võimalik uuritav geen (antud juhul *Ric8*) spetsiifiliselt näiteks silma neuraalsetest eellasrakkudest välja lülitada, mis annab teadlasele märksa paremad võimalused spetsiifilist rolli välja selgitada. Antud magistritöös kasutati *NestinCre;Ric8<sup>lacZ/lox</sup>* hiireliini, kus *Ric8* ekspressioon on nii läätses kui ka ja reetinas maha reguleeritud, mis võimaldab uurida arenenud läätse ja reetina morfoloogiat, läätse rakkude organiseeritust ja planaarseid polariseeritust. Samuti on võimalik vaadelda reetina eellasrakkude jagunemist ning tekkivaid reetina rakutüüpe.

Magistritöö eesmärgiks on anda ülevaade hiire arengus aset leidvatele protsessidele keskendudes kahele olulisele anatoomilisele struktuurile: reetinale ehk võrkkestale ja läätsele. Kitsamalt käsitletakse guaniini nukleotiidivahetusfaktor RIC8 biokeemilisi ja füsioloogilisi funktsioone. Magistritöö eksperimentaalses osas iseloomustatakse *Ric8* ajalis-ruumilist ekspressioonimustrit hiire läätses. Lisaks kirjeldatakse RIC8 funktsiooni hiire reetina ja läätse arengus kasutades mudelina neurospetsiifilist *NestinCre;Ric8<sup>lacZ/lox</sup>* hiireliini.

## KIRJANDUSE ÜLEVAADE

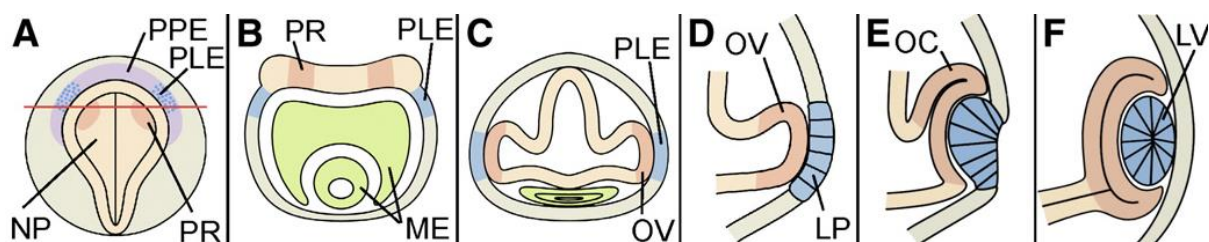
### 1.1. Hiire silma varajane areng

Silma arenemine on keerukas protsess, mis hiires saab alguse gastrulatsiooni staadiumis E6.5-E8.0 ning lõpeb pärast sündi ~14. postnataalsel arengupäeval (P14), kui avanevad silmalaud (Downs ja Davies, 1993). Gastrulatsiooni staadiumis toimub embrüo primitiivse ektodermi (tulevane neuraalplaat) anterioorses piirkonnas silmavälja moodustumine, mille rakud annavad aluse silma neuraalsetele osadele nagu reetina ja nägemisnärv (joonis 1A; 1B) (Fernández-Garre jt., 2002). Silmaväli määratakse spetsiaalsete silmavälja transkriptsiooni faktoritega (TF) nagu *Rx1*, *Pax6*, *Six3*, *Lhx2* ja *Optx2*, mis reguleerivad nii üksteise ekspressiooni kui silma edasist arengut (Giannaccini jt., 2013; Tétreault jt., 2009; Toy jt., 1998; Zuber jt., 2003). Külgnevatel neuraalplaadi anterioorseses piirkonnast (otsaju, hüpotaalamuse ja vaheaju piirkonnad) on silmaväli eristunud läbi Eph/Ephrin signaalseerimisraja, mis tagab õige rakkudevahelise adhesiooni ja ennetab silmavälja ning sellega piirnevate rakkude segunemist (Cavodeassi jt., 2013). Silmade moodustumiseks peab neuraalplaadil olev silmaväli jagunema kaheks, mille tagab *Sonic hedgehog*'i (*Shh*) ekspressioon neuraalplaadi all olevas seljakeelikus. *Shh* inhibeerib *Pax6* ekspressiooni silmavälja keskmistes rakkudes, mille tõttu ei arene nendest rakkudest reetinat vaid tulevane optiline vars (Li jt., 1997; Macdonald jt., 1995).

Ektoderm on gastrulatsioonis eristunud neuraalseks ektodermiks (neuraalplaat) ja mitteneuraalseks ektodermiks. Antud struktuuride piiril paikneb plakoodi-eelne ektoderm, mille rakkudest areneb läätse plakood ning mitmed teised plakoodid nagu olfaktoorne, adenohüpofüüsi ja kõrva plakood (joonis 1A; 1B) (Saint-Jeannet ja Moody, 2014). Plakoodieelse ektodermi rakud hakkavad erinevatesse suundadesse diferentseerudes ekspresseerima piirkonniti erinevaid TF-eid. Tulevase plakoodi läätse plakoodi ektodermis on näiteks ekspresseeritud *Pax6*, *Six3*, *Sox2* ja *Sox3*, tulevastes olfaktoorse plakoodi rakkudes aga *Pax6*, *Dlx3* ja *Delta5* (Bailey jt., 2006; Bhattacharyya ja Bronner-Fraser, 2008; Ogino jt., 2012).

Pärast neuraalitoru kujunemist hakkavad silmavälja rakud väljasopistuma läätse plakoodide suunas, mis on selleks hetkeks täielikult eristunud plakoodieelsest ektodermist ning paiknevad embrüo pea külgedel. Taolisest eesaju rakkude välja sopistumisest embrüo külgedele moodustuvad silma optilised vesiikulid (joonis 1C; 1D). Optiliste vesiikulite evagineerumiseks embrüo külgele on vajalik  $\beta$ -kateniin, mis aktiveerides Tsükliin D1 transkriptsiooni, suurendab rakkude jagunemist (Matsuda ja Keino, 2001). Koos optilise vesiikuli evagineerumisega pannakse paika ka optilise vesiikuli proksimaalne-distaalne telg, mis määratakse TF-ite ekspressiooniga. Eesajule lähemal ehk proksimaalsemast optilise vesiikuli piirkonnast areneb

optiline vars, mis annab aluse tulevasele nägemisnärville ning ekspresseerib Shh mõjul spetsiifiliselt PAX2-te ja VAX1-te (Mui jt., 2005; Ohsaki jt., 1999; Take-uchi jt., 2003). Vax1 puudumisel ei inhibeerita optilises varres Pax6 ja Rx geenide ekspressiooni ning tekivad nägemisnärvi arengu defektid (reetina rakkude kogunemine nägemisnärvi) ja *choroid fissure* (silmakarika lõhe) mittesulgumisest areneb välja koloboom (Hallonet jt., 1999). Ka *Pax2*<sup>-/-</sup> *knock-out* hiires on nägemisnärvi areng häiritud, sisaldades ektoopilisi reetina pigmentepiteeli rakke ning sarnaselt *Vax1*<sup>-/-</sup> hiirtele tekib neil koloboom (Schwarz jt., 2000).



**Joonis 1. Silma varajane areng.** (A) Neuraalplaat (NP), sellel paikneb silmaväli (PR) ning plakoodi-eelne ektodermi (PPE). PPE-l paikneb omakorda tulevase läätse plakoodi ektoderm (PLE). (B) Embrüo ristlõige, mis näitab silmaväljade (PR) ja tulevase läätse plakoodi ektodermi (PLE) asetust koos embrüo mesodermi ja endodermiga (ME). (C) Eesaju rakkude invagineerumine PLE suunas ja optilise vesiikuli (OV) moodustumine. (D) PLE rakkude paksenemine ja läätse plakoodi (LP) moodustumine. (E) Läätselise plakoodi invagineerumine ja silmakarika (OC) moodustumine. (F) Läätselise vesiikuli moodustumine (LV) (Ogino jt., 2012) (punane triip joonisel A tähistab piirkonda, kust on tehtud embrüo ristlõige)

Optilise vesiikuli distaalsema osa invagineerumisel moodustub kahekihiline silmakarikas, mis ekspresseerib PAX6-te. Pax6 ja Pax2 omavaheline ekspressioonide inhibeerimine paneb paika optilise varre ja silmakarika vahelise piiri (joonis 1E; 1F) (Schwarz jt., 2000). Silmakarikas koosneb sisemisest ja välimisest kihist. Välimine kiht ekspresseerib sarnaselt optilisele varrele Vax1-te ning annab aluse pigmentepiteelile (Ohsaki jt., 1999). Pigmentepiteeli arenguks on vajalikud TF-d Otx1, Otx2 ja Mitf. Algselt on Mitf ekspresseeritud kogu arenevas optilises vesiikulis, kui optilise vesiikuli invagineerumisel inhibeerib Vsx2 (Chx10) selle ekspressiooni optilise vesiikuli distaalsemas osas nii, et silmakarika staadiumis on Mitf ekspresseeritud ainult silmakarika välimises kihis (Bharti jt., 2008; Horsford jt., 2005). *Mitf*<sup>-/-</sup> hiires ei moodustu tavalist ühekihilist pigmentepiteeli vaid tekib paksenenud silmakarika välimine kiht (Ou jt., 2013). Otx1 ja Otx2 on samuti ekspresseerunud üle kogu optilise vesiikuli, kuid silmakarika staadiumis muutuvad pigmentepiteeli spetsiifiliseks. Otx1 ja Otx2 puudumisel ei toimu normaalse kahekihilise silmakarika moodustumist ning silmakarika pigmentepiteeli kiht on tavalise ühekihilise asemel mitmekihiline sarnanedes silmakarika neuraalse kihiga

(Martinez-Morales jt., 2001). On näidatud, et *Otx2* puudulik pigmentepiteel sarnaneb neuraalsele reetinale ekspresseerides neuraalsele reetinale omaseid markereid nagu *Sox2*-te ja *Fgf8*-t. *Otx2* represserib neid, et indutseerida silmakarika välimise kihi rakkude diferentseerumist pigmentepiteeli rakkudeks (Nishihara jt., 2012). *Mitf* ja *Otx* geenide ekspressioon on aktiveeritud ning sõltuv *Wnt/β*-kateniinist, ilma milleta diferentseerub pigmentepiteel neuraalseks reetinaks (Westenskow jt., 2009).

Silmakarika sisemine kiht annab aluse silma reetinale ning ekspresseerib silmakarika varajases arengus (E10.5) TF-eid *Sox2* ja *Pax6*. *Sox2* represserib *Pax6*-te silmakarika sisemise kihi keskmistes rakkudes, et rakud oleksid võimelised diferentseeruma neuraalses suunas ning moodustama reetina. Sisemise kihi perifeersemates rakkudes *Pax6*-te ei inhibeerita ning antud rakud arenevad mitteneuraalses suunas iiriseks ja ripskehaks (Matsushima jt., 2011). Silmakarika dorsaalse-ventraalse telje paneb paika *Vax2* ekspressioon ventraalses osas ja *Tbx5* ekspressioon silmakarika dorsaalses osas (Barbieri jt., 1999; Mui jt., 2005). Samas nasaalse-temporaalse telje määrab *Pax6* ekspressioon mõlemas suunas ning on eraldatud *Vax2* ja *Tbx5* ekspressiooniga (Bäumer jt., 2002; Leconte jt., 2004). Taoline ekspressioon silmakarika dorso-ventraalsel teljel on põhjustatud seljakeelikust tuleneva *Shh* signaalist, mis aktiveerib *Vax2* ekspressiooni, kuid inhibeerib *Bmp4* silmakarika ventraalsest osast (Zhao jt., 2010). Selle tõttu on neuraalitoru dorsaalsest osast tuleneva *Bmp4* signaal piirdunud silmakarika dorsaalse osaga, kus põhjustab *Tbx5* ekspressiooni (Koshiba-Takeuchi, 2000).

## 1.2. Läätsse areng

### 1.2.1. Läätsse areng läätse plakoodist

Optilise vesiikuli invaginatsioonile ehk kahekihilise silmakarika moodustumisele paneb aluse selle lähedal asuv läätse plakood, mille rakud alustavad invagineerumist optilise vesiikuli suunas ning lükkavad sellega optilise vesiikuli distaalsema osa omakorda optilise vesiikuli sisse (joonis 1D; 1E; joonis 2B). Läätsse plakoodi sisse sopistumisel E10.5 moodustub läätse auk, mis eraldub ülejäänud pinnaektodermi küljest ning moodustab E11.5 läätse vesiikuli (joonis 1F; joonis 2C; 2D). Läätsse augu moodustumiseks tõmbuvad läätse plakoodi rakud apikaalselt kokku ning tekivad koonusekujulised rakud, mis lükkavad läätse plakoodi rakud embrüo sisse. Taoline rakkude apikaalne kokku tõmbumine saavutatakse läbi *RhoA* raja, mis positsioneerib valgus *Shroom3* apikaalselt läätse plakoodi rakkudes, tekitades apikaalselt kokku tõmbuvad aktiini-müosiini kompleksid (Borges jt., 2011; Chauhan jt., 2011; Plageman jt., 2011; Plageman jt., 2010). Läätsse vesiikuli arenguks on vajalik läätse plakoodi rakkude jagunemise ja läätse

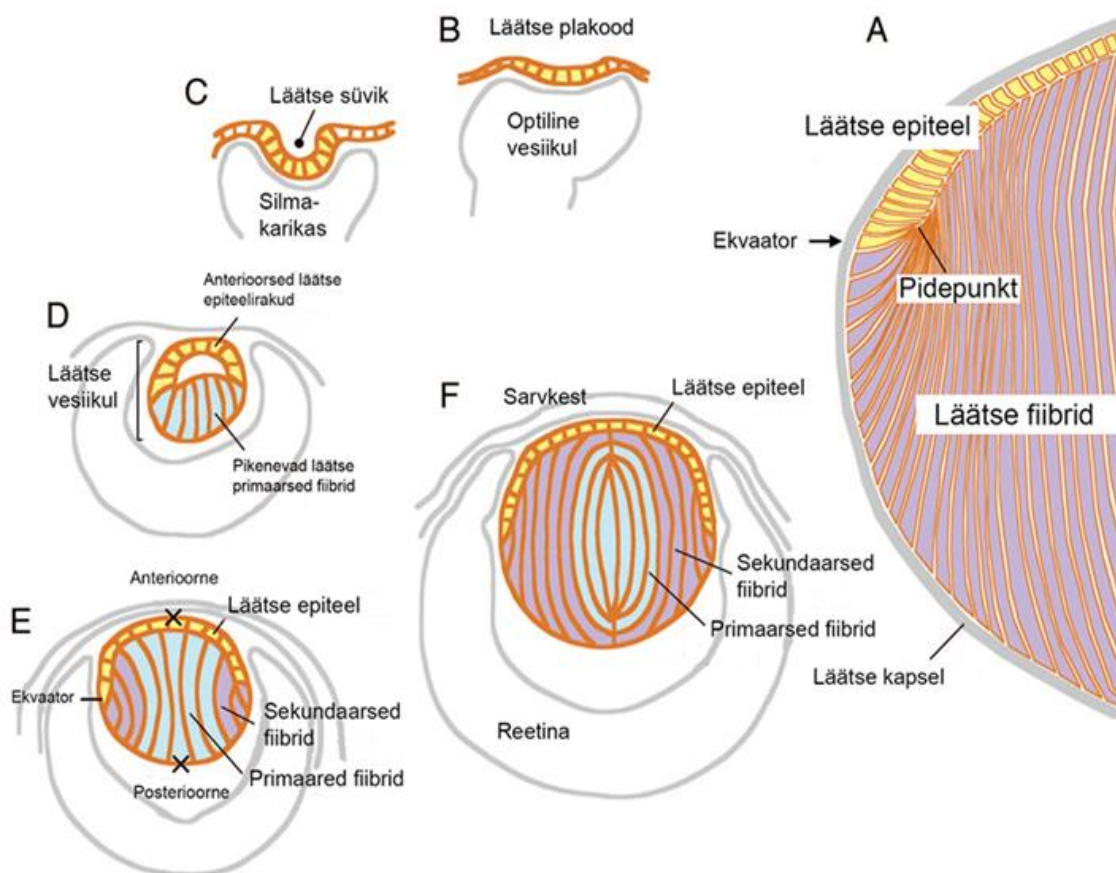
augu rakkude apoptoosi reguleerimine, milles osalevad TF-d Mab2111, Six3 Pitx3, FoxE3 ja Sox11. Mab2111 puudumisel ei alusta lätse plakoodi rakud invagineerumist ning lätse ei moodustu (Yamada, 2003). Samas Six3, Pitx3, Sox11 ja FoxE3 puudumisel on küll lätse plakoodi rakud võimelised invagineeruma ning moodustub lätse auk, kuid apoptoosi puudumise tõttu ei ole rakud võimelised eralduma pinnaektodermist, mis põhjustab täiskasvanud loomas ühenduse lätse ja sarvkesta vahel (Ahmad jt., 2013; Liu jt., 2006; Medina-Martinez jt., 2005; Wurm jt., 2008). Sarnast fenotüüpi omab ka *Ap2α<sup>-/-</sup>* hiir, kellel lätse auk ei eraldu silma embrüonaalse arengu käigus pinnaektodermist (Pontoriero jt., 2008).

Lätse vesiikuli moodustumises mängivad rolli ka signaalid, mis tulevad pinnaektodermi kõrval paiknevast optilisest vesiikulist. Optilise vesiikuli rakkudes ekspresseeritakse PAX6, mis võimaldab plakoodi paksenemist ja invagineerumist, sest optilise vesiikuli spetsiifilises Pax6 konditsionaalses mutandis ei suuda lätse plakood invagineeruda mistõttu lätse ega silmakarikat ei moodustu, kuigi lätse plakoodi rakkudes on Pax6 ekspresseeritud (Klimova ja Kozmik, 2014). Samas on lätse arenguks vajalik ka optilise vesiikuli dorsaalne Bmp4 ja ventraalne Pax2 ning Fgf8 ekspressioon. Ilma nendeta lätse vesiikulit ei moodustu, sest Bmp signaalid on vajalikud FoxE3 ekspressiooni säilitamiseks lätse plakoodis ja rakkude aktiini tsütoskeleti reorganiseerumiseks ning invagineerumiseks (Furuta ja Hogan, 1998; Kobayashi jt., 2010; Rajagopal jt., 2009). Fgf signaalid osalevad aga lätse plakoodi rakkude apoptoosi reguleerimises ning on vajalikud lätse vesiikuli arenemiseks (Garcia jt., 2011).

### 1.2.2. Lätse rakkude diferentseerumine

Pärast lätse vesiikuli moodustumist alustavad vesiikuli anteriorseelt paiknevad rakud diferentseeruma lätse epiteeli rakkudeks ja posterioorseelt paiknevad rakud hakkavad pikeneva vesiikuli anteriorsete rakkude suunas ning diferentseeruma lätse primaarseteks fiiber-rakkudeks (joonis 2D). Peale primaarsete fiibrile kinnitumist epiteeli rakkudele hakkavad lätse ekvaatori (lätse epiteeli ja primaarsete fiibrile vaheline ala) piirkonnas olevad epiteeli rakud terminaalselt jagunema ja diferentseeruma lätse sekundaarseteks fiibrileteks, mis pikenevad apiko-basaalselt ja migreeruvad lätse sisemusse (joonis 2E; 2F). Lätse epiteeli saab jagada neljaks piirkonnaks. Kõige anteriorsemalt asub lätse keskmine tsoon, kus asuvad G0 staadiumis olevad rakud, mis ei panusta sekundaarsete rakkude tootmisesse. Keskmise tsooniga piirneb ekvatoriaalses suunas eelgerminatiiv-tsoon ja sellega piirnev germinatiiv-tsoon, kus toimub lõplik rakkude jagunemine, mis annab aluse uutele fiiber-rakkudele. Lätse ekvaatoris

asub germinatiiv-tsooni kõrval ülemineku tsoon, kus rakud alustavad diferentseerumist ja migreerumist läätse sisemuse suunas (joonis 2A).



**Joonis 2. Täiskasvanud hiire läätse ehitus ja läätse areng.** (A) Täiskasvanud lääts ehitus, kus anterioorselt paikneb läätse epiteel ning läätse fiibrid diferentseeruvad läätse ekvaatoris olevatest epiteeli rakkudest. Lääts katab läätse kapsel (B) Lääts plakoodi invagineerumine optilise vesiiikuli suunas. (C) Lääts invagineerumisel moodustub läätse auk (lääts süvik). (D) Lääts vesiiikuli moodustumine ning posterioorselt paiknevate primaarsete fiibrile pikenedamine. (E) Lääts primaarsed fiibrid on pikenenud läätse epiteelini ning moodustuma on hakanud läätse sekundaarsed fiibrid ekvaatori piirkonnas. (F) Sekundaarsed fiibrid on lükanud primaarsed fiibrid läätse keskele ning on moodustunud sarvkest (modifitseeritud Sugiyama jt., 2011 järgi).

Lääts rakkude diferentseerumises osalevad mitmed signaalirajad. Lääts vesiiikuli epiteeli rakkude diferentseerumiseks on vajalik Wnt/ $\beta$ -kateniini signaalirada, mille puudumisel ei moodustu ühtset ühekihilist epiteelkihti ning läätse posterioorsed rakud pikenevad epiteeli rakkudest mööda ning kinnituvad silma sarvkesta rakkude külge (Stump jt., 2003). Lääts vesiiikuli posterioorsete rakkude pikenedamiseks ja diferentseerumiseks on aga vajalik Fgf ja Bmp signaalide koosmõju, mille vahendusel tagatakse rakkude mitoos, rakutsüklilist väljumine ning diferentseerumiseks vajalike faktorite ekspressioon (Faber jt., 2002; Garcia jt., 2005; Jarrin jt., 2012; Zhao jt., 2008). Lääts rakkude diferentseerumist mõjutav Bmp signaal tuleneb läätse ekvaatorist anterioorselt paiknevast ripskehast ja Fgf signaal pärineb läätsest posterioorselt

paiknevast klaaskehast (Beebe jt., 1980; Zhao jt., 2002). Primaarsete fiibrite pikenemiseks ja diferentseerumiseks on vajalikud geenid *Nf2*, *Maf* ja *Gata3*, milleta hakkavad rakud diferentseerumise asemel jagunema ning ei pikene epiteeli kihi suunas (Maeda jt., 2009; Ring jt., 2000; Wiley jt., 2010).

Bmp ja Fgf signaalid on vajalikud ka lätse sekundaarsete fiibrite diferentseerumiseks lätse epiteeli rakkudest (Boswell jt., 2008; Zhao jt., 2008). Diferentseerumisel toimub fiibrite pikenemine apiko-basaalselt ning migreerumine lätse sisemusse, mida vahendavad rakk-rakk ja rakk-ekstratsellulaarse maatriksi vaheliste kontaktide loomine ja lagundamine koos rakkude aktiini tsütoskeleti pideva reorganiseerumisega (Leonard jt., 2011; Weber ja Menko, 2006). Fgf signaalid ja mitmed teised kasvu faktorid (EGF, PDGF) osalevad aktiini tsütoskeleti reorganiseerumises aktiveerides Rho signaaliraja, mis ka rakkude migratsioonis ja adhesioonis (Maddala jt., 2003). Rho signaaliraja kesksed valgud RhoGTPaasid (Rho, Rac ja Cdc42) on lätstes ja reetinas embrüonaalselt ekspresseeritud (Mitchell jt., 2007). Rho GTPaasid on Ras superperekonda kuuluvad väikesed G-valgud, mis on aktiivsed, kui nad on seotud GTP-ga (guaniini-trifosfaat) ning inaktiivsed kui GTP hüdrolyüsitakse GDP-ks (guaniini-difosfaat) (Braga jt., 1997; Kaibuchi jt., 1999). Sellise Rho GTPaaside aktiivse ja inaktiivse vormide vahetumist katalüüsivad Rho GTPaaside spetsiifilised GEF-d (guaniini nukleotiidivahetusfaktor), mis vahetavad Rho-GDP aktiivseks Rho-GTP-ks ning GDI (GDP dissotsiatsiooni inhibiitor) ja GAP-d (GTPaasse aktiivsuse aktiveerivad valgud), mis indutseerivad GTP lagundamist Rho-GTP-l ja sellega põhjustavad Rho-GDP tekke. Rho GTPaaside *knock-out* hiirtes on lätse areng tugevalt defektne, sest primaarsed ja sekundaarsed fiibrid on lühemad, fiibrite vaheliste ja  $\beta$ -kateniini vahendatud rakk-rakk kontaktide hulk on väiksem, aktiini sisaldub vähem fiibrite anterioorses ja tuuma piirkonnas ning lätstes esinevad vakuoli sarnaseid struktuure (Maddala jt., 2004). Rac1 GTPaasi puudulikud hiired omavad lätse arengus sarnaseid defekte. Nende lätstes on ebanormaalse kujuga ning esinevad häired fiibrite pikenemises ja migratsioonis. Samuti on fiibrites vähenenud aktiini organiseerumine ja polümeriseerumine ning N-kaderiini ja  $\beta$ -kateniini lokaliseerimine rakk-rakk vahelistes kontaktides (Maddala jt., 2011). Rho signaaliradade toimimiseks lätstes on vajalikud ka Rho GTPaaside spetsiifilised GDI-d (GDI $\alpha$ ,  $\beta$  ja  $\gamma$ ), millest RhoGDI $\alpha$  üleekspresseerumisel suureneb Rho GTPaaside paiknemine membraani asemel tsütoplasmas, esinevad defektid fiibrite pikenemises ja migreerumises ning rakkude vahelised vakuoolid (Maddala jt., 2008).

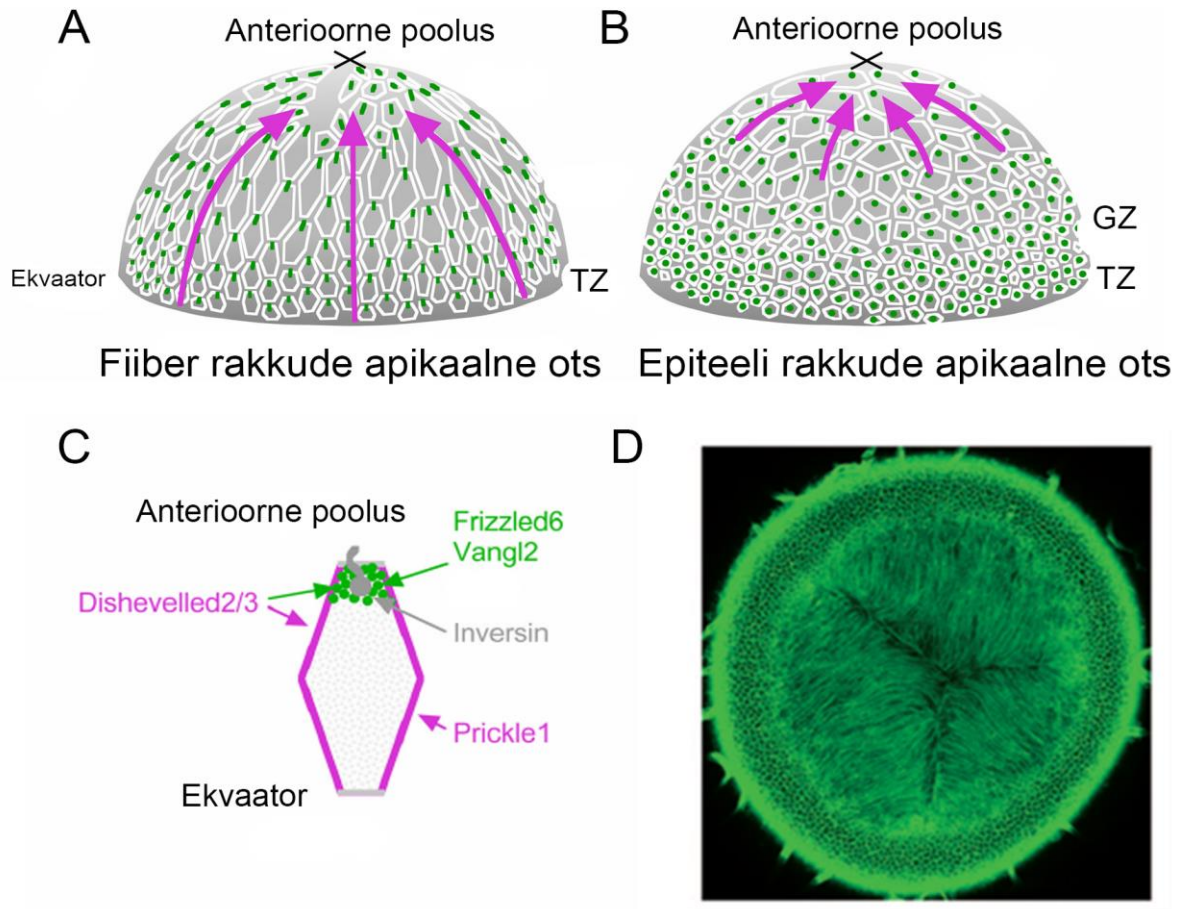
Lätse sekundaarsete fiibrite edasisel diferentseerumisel kaovad kontaktid anterioorselt epiteelirakkudega ning posterioorselt kapsliga ning tekivad uued kontaktid lätse vastasküljelt diferentseerunud rakkudega. Selle protsessi tulemusena tekivad lätse anterioorsele küljele Y-

kujuline struktuur (õmbelus) ja lätse posterioorsele küljele  $\lambda$ -kujuline õmbelus (joonis 3D) (Al-Ghoul jt., 2010). Taoline Y-kujulise õmbeluse olemasolu on iseloomulik hiire lätsele. Inimesel on sünnihetkel Y-kujuline õmbelus, kuid lätse edasise arengu käigus moodustub  $\times$  - kujuline õmbelus (Kuszak jt., 2004). Lätse sekundaarsete fiibrite diferentseerumisel hakatakse rakkude tuumi koos organellidega (Golgi kompleks, mitokondrid, endoplasmaatiline retiikulum) diferentseerumise käigus lagundama nii, et lätse sisemistes rakkudes on tuum täielikult puudu ja sellega tagatakse lätse valgusläbilaskvus (Bassnett jt., 2011; Wride, 2011). Lätse kasvamine ning uute sekundaarsete fiibrite arenemine toimub hiires ja inimeses kogu elu, ehkki fiibrid pakitakse tihedamini kokku, et vältida lätse liigset kasvamist.

### 1.2.3. Rakkude planaarne polaarsus lätstes

Lätse epiteeli (va germinatiiv-tsooni rakud) ja fiiber-rakud omandavad diferentseerudes heksagonaalse rakkude kuju, mis on ühelt poolt rohkem välja venitatud ning suunatud lätse keskele (joonis 3A; 3B). Sellistes lätse rakkudes esineb planaarne polaarsus (PCP – *planar cell polarity*), mille korral on spetsiifilised valgud positsioneeritud raku kindlasse piirkonda (joonis 3A; 3B; 3C). Põhilisteks valkudeks imetajates, mis osalevad rakkude planaarse polaarsuse loomises on FZD3 (*Frizzled 3*) ja FZD6 (*Frizzled 6*), CELSR1-3 (*cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 1-3*), VANGL1-2 (*Van Gogh-like protein 1-2*), DVL1-3 (*Dishevelled 1-3*), PRICKLE1-4 (*Prickle homologue 1-4*), ANKRD6 (*ankyrin repeat domain 6*) ja INVS (*Inversin*) (Singh ja Mlodzik, 2012; Tissir ja Goffinet, 2013; Wallingford, 2012). Lätse polariseeritud epiteeli ja fiiber rakkudes on need valgud paigutatud koos raku tsiiliaga ja selle basaalkehakesega apikaalselt ning olles lokaliseerunud raku kuuenurkse kuju suhtes (joonis 3C). Näiteks asuvad valgud FZD6 ja VANGL2 heksagonaalsete rakkude ainult sellel küljel, mis on suunatud lätse keskele. PRICKLE1 on seevastu paigutatud raku väljavenitatud külgedel ning DVL2, DVL3 asuvad raku kõikides külgedes. Raku tsiilia koos valguga INVS on paigutatud raku sellele küljele, kus asuvad FZD6 ja VANGL2 (Sugiyama jt., 2010). Taoline valkude paigutus rakus pannakse paika mittekanoonilise Wnt/PCP signaaliraja kaudu, kus Wnt retseptor Frizzled interakteerub PCP valkudega, mis on juba paigutatud membraani (VANGL1-3). See põhjustab uues rakus PCP valkude lokaliseerumise raku membraani (Jones ja Chen, 2007; Mayor ja Theveneau, 2014). Aktiveeritud retseptoriga Frizzled seonduvad DVL valgud ning rakus aktiveeritakse Rho GTPaasid, mis osalevad uues rakus tsütoskeleti reorganiseerumises ja PCP loomises (Singh ja Mlodzik, 2012). Wnt/PCP signaaliraja häirete korral või PCP valkude puudumisel ei arene normaalset lätse. Wnt/PCP signaaliraja inhibeerimisel lätstes areneb ebahariliku kujuga lätts, mis sisaldab organiseerimata fiiber rakke, millel ei ole säilinud heksagonaalne kuju ning lätstes

esinevad vakuoolid (Chen jt., 2008). *Vangl2*<sup>-/-</sup> ja *Celsr1*<sup>-/-</sup> hiirtes ei kujune normaalse kujuga läätse ning fiibritest ei moodustu Y-kujulist õmblust (Sugiyama jt., 2010).



**Joonis 3. Rakkude planaarse polaarsus läätstes ja sellest põhjustatud Y-kujuline struktuur läätse fiiber rakkudes.** (A) Läätse fiiber-rakkude planaarse polaarsus, mille korral on raku tsiilia paigutunud rakud läätse anterioorse pooluse suunas (punased nooled). (B) Läätse epiteeli rakkude planaarse polaarsus alates germinatiiv tsoonist (GZ), mille korral ei ole ainult ülemineku tsoonis (TZ) paiknevad rakud planaarselt polariseeritud. (C) Läätse raku heksagonaalne kuju ja raku paiknevate valkude polariseeritus. (D) Läätstes esinev Y-kujuline struktuur (modifitseeritud Sugiyama jt., 2011; Sugiyama jt., 2010 järgi).

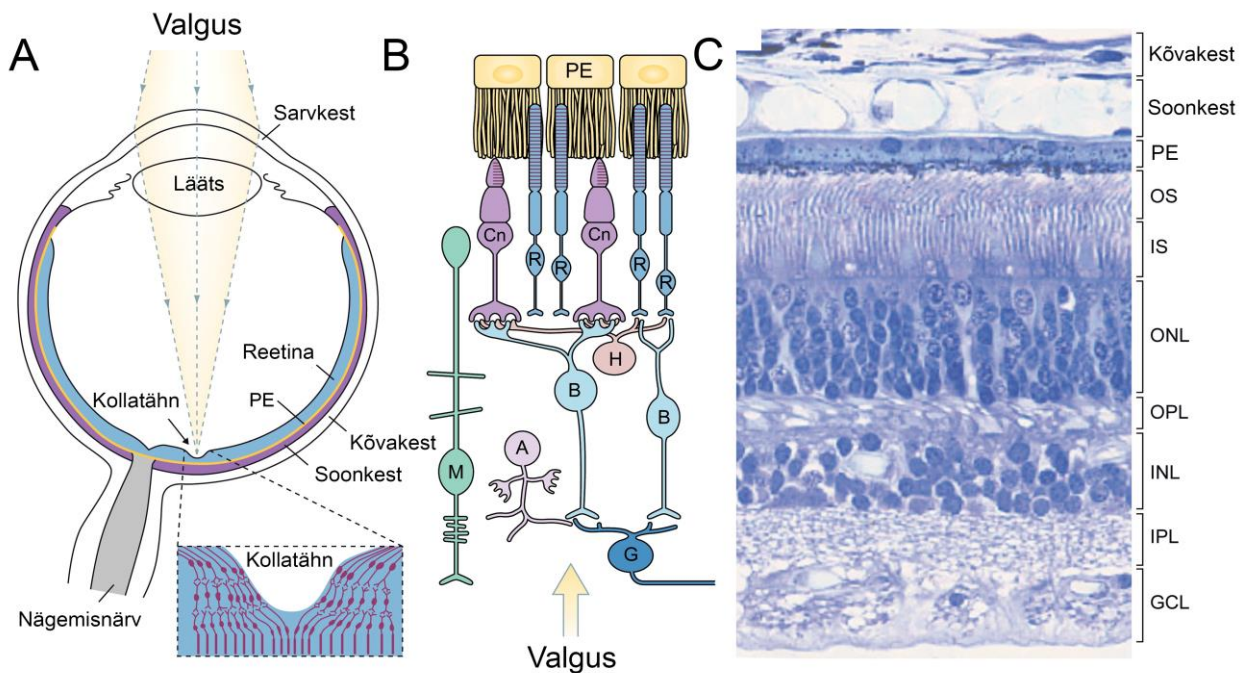
### 1.3. Reetina areng

#### 1.3.1. Reetina arenemine silmakarikast

Silma võrkkest on silma sisemine neuraalne kude, mis saab alguse silmkarika sisemisest kihist. Embrüonaalselt (E10.0) on reetina epiteel pseudomitmekihiline, sisaldades ainult reetina multipotentseid eellasrakke (joonis 4A). Eellasrakud läbivad interkineetilise tuumade liikumise, mille korral paiknevad tuumad sõltuvalt rakutsükli faasist epiteeli apiko-basaalsel teljel erinevas positsioonides. S-faasis olevate eellasrakkude tuumad paiknevad epiteeli basaalsemas osas tulevase klaaskeha lähedal. M-faasis olevate rakkude tuumad on epiteeli

apikaalsemas osas, mis piirneb pigmentepiteeliga. G1 ja G2-faasis olevate rakkude tuumad paiknevad epiteeli keskmises osas (Baye ja Link, 2008). Silmakarikas olevad eellasrakud annavad aluse kõikidele täiskasvanud reetinas olevatele rakkudele.

Täiskasvanud reetinas on kuute tüüpi rakke, mis asuvad erinevates reetina kihtides ning omavad erinevaid funktsioone (joonis 4B; 4C). Nendeks rakkudeks on ganglioni rakud, amakriinrakud, horisontaalrakud, bipolaarsed rakud, Mülleri gliia ja fotoretseptorid, mille hulka kuuluvad kepikesed ja kolvikesed (joonis 4B) (Jeon jt., 1998; Masland, 2001). Ganglioni rakkude tuumad paiknevad ganglionaarkihis, mis on kõige varem moodustuv reetina kiht. Amakriinrakkude, horisontaalrakkude, bipolaarsete rakkude ja Mülleri gliia rakkude tuumad paiknevad sisemises tuumade kihis ning fotoretseptorite tuumad asuvad välimises tuumade kihis. Kolme tuumi sisaldavate kihtide vahel asuvad sisemine ja välimine põimikkiht, kus asuvad reetina rakkude vahelised sünapsid (Jeon jt., 1998; Sung ja Chuang, 2010).



**Joonis 4. Täiskasvanud selgroogse silma ja reetina ehitus.** (A) Täiskasvanud isendi silma ehitus koos kollatähni piirkonnaga reetinas, kuhu fookuseeritakse läbi sarvkesta ja läätsse murduv valgus ning kus saadakse kõige teravam nägemispilt. (B) Arenenud reetinas eristuvad rakutüübid ja nende omavahelised sünapsid. (C) Täiskasvanud reetinas esinevad reetina kihid koos silma soon- ja kõvakestaga. Lühendid: Cn – kolvikesed, R – kepikesed, H – horisontaalrakud, A – amakriinrakud, M – Mülleri gliia, G – ganglioni rakud, B – bipolaarsed rakud, ONL – välimine tuumade kiht, OPL – välimine põimikkiht, OS – fotoretseptorite välimine segment, GCL – ganglionaarkihit, ILM – sisemine piirikiht, INL – sisemine tuumade kiht, IPL – sisemine põimikkiht, IS – fotoretseptorite sisemine segment, PE - pigmentepiteel (modifitseeritud Sung ja Chuang, 2010 järgi).

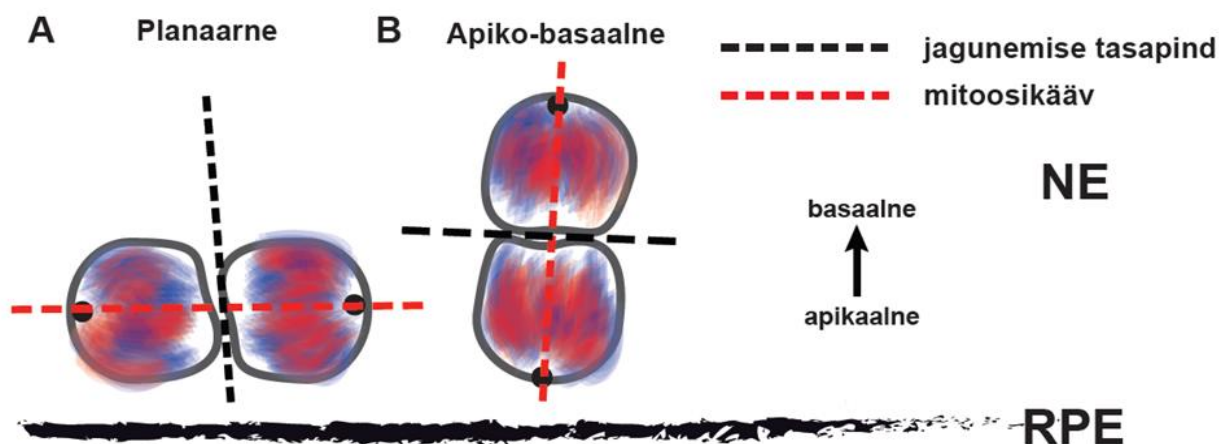
Reetina kihid hakkavad moodustuma arengu käigus reetina basaalsemast osast, nii et reetina ganglionaarkiht moodustub kõige esimesena. Samal ajal kõik ülejäänud reetina eellasrakud ning diferentseeruma hakanud rakud koos neuroblastilises kihis. Ganglioni rakkude sünapside tekkimisega moodustub amakriinrakkude ja bipolaarsete rakkude vahele sisemine põimikkiht ning hakkab eristuma ka sisemine tuumade kiht. Varsti eristuvad ka välimine põimikkiht ja välimine tuumade kiht. Seega, moodustuvad erinevad reetina rakutüübid kindlal reetina arengu perioodil.

Silmakarika staadiumis jagunevad reetina eellasrakud alguses sümmeetriliselt andes aluse kahele uuele eellasrakule. Umbes E11.0 hakkavad osa eellasrakkudest läbima terminaalset mitoosi, tekivad G0-faasis olevad rakud, mis hakkavad diferentseeruma ganglioni rakkudeks ning migreeruma reetina basaalsemasse ossa pannes aluse reetina ganglionaar kihile. Ganglioni rakud ongi esimene rakutüüp, mis hakkavad diferentseeruma. Paar päeva hiljem hakkavad eellasrakkudest moodustuma amakriinrakud, horisontaalrakud ja kolvikesed. Hiljem tekivad reetina bipolaarsed rakud kepikesed ja Mülleri gliia rakud (Zhang jt., 2011). Taoline reetina rakutüüpide järjestikune arenemine on põhjustatud reetina eellasrakkudes ekspresseeritavatest TF-dest, mis määravad raku saatuse. Näiteks ekspresseeritakse reetina eellasrakkudes spetsiifilisi faktoreid, mis põhjustavad raku diferentseerumist just ganglioni rakuks. Selleks on vajalik Math5 ekspressioon E11.0 reetina eellasrakkudes, mis määrab nende kompetentsuse areneda ganglioni rakkudeks, kuid ei ole piisav ganglioni rakkude lõplikuks diferentseerumiseks (Brzezinski jt., 2012; Prasov ja Glaser, 2012; Yang jt., 2003). Math5 mõjutab ka teiste rakutüüpide arenguks vajalike TF-de ekspressiooni, mida on näidatud Math5 puudulikes reetimates, kus ganglioni rakke ei moodustu peaaegu üldse ning on suurenenud teiste rakutüüpide areng ja hulk (Brown jt., 2001; Brzezinski jt., 2012; Feng jt., 2010; Wang, 2001). Ganglioni rakkude diferentseerumiseks on lisaks vajalik Pou4f2 (Brn3b) ja Isl1 ekspressioon, mis interakteeruvad ning indutseerivad teiste ganglioni rakkude diferentseerimiseks vajalike geenide nt *Tbr2*-e ekspressiooni ja ennetavad amakriinrakkude arenemist inhibeerides *Dlx1* ja *Dlx2* ekspressiooni (Feng jt., 2011; Fu jt., 2009; Li jt., 2014; Mao jt., 2008; Mu jt., 2008). Kõikide reetina rakutüüpide diferentseerumiseks on vajalikud erinevate TF-ite ekspressioon. Amakriinrakkude diferentseerumiseks on vajalik TF-ite Math3, NeuroD, Pax6 ja Six3 ekspressioon reetinas, mille puudumisel amakriinrakke ei arene (Inoue jt., 2002). Horisontaalrakkude diferentseerumises osalevad TF-d Onecut1 ja Ptf1a, mis koos aktiveerivad Prox1 ja Lim1 ekspressiooni (Dyer jt., 2003; Lelievre jt., 2011; Suga jt., 2009; Wu jt., 2013). Bipolaarsete rakkude puhul on vajalik Math3 ja Mash1 ko-ekspressioon (Hatakeyama jt., 2001). Reetina Mülleri gliia rakkude diferentseerumiseks on vajalikud Sox8 ja Sox9 (Muto jt.,

2009). Fotoretseptorite diferentseerumiseks on vajalik mitmete geenide koostoime. Otx2, Ror $\beta$  ja Crx ekspressioon on vajalik nii kolvikeste kui ka kepikete arenemiseks (Nishida jt., 2003). Spetsiaalselt kepikete diferentseerumiseks on vajalik Nr1 ja Nr2e3 ekspressioon ja kolvikeste korral Rora ekspressioon (Swaroop jt., 2010).

### 1.3.2. Reetina eellasrakkude jagunemine

Reetina erinevate rakutüüpide arenemise kindlustamiseks on vajalik erinevate TF-ite kindel ajaline ekspressiooni aga ka jagunevate eellasrakkude õige mitoosikävi orientatsioon ja sellest tulenevalt rakkude asümmeetriline ning sümmeetriline jagunemine. Reetina eellasrakud jagunevad reetina varajase arengu perioodil sümmeetriliselt, andes aluse kahele uuele eellasrakule ja suurendades nii reetina eellasrakkude hulka. Eellasrakkude jagunemised muutuvad asümmeetriliseks, kui esimesed rakud hakkavad väljuma rakutsüklist ning diferentseeruma kindlateks reetina rakutüüpideks. Asümmeetrilise jagunemise korral tekib raku jagunemisel üks postmitootiline rakk ja üks eellasrakk või kaks erinevat postmitootilist rakku, mis diferentseeruvad erinevateks rakutüüpideks (Cayouette, 2003; Kechad jt., 2012). Taoline asümmeetriline rakkude jagunemine aitab säilitada eellasrakkude populatsiooni ning samal ajal toota erinevaid rakutüüpe samal ajal. Reetina hilisema arengu käigus vähenevad uuesti asümmeetriliste jagunemiste hulk ning suurenevad sümmeetrilised jagunemised, millega toodetakse kaks ühesuguseks rakutüübiks diferentseeruvat postmitootilist rakku, et toota lühikese ajaga piisav hulk rakke kõikidest eellasrakkudest (Cayouette, 2003; Livesey ja Cepko, 2001). Asümmeetrilised jagunemised on tavaliselt epiteeli suhtes apiko-basaalsed ehk vertikaalsed jagunemised, mille korral on mitoosikäiv paigutatud risti epiteeliga (joonis 5B). Sümmeetrilised on aga planaarsed jagunemised, kui mitoosikäiv asetseb paralleelselt epiteeliga (joonis 5A). Asümmeetrilise ja sümmeetrilise jagunemise otsustab jaguneva raku mitoosikävi orientatsioon, mis põhjustab raku saatust määravate determinantide erineva jagunemise kahe tütaraku vahel. Reetina puhul on näidatud, et osa rakke jaguneb apiko-basaalselt ja raku saatust määrava valgu Numb-i pärib ainult apikaalselt positsioneeritud tütarakk (Cayouette, 2003; Cayouette jt., 2001; Dooley jt., 2003; Kechad jt., 2012; Tibber jt., 2006). Numb inhibeerib Notch signaali, mille tõttu ei ole inhibeeritud apikaalselt paiknevas tütarakus proneuraalsete geenide ekspressioon ning apikaalne tütarakk diferentseerub neuroniks, samas kui teises tütarakus, mis ei ole Numb-i pärinud säilib Notch-i signaal ning tütarakk jääb eellasrakuks (Clark jt., 2012; Das ja Storey, 2012; Dave jt., 2011; Formosa-Jordan jt., 2013; Imayoshi jt., 2013; Spana ja Doe, 1996).



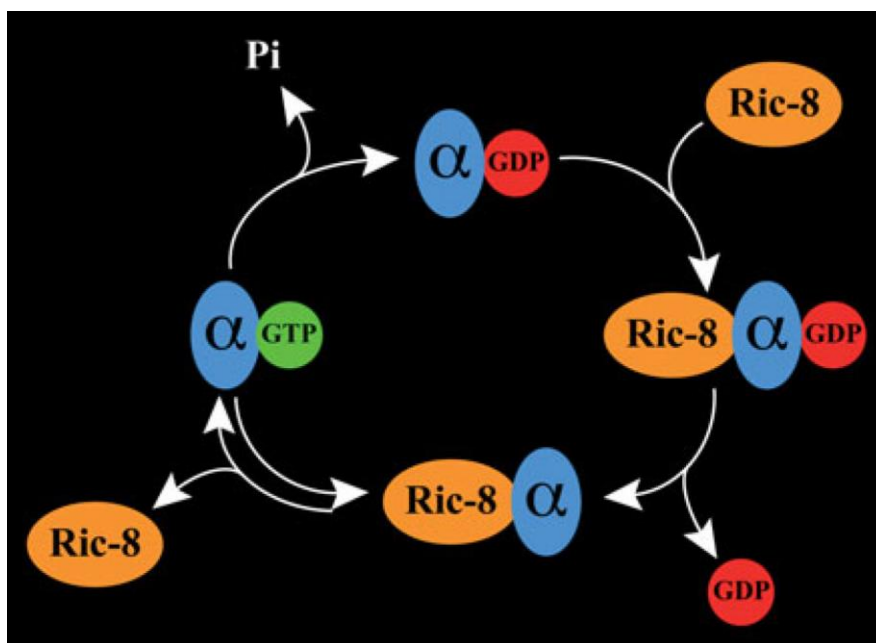
**Joonis 5. Reetina neuroepiteelis apikaalses osas esinevad rakkude jagunemised.** (A) Planaarne raku jagunemine, mille korral on mitoosikäävi orientatsioon paralleelne reetina pigmentepiteeliga (RPE). (B) Apiko-basaalne ehk vertikaalne raku jagunemine, mille korral on mitoosikäävi orientatsioon risti pigmentepiteeliga. Lühend: NE – neuroepiteel.

Raku jagunemisel pannakse mitoosikäävi orientatsioon paika läbi interaktsioonide, mis toimuvad mitoosikäävi ja raku korteksis olevate valkude vahel. Mitoosikäävi moodustavad tsentrosoomid on raku korteksiga ühenduses läbi astraalsete mikrotuubulite, mis kinnituvad raku korteksis olevatele valkudele. Raku korteksis vahendavad astraalsete mikrotuubulite kinnitumist valkudest Par3, Par6 (*partitioning defective protein 3 and 6*) ja aPKC (*atypical protein kinase C*; ebatüüpiline proteiinkinaas C) koosnev Par3-Par6-aPKC kompleks (Afonso ja Henrique, 2006; Cappello jt., 2006). Raku korteksis paikneb ka teine valkude kompleks. Raku membraaniga on seotud GDP seoseline G-valgu  $\alpha$ -subühik  $G_{\alpha i}$ -GDP, mis on võimeline seonduma valguga LGN (*Leu-Gly-Asn Repeat-Enriched Protein*) ning see omakorda valguga NuMa (*Nuclear Mitotic Apparatus*) (Du ja Macara, 2004; Jia jt., 2012).  $G_{\alpha i}$ -GDP-LGN-NuMa kompleksid seonduvad läbi NuMa astraalsete mikrotuubulitel olevatele Düneiini-Dünaktiini kompleksidele, mis on võimelised tõmbama astraalseid mikrotuubuleid ning sellega ka kogu mitoosikäävi (Kotak jt., 2012). Planaarse jagunemise korral on astraalsed mikrotuubuleid kinnitunud lateraalselt paiknevale  $G_{\alpha i}$ -GDP-LGN-NuMa kompleksile. Apiko-basaalse jagunemise korral on  $G_{\alpha i}$ -GDP-LGN-NuMa võimeline moodustuma kompleksi raku apikaalsel poolel ning moodustama uue kompleksi koos Par3-Par6-aPKC läbi valgu mInsc (*mammalian Inscuteable*), mis on seondunud valkudega Par3 ja LGN (Peyre jt., 2011; Postiglione jt., 2011; Yuzawa jt., 2011; Zheng jt., 2010; Zhu jt., 2011). Sellega tõmmatakse astraalseid mikrotuubuleid raku apikaalse poole suunas ning mitoosikäävi asetus muutub vertikaalseks. Valgu mInsc puudumisel reetina eellasrakkudest on häiritud mitoosikäävi orientatsiooni

regulatsioon ning apiko-basaalsed jagunemised puuduvad ning reetinas on suurenenud bipolaarsete rakkude hulk ja vähenenud fotoretseptorite arv (Zigman jt., 2005).

#### 1.4. RIC8

RIC8 (*Resistant to Inhibitors of Cholinesterase 8*) on guaniini nukleotiidivahetusfaktor (GEF - *guanine nucleotide exchange factor*) imetajate heterotrimeersetele G-valgu  $\alpha$ -subühikutele ( $G\alpha$ ), mis kuuluvad perekonda  $G_{\alpha i}/G_{\alpha o}$ ,  $G_{\alpha q}/G_{\alpha 11}$  ja  $G_{\alpha 12}/G_{\alpha 13}$  (Nishimura jt., 2006; Tall jt., 2003). Tegemist on 63 kDa suuruse valguga, mis on võimeline aktiveerima guaniini nukleotiidi siduva G-valgu  $\alpha$ -subühiku ning samas käituma ka G-valkude  $\alpha$ -subühikute *chaperonina* (Gabay jt., 2011; Miller jt., 2000). G-valgu  $\alpha$ -subühikud on inaktiivses vormis seotud GDP-ga ning moodustuvad kahe teise G-valgu subühikuga  $G\beta$  ja  $G\gamma$  subühikutega heterotrimeerse  $G\alpha\beta\gamma$  kompleksi. Antud kompleks on seotud G-valk seoselise retseptoriga (GPCR – *G protein coupled receptor*), mis ligandi seondumisel aktiveerub ning katalüüsib  $G\alpha$  subühikul GDP vahetumist GTP-ks. Nukleotiidi vahetus aktiveerib  $G\alpha$  subühiku ning põhjustab heterotrimeerse kompleksi lagunemist ja  $G\alpha$ -GTP ja  $G\beta\gamma$  vabanemist GPCR-i küljest (Wettschureck ja Offermanns, 2005). Aktiivne  $G\alpha$ -GTP omab GTPaasset aktiivsust, mis põhjustab GTP hüdrolyüüsi GDP-ks. Seda põhjustavad ka spetsiaalsed RGS (*Regulators of G-protein signaling*) perekonda kuuluvad valgud, mis funktsioneerivad, kui GTPaasse aktiivsuse aktiveerivad valgud (GAP – *GTPase activating proteins*) (Hess jt., 2004). Tekkiv inaktiivne  $G\alpha$ -GDP on uuesti võimeline moodustama heterotrimeerse kompleksi koos  $G\beta\gamma$ -ga ning seonduma GPCR-ga. RIC8 on võimeline retseptorist sõltumatult stimuleerima  $G\alpha$ -GDP kompleksi lagundamist, et saaks seonduda GTP-d ning seega ennetada  $G\alpha$  seondumist tagasi retseptorile. Aktiivne  $G\alpha$ -GTP kompleks, aktiveerib rakus omakorda sihtmärkvalke ja edastab sellega retseptorilt saadud signaali. Seega on RIC8 võimeline seda signaali pikendama ja võimendama (Fenech jt., 2009; Miller jt., 2000) (joonis 6). Näiteks on RIC8 vajalik  $G_{\alpha q}$  vahendatud MAPK/ERK signaaliraja aktiveerimises, mis on vajalik  $Ca^{2+}$  kontsentratsiooni tõusuks rakus (Nishimura jt., 2006). Peale G-valkude GEF-na on RIC8 ka G-valkude  $\alpha$ -subühikute *chaperon* ennetades nende translatsiooni järgset lagundamist ning osaleb nende esialgsel pakkimisel ja seondumisel rakusisestele membraanidele (Gabay jt., 2011).



**Joonis 6. RIC8 vahendatud G-valgu  $\alpha$ -subühiku  $G\alpha$  ( $\alpha$ ) GDP ja GTP tsüklil. RIC8 seondub GDP seoselise  $G\alpha$ -ga  $G\alpha$ -GDP ja katalüüsib GDP eraldumist  $G\alpha$  küljest ja GTP seondumist. Moodustub  $G\alpha$ -GTP kompleks ja RIC8 eraldub.  $G\alpha$  GTPaasse aktiivsuse tõttu GTP hüdrolüüsitakse GDP-ks ning eraldub fosfaatrühm (Pi) (modifitseeritud Tall, 2013 järgi).**

RIC8 omab G-valkude GEF-na ja *chaperonina* olulist rolli G-valkude vahendatud signaalides ja protsessides (Fenech jt., 2009; Nishimura jt., 2006). RIC8 on vajalik raku jagunemisel õige mitoosikäavi orientatsiooni kindlustamises, viies  $G_{\alpha i}$ , LGN-i, NuMa ja Düneiini raku jagunemisel korteksisse ning vahendab  $G_{\alpha i}$ -GDP-LGN-NuMa kompleksi moodustumist, sest tagab pideva GDP ja GTP muutuse  $G_{\alpha i}$  subühikul, mistõttu viib kompleks laguneb ühes kohas ning moodustub uuesti teises kohas, põhjustades sellega ka mitoosikäavi orientatsiooni muutuse (Couwenbergs jt., 2004; David jt., 2005; Hampoelz jt., 2005; Hess jt., 2004; Tall ja Gilman, 2005; Wang jt., 2005; Woodard jt., 2010). RIC8 puudumisel on häiritud rakkude asümmeetriline jagunemine, mis on põhjustatud mitoosikäavi valest paigutusest jagunevas rakus (Afshar jt., 2004). RIC8 on vajalik ka rakkude migratsioonis, raku-maatriksi vahelises adhesioonis ja aktiini tsütoskeleti organiseerumises (Peters ja Rogers, 2013). RIC8 puudumisel on häiritud neuraalharja rakkude migratsioon ning väheneb rakus fokaalsete adhesiooni komplekside hulk (Fuentealba jt., 2013). Äädikakärbse (*Drosophila melanogaster*) gastrulatsioonis on RIC8 tarvilik aktiini lokaliseerimisele raku korteksisse, et toimiks ventraalsete rakkude normaalne invagineerumine (Kanesaki jt., 2013).

RIC8 võimaliku rolli on uuritud ka närvisüsteemi arengus. RIC8 puudumine *Ric8<sup>-/-</sup>* hiires põhjustab nende suuremise juba gastrulatsioonis (Tonissoo jt., 2010). Postmitootiliste neuronite spetsiifilise *Ric8* konditsionaalse hiireliiniga on näidatud, et RIC8 puudumine

neuronitest põhjustab neuromuskulaarseid defekte, mille korral esinevad hiirtel näiteks tahtmatud lihaste kokkutõmbed. Samuti esineb neil hiirtel skeletilihaste atroofia, südamelihase hüpoplaasia ning antud defektide tõttu surevad nad varsti pärast sündi (Ruisu jt., 2013). Samuti on uuritud RIC8 rolli väikeaju kihtide moodustumises, kus *Ric8* puudumisel on häiritud väikeaju granulaarrakkude migratsioon ning Bergmanni gliia ja basaalmembraani vaheline adhesioon (Ma jt., 2012). Silma arengus ei ole RIC8 rolli uuritud. Varasemalt on näidatud, et RIC8 ekspresseerub täiskasvanud hiire reetina rakkudes, eriti just fotoretseptorite sisemises segmendis. Ühtlasi on RIC8 ekspressiooni kirjeldatud ka hiire embrüonaalses retinogeneesis, kus RIC8 on vanuses E12.5 ekspresseeritud neuroepiteelis ning reetina arengu jooksul laieneb tema ekspressioon ka närvikiudude kihti, ganglionaarkihti ning sisemisse põimikkihti (Tikker, 2011).

## 2. EKSPERIMENTAALNE TÖÖ

### 2.1. Töö eesmärgid

- Teha kindlaks *Ric8* ekspressioon arenevas hiire läätstes
- Iseloomustada *NestinCre* transgeeni ekspressiooni silma arengus E9.5-E14.5
- Kirjeldada läätse morfoloogiat, rakkude planaarseid polariseeritust ja läätse sekundaarseid fiibreid *Ric8* konditsionaalses *NestinCre;Ric8<sup>lacZ/lox</sup>* hiireliinis
- Kirjeldada *NestinCre;Ric8<sup>lacZ/lox</sup>* hiirte reetinas jagunevate eellasrakkude mitoosikäävi orientatsiooni vanuses E14.5
- Iseloomustada vastsündinud (P0) *NestinCre;Ric8<sup>lacZ/lox</sup>* hiirtel reetina morfoloogiat ja rakutüüpide kujunemist

### 2.2. Materjal ja meetodika

#### 2.2.1. Kasutatud hiireliinid, nende ristamine ja genotüüpiseerimine

Käesolevas magistritöös kasutati järgnevaid hiireliine:

*NestinCre<sup>+/-</sup>* – Cre-rekombinaasi sisaldav hiireliin, kus Cre-rekombinaasi ekspressioon on indutseeritud intermediaalse filamentse valgu NESTIN-i promootori poolt

*Ric8<sup>LacZ/+</sup>* – *Ric8* heterosügootne hiireliin, kus *lacZ* reportergeeni ekspressioon on kontrollitud *Ric8* promootori poolt. RIC8 valku antud alleelilt ei kodeerita (Tonisoo jt., 2006)

*Ric8<sup>lox/lox</sup>* – *loxP* (*locus of X-over P1*) saite sisaldav hiireliin, mille korral on *loxP* saidid paigutatud *Ric8* mõlema alleeli järjestusse. Mõlemalt alleelilt kodeeritakse funktsionaalne RIC8 valk (Ruisu jt., 2013)

**R26R** – *lacZ* reportergeeni sisaldav hiireliin, mis võimaldab kindlaks teha koospetsiifilise Cre-rekombinaasi ekspressiooni, sest *lacZ* järjestuse ees paikneb *loxP-STOP-loxP* järjestus, mis eemaldatakse Cre-rekombinaasi olemasolu korral (Soriano, 1999)

Antud magistritöös on kasutatud *Ric8* konditsionaalset hiireliini *NestinCre;Ric8<sup>lacZ/lox</sup>*, kus *Ric8* on spetsiifiliselt neuraalsetest eellasrakkudes tänu *NestinCre*-rekombinaasile välja lülitatud (Gilyarov, 2008). Varasemalt on kindlaks tehtud, et *NestinCre;Ric8<sup>lacZ/lox</sup>* hiired surevad varsti pärast sündi (Kask, 2010). Seega kasutati antud töös RIC8 funktsiooni uurimiseks reetinas ja läätstes embrüonaalseid (E14.5) ja vastsündinud (P0) *NestinCre;Ric8<sup>lacZ/lox</sup>* hiiri.

*NestinCre;Ric8<sup>lacZ/lox</sup>* hiireliini loomiseks kasutati hiireliine *NestinCre<sup>+/-</sup>*, *Ric8<sup>lacZ/+</sup>* ja *Ric8<sup>lox/lox</sup>*. Alustuseks ristati omavahel isane *NestinCre<sup>+/-</sup>* hiir ja emane *Ric8<sup>lacZ/lox</sup>*, mis andis järgneva genotüübiga hiired:

$$\begin{aligned} & \underline{\sigma NestinCre^{+/-} \times \text{♀ Ric8}^{lacZ/+}} \\ & \frac{1}{4} NestinCre^{+/-}; Ric8^{lacZ/+} \\ & \frac{1}{4} NestinCre^{-/-}; Ric8^{lacZ/+} \\ & \frac{1}{4} NestinCre^{+/-}; Ric8^{+/+} \\ & \frac{1}{4} NestinCre^{-/-}; Ric8^{+/+} \end{aligned}$$

Edasi kasutati isaseid *NestinCre<sup>+/-</sup>;Ric8<sup>lacZ/+</sup>* genotüübiga hiiri, kes ristati emaste *Ric8<sup>lox/lox</sup>* hiirtega ning saadi antud genotüüpidega järglased:

$$\begin{aligned} & \underline{\sigma NestinCre^{+/-}; Ric8^{lacZ/+} \times \text{♀ Ric8}^{lox/lox}} \\ & \frac{1}{4} NestinCre^{+/-}; Ric8^{lacZ/lox} \quad (CKO) \\ & \frac{1}{4} NestinCre^{-/-}; Ric8^{lacZ/lox} \quad (LM) \\ & \frac{1}{4} NestinCre^{+/-}; Ric8^{lacZ/+} \quad (LM) \\ & \frac{1}{4} NestinCre^{-/-}; Ric8^{lacZ/+} \quad (LM) \end{aligned}$$

Saadud pesakond sisaldas *Ric8* konditsionaalseid *knock-out* hiiri *NestinCre<sup>+/-</sup>;Ric8<sup>lacZ/lox</sup>* (edaspidi nimetatud *CKO* (*conditional knock-out*)) ja tema pesakonnakaaslasi *LM* (*littermate*), keda kasutati katsetes kontrollidena.

*NestinCre* ekspressiooni kirjeldamiseks silma arengus kasutati *NestinCre<sup>+/-</sup>;R26R* hiiri, mis saadi *NestinCre<sup>+/-</sup>* ja *R26R* hiireliinide omavahelisel ristamisel:

$$\begin{aligned} & \underline{\sigma NestinCre^{+/-} \times \text{♀ R26R}} \\ & \frac{1}{2} NestinCre^{+/-}; R26R \\ & \frac{1}{2} NestinCre^{-/-}; R26R \end{aligned}$$

Hiireliinide genotüüpiseerimiseks kasutati järgmisi praimereid:

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

NestinEn3: 5' CCTCCATCCCAGACAAATACATTAC 3'

NestinEn5: 5' CTTGGCTTTGTA CTTTCTGTGACTG 3'

*Ric8<sup>lacZ/lox</sup>*:

LacZ300: 5' CGCATCGTAACCGTGCATCT 3'

RicPTGgenoF: 5' CTCTCCCAGCATCCCTCAC 3'

PTGinRev1: 5' CAC ACC CCA GCC GAG TTG 3'

*Ric8<sup>lox/lox</sup>*.

RicCregenof 5' GGTAGGGCTCAATGTTGG 3'

RicCregenor 5' GCCAAACAATCTCTCGAACC 3'

Antud praimeritega viidi läbi alleel-spetsiifiline PCR-i (*polymerase chain reaction*) reaktsioon, mis sisaldas 1xreaktsioonipuhvrit B (Solis Biodyne), 0,2mM dNTP nukleotiidide segu (Invitrogen), 2mM MgCl<sub>2</sub> (Fermentas), 0,3μM vastavaid primereid, 0,02U/μl Taq polümeraasi ja 1μl genoomset DNA-d. Genoomne DNA eraldati postnataalsete hiirte puhul sabaotsa koematerjalist, embrüote puhul rebukotist. Koematerjal lüüsi üleöö 56°C juures 1xreaktsioonipuhvris B (Solis Biodyne), mis sisaldas 187ng/μl proteinaas K-d (Fermentas). Järgmisel päeval proteinaas K inaktiveeriti 95°C juures 20 minutit.

Kasutatud PCR-i programm:

95°C 5 minutit	} 32 tsüklit
95°C 30 sekundit	
58°C 40 sekundit	
72°C 1 minut	
72°C 10 minutit	

### 2.2.2. Embrüote dissekteerimine ja parafiinlõikude valmistamine

Immunohistokeemiliste katsete läbiviimiseks kasutati parafiinlõike, mis valmistati E14.5 ja P0 vanustest hiirtest. E14.5 vanused embrüod eemaldati emakast ning puhastati ekstra embrüonaalsetest kudedest 1xPBS-s. Seejärel embrüod fikseeriti 4%-lises PFA (paraformaldehüüd)/1xPBS-i lahusega toatemperatuuril 2 tundi. P0 vanused hiired dekapiteeriti. Pea küljest eemaldati üleliigne nahk ja aju. Järelejäänud koljut, mis sisaldas mõlemat silma, pesti 1xPBS-ga ning fikseeriti 4%-lise PFA/1xPBS-i lahusega 4 tundi. Pärast fikseerimist käsitleti E14.5 vanuseid embrüoid ja P0 vanuselt hiirelt saadud koljut sarnaselt. Embrüod ja koljud pesti 3 x 30 minutit 1xPBS-ga ja viidi 50%-lisse etanooli, milles inkubeeriti neid 24 tundi. Järgnevalt muudeti iga 24 tunni möödudes etanooli kontsentratsiooni lahuses vastavalt 70%, 80%, 90%, 96% ja 100%. Pärast inkubeerimist 100%-lise etanooliga viidi koed üle ksüleeni, kus neid hoiti 2 tundi, pärast mida vahetati see puhta ksüleeni lahuse vastu ning inkubeeriti uuesti 2 tundi. Pärast ksüleeni töötlemist viidi koed 65°C-sse parafiini 3 tunniks. Seejärel viidi koed puhtasse parafiini ning inkubeeriti uuesti 3 tundi. Koed positioneeriti parafiinis ning parafiin jahutati 0°C juurde kasutades Microm AP280 1-3 masinakomplekti. Koed lõigati soovitud orientatsioonis kasutades mikrotoome Microm HM200 ja Thermo

Scientific HM335S-i. E14.5 vanustest embrüotest lõigati 8µm paksused lõigud, koljudest lõigati 6µm ja 8µm paksused lõigud, mis asetati polülüsiiniga kaetud klaasidele (Thermo Scientific) ning säilitati 4°C juures.

### 2.2.3. Kudedest totaalse RNA eraldamine

*Ric8* suhtelise mRNA ekspressiooni taseme tuvastamiseks *CKO* ja *LM* hiirtes viidi läbi kvantitatiivne reaalaaja PCR (qRT-PCR). Selleks eraldati E18.5 vanustest hiire embrüotest reetina ja läätseid. Koed asetati 1,5 ml tuubidesse ning neile lisati 1ml TRIzol reagenti (Life Technologies). Segu homogeniseeriti Ultra-Turrax T8-ga (IKA) ning lasti seista 5 minutit toatemperatuuril. Lahusele lisati 200µl kloroformi, segati korralikult kallutades tuubi umbes 15 sekundit ning lasti seista kolm minutit. Faaside eraldamiseks tsentrifuugiti koelüsaate 12000x g 15 minutit (Biofuge pico, Heraeus Instruments), pärast mida, eemaldati pealmine RNA-d sisaldav vesifaas ning tõsteti puhtasse tuubi. RNA sadestamiseks lisati 500µl 100% isopropanooli ja lasti seista 15 minutit toatemperatuuril ning tsentrifuugiti 12000x g 10 minutit. RNA sade pesti 1ml 75%-lise etanooliga, segati vorteksil ja tsentrifuugiti uuesti 7500x g 5 minutit. Saadud sade kuivatati õhu käes ja lahustati DEPC vees. Eraldatud totaalse RNA kogus tehti kindlaks Nanodropiga 8000 (Thermo Scientific).

### 2.2.4. cDNA süntees totaalsest RNA-st

Totaalsest RNA-st komplementaarse DNA (cDNA – *complementary DNA*) sünteesiks kasutati 5µg reetina ning 1µg läätsest eraldatud totaal-RNA-d. Praimerite seondumine selles sisalduvale mRNA-le viidi läbi reaktsioonisegus, mis sisaldas lisaks totaalsele RNA-le veel 5µM oligo(dT)<sub>20</sub> (Invitrogen), 1mM dNTP mix (Invitrogen) ning DEPC-vett (Invitrogen), millega oli reaktsioonimaht viidud 10µl-ni. Reaktsioon toimus 65°C juures 5 minutit, pärast mida hoiti segu 1 minut jääl. Samal ajal valmistati cDNA sünteesi segu (1xRT puhver; 10mM MgCl<sub>2</sub>; 20mM DTT (ditiotreitol); RNAasi inhibiitor (Promega) (4U/µl); Superscript III RT (20U/µl)) (Invitrogen) ning lisati 10µl valmistatud segu RNA lahusele. Uus reaktsioon viidi läbi 50°C juures ning kestis 50 minutit. Reaktsioon peatati hoides segu 85°C juures 5 minutit. Saadud cDNA säilitati -20°C juures.

### 2.2.5. Kvantitatiivne reaalaaja PCR (qRT-PCR)

*Ric8* mRNA hulga kindlaks tegemiseks uuritavates kudedes kasutati kvantitatiivset reaalaaja PCR-i. Selleks kasutati spetsiifilisi *Ric8* praimereid exon4 (5'-GAG GAG TTC CAC GGC CAC A-3') ja exon6 (5'-CTT CAG CCT GTG GGT CTG GTG-3'). Kontrollina kasutati *Hprt* (hüpoksantiini guaniini fosforibosüül transferaas) geeni mRNA hulka ja praimereid *hprtI*

(5'-CAC AGG ACT AGA ACA-3') ja *hprtII* (5'-GCT GGT GAA AAG GAC-3'). Reaktsioon viidi läbi 10µl-s reaktsioonisegus, mis sisaldas 1µl varem valmis sünteesitud cDNA-d, 2µl HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (ROX) (Solis BioDyne) (HOT FIREPol DNA polümeraas; 5xEvagreen qPCR puhver; 12.5mM MgCl<sub>2</sub>; dNTP-d; EvaGreen värv; ROX värv); 0,2µl mõlemaid praimereid ja 6,6µl MQ-d. Igast koelüsaadist saadud cDNA-ga viidi reaktsioon läbi kolmes korduses, seda nii *Ric8* praimeritega, kui ka *Hprt* praimeritega. Reaktsiooni toimumiseks kasutati StepOnePlus Real-Time PCR System masinat (Applied Biosystems) ja StepOne Software v2.0 tarkvara. Saadud tulemuste analüüsimiseks kasutati 2<sup>-ΔΔCt</sup>-meetodit, mis näitab geeni suhtelist ekspressiooni võrreldes koduhoidja geeniga (*Hprt*) ning kus  $\Delta\Delta C_t = (C_{tCKO}[Ric8] - C_{tCKO}[Hprt]) - (C_{tLM}[Ric8] - C_{tLM}[Hprt])$ .

Kasutatud qRT-PCR-i programm:

1. Esialgne ahelate denatureerimine	95°C	13 minutit	} 40 tsüklit
2. Ahelate denatureerimine	95°C	15 sekundit	
3. Praimerite seondumine ja ahela pikendamine	60°C	1 minut	

#### 2.2.6. Fluoresseeruv *Western blot*

RIC8 valgu ekspressiooni võrdlemiseks *CKO* ja *LM* reetimates kasutati valgu immuunoblotti. Selleks eemaldati postnataalsete hiirte (P0) silmad koljust ning asetati 1xPBS-i. Reetina eemaldati ümbritsevatest kudedest ning asetati 1,5ml tuubi, kuhu lisati 50mg koe kohta 2xSDS-i (naatrium dodetsüülsulfaat). Segu homogeniseeriti Ultra-Turrax T8-ga (IKA) ja sonikeeriti Bioruptor UCD-200-ga (Diagenode) 10 minutit 4°C juures. Segu säilitati geelile kandmiseni -20°C juures. Reetinas olevate valkude lahutamiseks kasutati geelelektroforeesi. Selleks kasutati poliakrüülamiidgeeli, mille proovi kogumise osa valmistati 4%-lisest (4%-line poliakrüülamiid; 187mM Tris, pH6.8; 0,1% SDS-i; 1:100 APS (ammoonium persulfaat); 1:1000 TEMED (tetrametüületüülenediamiin)) ja jooksumise osa 10%-lisest (10%-line poliakrüülamiid; 375mM Tris, pH8.8; 0,1% SDS-i; 1:100 APS; 1:1000 TEMED). Geelile kanti 15µl eelnevalt valmistatud valgulüsaati ja 5µl markerit Protein ladder (Thermo Scientific). Geel elektroforeesiti 1xSDS-s esimesed 15 minutit 60V juures ja edasi 1 tund 120V juures. Pärast valkude lahutamist geelis, kanti valgud üle PDVF (polüvinüülideendifluoriid) membraanile, mis toimus ülekandepuhvril (100mM CAPS; 10% metanool) 1 tund 60mA tugevusel 4°C juures. Pärast membraanile kandmist pesti membraan 1xTBS-ga ning blokeeriti 10%-lise NFDM (*non-fat dry milk* - rasvavaba kuivatatud piim)/1xTBS-ga 1 tund. Membraani pesti 2 x 5 minutit 1xTBS-ga ning poolitati keskelt. Üks membraani osadest inkubeeriti RIC8 vastase

primaarse antikehaga *mouse* anti-RIC8-ga (Abcam) lahjendusega 1:800-le 1% NFD/1xTBS segus. Teine membraani osa inkubeeriti kontrollina kasutatava GAPDH vastase primaarse antikehaga *mouse* anti-GAPDH (GeneTex) lahjendusega 1:10000-le 1% NFD/1xTBS segus. Mõlemad membraanid inkubeeriti primaarse antikehaga jooksutajal üleöö 4°C juures. Järgmisel hommikul pesti membraanid 4 x 5 minutit 1xTBS-ga ning asetati hiire vastase sekundaarse antikeha Alexa Fluor *goat anti-mouse* 633 (Invitrogen) lahusesse lahjendusega 1:5000-le 1%-s NFD/1xTBS-s ja inkubeeriti 1 tund. Pärast seda, pesti membraanid 3 x 10 minutit 1xTBS-ga ning skanneeriti Taiphon Scanneriga.

#### 2.2.7. $\beta$ -galaktosidaasi värvusreaktsioon

*Ric8* ja *NestinCre* ekspressiooni vaatlemiseks silma arengus kasutati  $\beta$ -galaktosidaasi värvusreaktsiooni ja *Ric8<sup>lacZ/+</sup>* ning *NestinCre<sup>+/-</sup>;R26R* hiiri. Selleks dissekteeriti E11.5, E12.5, E15.5 ja P0 vanused *Ric8<sup>lacZ/+</sup>* hiired ja E9.5-E14.5 vanused *NestinCre<sup>+/-</sup>;R26R* embrüod emakatest ning fikseeriti 4%-lise PFA/1xPBS-ga 40 minutit. Järgnevalt pesti embrüod 3 x 10 minutit Rinse puhvriga (100mM Naatriumfosfaat, pH7.2; 2mM MgCl<sub>2</sub>; 0,02% NP-40 (nonüül fenoksüpolüetoksüetanool)). Pärast pesusid asetati embrüod X-gal-i värvilahusesse, mis sisaldas 5mM kaaliumferrotsüaniidi, 5mM kaaliumferritsüaniidi ja 1mg/ml X-gali/DMF-i (dimetüülformamiid) Rinse puhvril. Embrüoid inkubeeriti värvilahuses 37°C juures, kuni nende värvumiseni. Pärast värvuse tuvastamist sisestati embrüod želatiini segusse (0.49% želatiin; 30% BSA-d; 20% sahharoos; 1x PBS-is), kuhu lisati 1,5 ml želatiini segu kohta 150 $\mu$ l 25% glutaaraldehüüdi, et želatiini segu polümeriseeruks. Sisestatud embrüotest lõigati vibrotoomiga Leica VT1000S-ga 30 $\mu$ m paksused lõigud, mis asetati katmata alusklaasile ja sulundati glütserooli. Lõigud pildistati Olympus BX51 mikroskoobiga, kasutades kaamerat Olympus DP71.

#### 2.2.8. Immuunohistokeemia parafiinlõikudel

Immuunohistokeemia katsetes kasutati 8 $\mu$ m paksuseid lõike E14.5 vanustest embrüotest ning 6 $\mu$ m paksuseid läätse ja 8 $\mu$ m paksuseid reetina parafiinlõike P0 vanuse hiire koljust koos silmadega. Lõikudega klaasidel lasti soojeneda toatemperatuurini ning asetati 60°C-le kuumaplaadile 7-ks minutiks. Parafiini eemaldamiseks teostati klaasidele järgmine ksüleeni-etanooli rida: 2 x 5 minutit ksüleen, 2 x 3 minutit 100%-line etanool, 2 x 2 minutit 96%-line etanool, 2 x 2 minutit 90%-line etanool, 2 x 2 minutit 80%-line etanool, 2 x 2 minutit 70%-line etanool ja 2 x 2 minutit 50%-line etanool. Järgnevalt pesti klaase 2 x 5 minutit MQ-ga. Antigeensuse taastamiseks hoiti lõike 30 minutit 10mM naatriumtsitraadi puhvril (pH6.0) 97°C juures ning lasti jahtuda. Kui klaasid olid jahtunud toatemperatuurini, lisati rakkude

permeabiliseerimiseks 0.1%-list Triton-X/1xPBS-i lahust ja inkubeeriti 20 minutit. Lõigud pesti 3 x 5 minutit 1xPBS-ga ja blokeeriti 5%-lise kitseseerum/1xPBS-i lahusega 2 tundi toatemperatuuril. Sellele järgnes inkubeerimine primaarse antikehaga, mis oli lahjendatud 1%-lises BSA/1xPBS-i lahuses (Tabel 1). Primaarse antikehaga inkubeerimine kestis üleöö 4°C juures niiskuskambris. Järgmisel päeval pesti klaase üleliigse antikeha eemaldamiseks 3 x 10 minutit 1xPBS-ga ja lisati vastavalt primaarsele antikehale kindlat sekundaarse antikeha (Tabel 1) lahust 1%-lises BSA/1xPBS-s ning inkubeeriti 1 tund toatemperatuuril. Järgnevalt lõigud pesti uuesti 3 x 10 minutit 1xPBS-ga ja hoiti tuumade värvimiseks 1 minut DAPI (1:1000) (diaminofenüülindool)/1xPBS-i lahuses. Klaasid pesti 3 x 5 minutit 1xPBS-ga ning sulundati Fluoromounti (Electron Microscopy Sciences). Katteklaasi servad kinnitati läbipaistva lakiga ning lõigud pildistati Olympus BX51 mikroskoobiga ja kaameraga Olympus DP71.

**Tabel 1. Kasutatud primaarsed ja sekundaarsed antikehad**

<b>Primaarsed antikehad</b>		
<b>Antikeha</b>	<b>Lahjendus</b>	<b>Tootja</b>
mouse anti-GAPDH	1:10000	GeneTex
mouse anti-RIC8	1:800	Abcam
anti-Phalloidin 488	1:125	Invitrogen
rabbit anti-TBR2	1:600	Abcam
mouse anti- $\gamma$ -TUBULIN	1:500	Abcam
rabbit anti-Histone H3 (phospho S10)	1:1500	Abcam
mouse anti-AP2 $\alpha$	1:400	Santa Cruz Biotechnology
rabbit anti- $\beta$ -CATENIN	1:100	Abcam
<b>Sekundaarsed antikehad</b>		
<b>Antikeha</b>	<b>Lahjendus</b>	<b>Tootja</b>
goat anti-mouse 633	1:5000	Invitrogen
goat biotinylated anti-rabbit IgG	vastavalt tootja juhistele	Vector Laboratories
goat anti-mouse 488	1:600	Invitrogen
goat anti-rabbit 594	1:600	Invitrogen
goat anti-rabbit 488	1:600	Invitrogen
goat anti-mouse 594	1:600	Invitrogen

#### 2.2.9. *Whole-mount* immuunohistokeemia

Läätse morfoloogia uurimiseks kasutati *whole-mount* immuunohistokeemilist analüüsi P0 vanustel hiirtel. Vastsündinud hiired dekapiteeriti ning nende silmad eemaldati. Silmadest dissekteeriti läätsed, mis asetati 4%-lisse PFA/1xPBS-s fikseeruma 24-ks tunniks. Edasi pesti läätsi 1 tund 1xPBS-ga ning inkubeeriti 2 päeva aktiini märkimiseks Alexa 488-falloidiini antikehaga lahjendusega 1:125-le 0,1%-lises BSA/1xPBS-s. Läätsed pesti 1 tund 1xPBS-ga ja

inkubeeriti 5 minuti DAPI/1xPBS-i lahusega. Läätsed pesti uuesti 5 minutit 1xPBS-ga ning positsioneeriti glütserooli sisaldavale membraaniga alusklaasile, mis kaeti omakorda katteklasaiga. Falloidiiniga värvitud läätsed pildistati konfokaalmikroskoobiga Olympus Fluoview FV1000-ga.

#### 2.2.10. Immuunohistokeemia Vectastain *Elite* ABC kitiga

TBR2<sup>+</sup> ganglioni rakkude märkimiseks P0 vanuste hiirte reetinas kasutati immuunohistokeemiat, mis viidi läbi kasutades Vectastain *Elite* ABC kitti (Vector Laboratories). Immuunohistokeemia viidi läbi silma parafiinlõikudel, mis kuumutati 30 minutit kuumaplaadil 60°C juures ja rehüdreeriti ksüleen-etanooli reas (2 x 5 minutit ksüleen; 2 x 3 minutit 100%-line etanool; 2 x 2 minutit 96%-line etanool; 2 x 2 minutit 90%-line etanool; 2 x 2 minutit 80%-line etanool; 2 x 2 minutit 70%-line etanool; 2 x 2 minutit 50%-line etanool; 2 x 5 minutit MQ). Lõikudega klaasid inkubeeriti edasi 45 minutit 10mM-s naatriumtsitraadi puhvris (pH6.0) 97°C juures. Edasi lasti klaasidel jahtuda 30 minutit ning pesti 3 x 5 minutit 1xPBS-ga. Endogeense peroksüdaase aktiivsuse inaktiveerimiseks inkubeeriti lõike 0,3%-lise H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/metanooli lahusega 30 minutit pimendatud niisutuskambris. Lõigud pesti 3 x 10 minutit 1xPBS-ga ning blokeeriti 3 tundi 1,5%-lise kitseseerumiga (Vector Laboratories) 1%-lises BSA/0,1% Triton-X/1xPBT lahuses. Pärast kolme tunni möödumist liigne seerum eemaldati ning lõikudele lisati primaarne antikeha küülikus valmistatud anti-Tbr2 (1:600) (Abcam), mis oli lahjendatud varem valmistatud 1,5%-lises kitseseerumis. Lõike hoiti üleöö 4°C juures. Järgmisel päeval pesti klaasid 3 x 30 minutit 1xPBS-ga ning inkubeeriti 30 minutit toatemperatuuril sekundaarse antikehaga, milleks oli kitses valmistatud biotinooleeritud küüliku-vastase antikehaga (Vector Laboratories), mis lahjendati vastavalt tootja juhistele 1,5%-lises kitseseerumis. Lõigud pesti uuesti 3 x 30 minutit 1xPBS-ga ning inkubeeriti 30 minutit Vectastain-i reagentiga (Vector Laboratories), mis oli lahjendatud 1%-lise BSA/0,1% Triton-X/1xPBS-i lahuses ning seisnud eelnevalt 30 minutit 4°C juures. Klaasid pesti uuesti 3 x 30 minutit 1xPBS-ga ning värviti DAB-i (diaminobensidiini) lahusega, kuni värvuse ilmumiseni (3-5 minutit). Lõikude värvumine peatati filtreeritud kraaniveega (Tartu Veevärk) 3 x 30 minutit ja dehüdreeriti (3 minutit 50%-line etanool; 3 minutit 70%-line etanool; 3 minutit 90%-line etanool; 5 minutit 96%-line etanool; 5 minutit 100%-line etanool; 5 minutit ksüleen). Klaasid sulundati Permount-i (Serva) ja pildistati Olympus BX51 mikroskoobiga, kasutades Olympus DP71 kaamerat.

### 2.2.11. Hematoksüliini ja eosiiniga värvimine

Läätse ja reetina morfoloogia kindlaks tegemiseks P0 vanustes *CKO* ja *LM* hiirtes, kasutati hematoksüliiniga ja eosiiniga värvimist, mis märgivad vastavalt rakkude tuumad ning tsütoplasma. Värvimiseks kasutati hiirte koljudest tehtud parafiinlõike, mis kuumutati 30 minutit kuumaplaadil 60°C juures ning rehüdreeriti (2 x 5 minutit ksüleen; 5 minutit 100%-line etanool; 2 x 2 minutit 96%-line etanool; 2 minutit 80%-line etanool; 2 minutit 70%-line etanool; 2 minutit 50%-line etanool; 2 minutit MQ). Klaasid inkubeeriti filtreeritud Mayer-i hematoksüliiniga 10 minutit ning loputati seejärel kraaniveega (Tartu Veevärk) 10 minutit. Lõigud muudeti happeliseks 1%-lise HCl/70%-lise etanooli lahusega, milles inkubeeriti lõike 1 minut. Järgnevalt inkubeeriti lõike eosiiniga 2 minutit ning loputati uuesti kraaniveega 10 minutit. Lõigud dehüdreeriti lisades lõikudele etanooli lahuseid ja vahetades neid kiiresti (50%-line etanool; 70%-line etanool; 80%-line etanool; 90%-line etanool; 96%-line etanool; 100%-line etanool; 2 x ksüleen). Klaasid sulundati Permount-i (Serva) ja pildistati Olympus BX51 mikroskoobiga, kasutades Olympus DP71 kaamerat.

### 2.2.12. Mitoosikävi orientatsiooni määramine jagunevates rakkudes

Mitoosikävide orientatsiooni määramiseks reetina eellasrakkudes, eristati kõige-pealt mitosis olevad rakud. Selleks kasutati immuunohistokeemiat E14.5 vanuste embrüote parafiinlõikudel koos fosforüleeritud histoon H3-e vastase antikehaga, mis märgib spetsiifiliselt mitosis olevad rakud. Lisaks kasutati samadel lõikudel  $\gamma$ -tubuliini antikeha, et tuua esile jaguneva raku tsentrosoomide asukohad raku poolustel. Tsentrosoome kasutati mitoosikävi asukoha kindlaks tegemiseks. Samuti õnnestus mitoosikävi asukoht määrata ka raku poolustel oleva DNA vaba piirkonna järgi, kus paiknesid jaguneva raku tsentrosoomid. Kõik immuunohistokeemiliselt märgistatud *LM* ja *CKO* hiire reetina eellasrakud pildistati konfokaalmikroskoobiga Olympus Fluoview FV1000-ga. Saadud piltidel määrati rakkude mitoosikävi orientatsioon reetinaga piirneva pigmentepiteeli suhtes kasutades pildiprogramme Olympus Fluoview FV10-ASW 4.0 Viewer, Autodesk AutoCAD 2013 ja Bitplane Imaris 7.6.5. Kõik eellasrakud jagati kolme rühma vastavalt mitoosikävi asetusele pigmentepiteeli suhtes. Rakud, mille mitoosikävi oli orienteeritud 0°-29° pigmentepiteeli suhtes loeti planaarselt jagunevateks rakkudeks. 30°-59° kaldenurka omavad rakud jagunesid kaldu ja rakud, kelle mitoosikävi asetses 60°-90°-lise suunaga pigmentepiteelist eemale jagunesid apiko-basaalselt.

### 2.2.13. Rakkude loendamine ja statistika

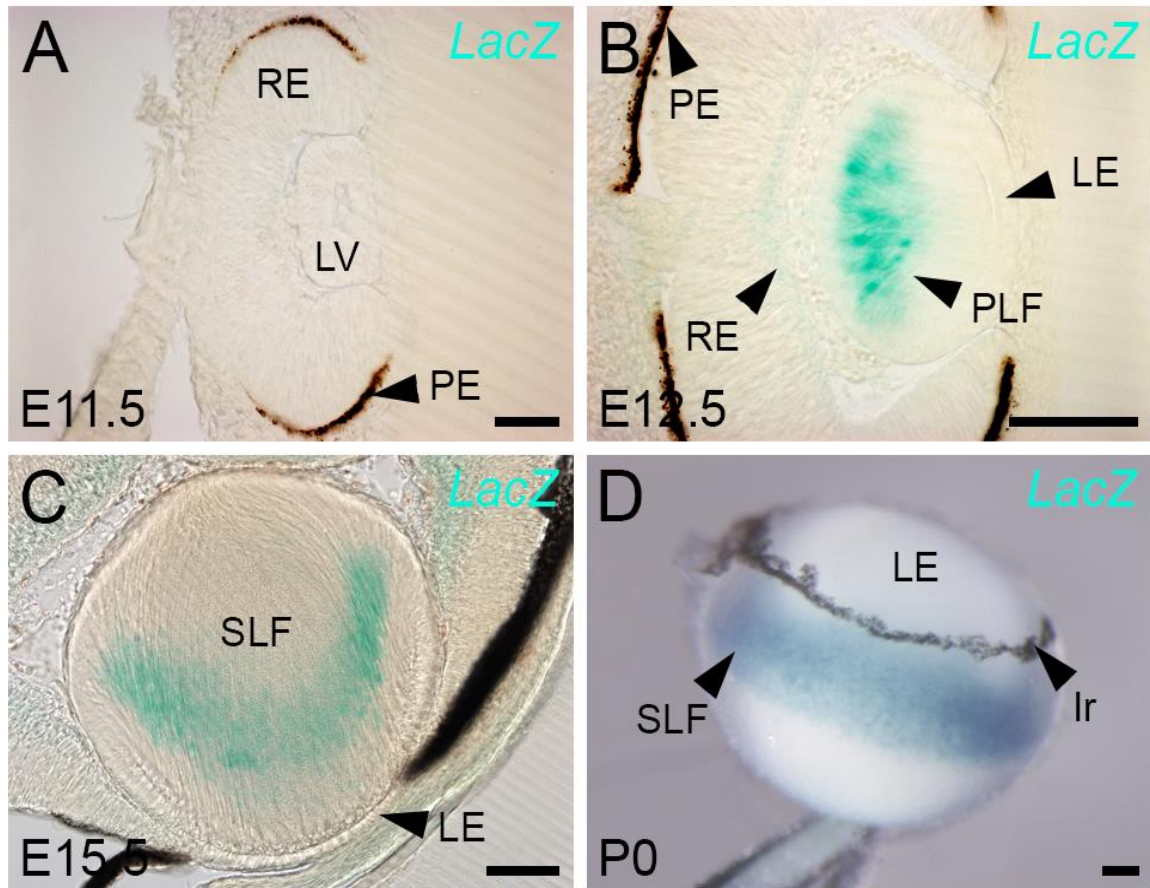
Reetinas olevate rakkude hulga kindlaks tegemiseks kasutati antikehadega AP2 $\alpha$  ja TBR2-ga immuunohistokeemiliselt töödeldud parafiinlõike hiirte silmadest, mis pildistati mikroskoobiga Olympus BX51. Saadud piltidelt loendati vastavad rakutüübid kasutades arvutiprogrammi Cellprofiler 2.0. Programmi parameetrid valiti vastavalt piltide heledusele ja seal olevate rakkude suurusele. AP2 $\alpha$ -ga töödeldud piltidel loendati AP2 $\alpha$ <sup>+</sup> rakud 500 $\mu$ m reetina pikkusel alal (loendati ainult reetina neuroblasti kihti kuuluvad rakud). TBR2 puhul loendati TBR2<sup>+</sup> rakud 800 $\mu$ m reetina pikkusel alal (loendati ainult reetina ganglionaarkihti kuuluvad rakud). Taoline erinevus tulenes erinevustest kahe kasutatud immuunohistokeemilise meetodi vahel ja programmi võimetest eristada erinevad rakke.

Reetinas olevate AP2<sup>+</sup> ja TBR2<sup>+</sup> rakkude hulga, reetina paksuse ja mitoosikäävi orientatsiooni vahelised erinevused LM ja CKO hiirte vahel, tehti kindlaks *Student t-test*-ga, mille vähemalt 0.05-st väiksem väärtus (\*P<0,05) loeti statistiliselt oluliseks.

## 2.3. TULEMUSED

### 2.3.1. *Ric8* ekspresseerub lüätse primaarsetes ja sekundaarsetes fiibrites

Hiire lüätse varajases arengus *Ric8* ekspressiooni kindlaks tegemiseks kasutati *Ric8<sup>lacZ/+</sup>* hiireliini embrüoid vanustes E11.5 ja E12.5, mis värviti *lacZ* spetsiifiliselt kasutades  $\beta$ -galaktosidaasi värvusreaktsiooni. Vanuses E11.5 ehk lüätse vesiikuli staadiumis puudub *Ric8* ekspressioon arenevas hiire lüätstes (joonis 7A). *Ric8* on ekspressioon esimest korda täheldatav vanuses E12.5 posterioorselt paiknevates lüätse primaarsetes fiibrites, mis on selleks ajaks juba pikenenud tulevaste lüätse epiteeli rakkude suunas ning sulgenud lüätse vesiikuli (joonis 7B). Lüätse epiteeli rakkudes pole *Ric8* selles vanuses ekspresseeritud (joonis 7B). Antud vanuses ekspresseerub *Ric8* esmakordselt ka kõrval paiknevas reetina epiteelis (joonis 7B). Vanuses E11.5 ei ole *Ric8* ekspresseerunud alles pigmenteerivas reetina pigmentepiteelis ega ka vanuses E12.5 juba pigmenteerunud reetina pigmentepiteelis (joonis 7A; 7B). Vanuses E15.5 ekspresseerub *Ric8* lüätse sekundaarsetes fiibrites, kuid ei ekspresseeru lüätse epiteeli rakkudes (joonis 7C). Taoline ekspressiooni muster säilib ka vanuses P0, mil *Ric8* on ekspresseerunud ainult lüätse sekundaarsetes fiibrites (joonis 7D). Seega algab *Ric8* ekspressioon vanuses E12.5 reetina epiteelis ja primaarsetes lüätse fiibrites ning on lüätse edasise arengu jooksul ekspresseerunud ainult lüätse sekundaarsetes fiibrites.

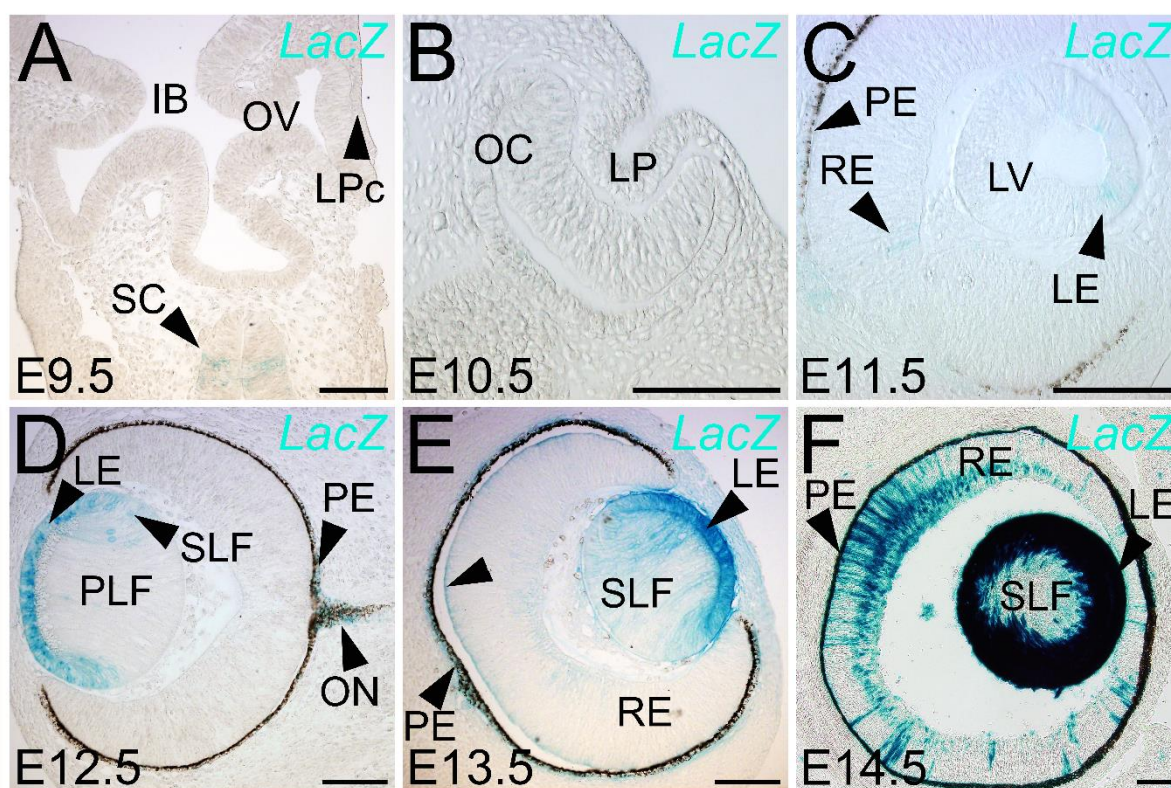


**Joonis 7. *Ric8* ajalis-ruumiline ekspressioon hiire läätses.** (A) *Ric8* ekspressioon puudub areneva silma läätses vesiikulis (LV), reetina epiteelis (RE) ja pigmentepiteelis (PE) vanuses E11.5. (B) *Ric8* ekspresseerub vanuses E12.5 pikenevates läätses primaarsetes fiibrises (PLF) ja reetina epiteelis (RE), kuid puudub läätses epiteeli (LE) rakkudes ning arenevas pigmentepiteelis (PE). (C) Vanuses E15.5 ekspresseerub *Ric8* läätses sekundaarsetes fiibrises (SLF), kuid mitte läätses epiteelis. (D) Vanuses P0 on *Ric8* samuti ainult läätses sekundaarsetes fiibrises. Lühend: Ir – iiris. Mõõtlõik 100µm.

### 2.3.2. *NestinCre* ekspresseerub arenevas läätses ja reetinas alates vanusest E11.5

Tegemaks kindlaks, et konditsionaalne hiireliin *NestinCre;Ric8<sup>lacZ/lox</sup>* on silma arengu uurimiseks sobiv, tuvastati esmalt *NestinCre* ekspressioon hiire silma arengu erinevatel etappidel, kasutades embrüonaalseid vanuseid E9.5, E10.5, E11.5, E12.5, E13.5 ja E14.5. Selleks kasutati *NestinCre;R26R* embrüotel  $\beta$ -galaktosidaasi värvusreaktsiooni. Varaseimas vaadeldud vanuses E9.5 puudus *NestinCre* ekspressioon silma struktuurides, mis selleks ajahetkeks tekkinud on: arenevas optilisest vesiikulis ja läätses plakoodis, kuid oli ekspresseerunud seljaajus (joonis 8A). Vanuses E10.5 ei olnud silmakarikas ja läätsesaugus *NestinCre* ekspressioon detekteeritav (joonis 8B). *NestinCre* ekspressioon arenevas silmas on täheldatav esmalt vanuses E11.5, mil *NestinCre* ekspresseerub läätses vesiikulis apikaalselt paiknevates tulevastes läätses epiteeli rakkudes ja reetina epiteelis, kuid puudub reetina pigmentepiteeli rakkudes (joonis 8C). Vanuses E12.5 on *NestinCre* ekspressioon läätses epiteeli

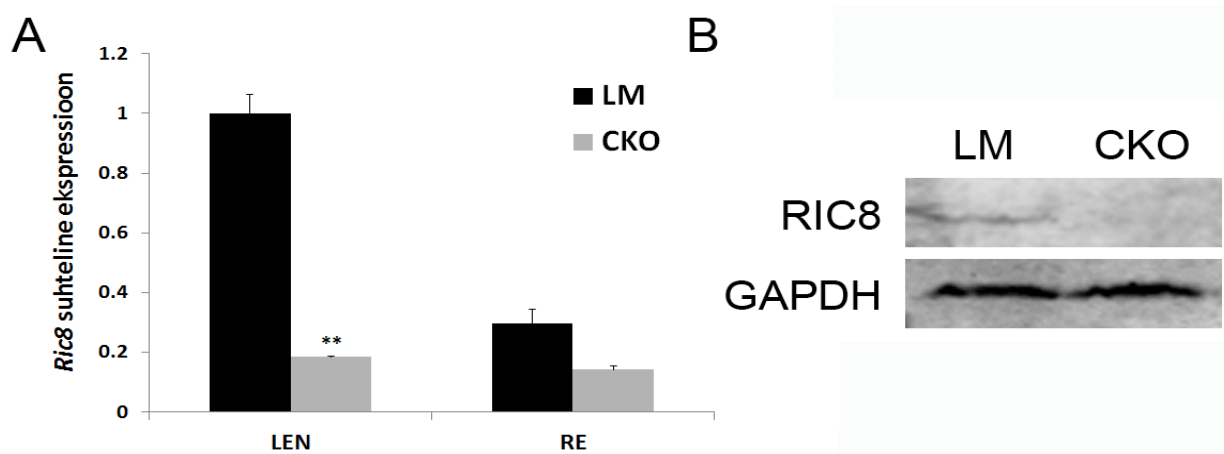
rakkudes märgatavalt intensiivsem ning on sarnaselt E11.5-le täheldatav ka diferentseeruvates sekundaarsetes fiibrates. E12.5 hakkab *NestinCre* ekspresseeruma ka pigmentepiteelis ja nägemisnärvis, kuid puudub pikenenud läätse primaarsetes fiibrates (joonis 8D). Vanustes E13.5 ja E14.5 on tugevnenud *NestinCre* ekspressioon reetina epiteelis, läätse epiteelis, diferentseeruvates läätse sekundaarsetes fiibrates ja pigmentepiteelis (joonis 8E; 8F). Samas on vanuses E14.5 täheldatav *NestinCre* ekspressiooni puudumine diferentseerunud läätse sekundaarsetest fiibrates seoses sealsete tuumade lagundamisega (joonis 8F). Kokkuvõtvalt võib öelda, et *NestinCre* ekspresseerub esimest korda hiire silmas vanuses E11.5 läätse vesiikulis ja reetina epiteelis ning ekspressiooni tase suureneb neis struktuurides edasise arengu käigus.



**Joonis 8.** *NestinCre* ekspressioon arenevas silmas vanustes E9.5, E10.5, E11.5, E12.5, E13.5 ja E14.5. (A) Vanuses E9.5 puudub *NestinCre* ekspressioon silma vesiikulis (OV) ja läätse plakoodis (LPc), kuid esineb seljaaju (SC). (B) E10.5 puudub *NestinCre* silmakarikas (OC) ja läätseaugus (LP). (C) E11.5 hakkab *NestinCre* ekspresseeruma läätse vesiikuli (LV) epiteeli rakkudes (LE) ja reetina epiteelis (RE), kuid puudub pigmentepiteelis (PE). (D) Vanuses E12.5 ekspresseerub *NestinCre* läätse epiteelis, diferentseeruvates läätse sekundaarsetes fiibrates (SLF), pigmentepiteelis ja nägemisnärvis (ON), kuid puudub primaarsetes fiibrates. (E) *NestinCre* ekspresseerub vanuses E13.5 läätseepiteelis, diferentseeruvates sekundaarsetes fiibrates, reetina epiteelis ja pigmentepiteelis. (F) Vanuses E14.5 on säilinud *NestinCre* ekspressioon varem kirjeldatud silma kudedes, kuid nüüd on täheldatav ka ekspressiooni kadumine diferentseerunud läätse fiibratest, mis on vaadeldav mittevärvunud alana läätse keskel. Lühend: IB – vaheaju. Mõõtlõik 100µm.

### 2.3.3. *Ric8* ekspressioon on *NestinCre;Ric8<sup>lacZ/lox</sup>* hiireliini läätse ja reetinas vähenenud

Eelnevalt selgus, et nii *Ric8* kui *NestinCre* ekspresseerusid areneva silma läätse ja reetina rakkudes. Tuvastamaks, kas *Ric8* konditsionaalses hiireliini *NestinCre;Ric8<sup>lacZ/lox</sup>* loomadel on *Ric8* ekspressioon läätse ja reetinas vähenenud ning kas antud hiireliin on silma arengu uurimiseks sobiv, kasutati *Ric8* mRNA taseme määramiseks kvantitatiivset reaallaja PCR-i (qRT-PCR) ning RIC8 valgu tuvastamiseks *western blot*-i. *Ric8* mRNA tase määrati E18.5 vanuse hiire reetinas ja läätse. Võrreldes pesakonnakaaslasega (*LM*) oli *Ric8* mutantses hiires (*CKO*) *Ric8* suhteline ekspressiooni tase läätse oluliselt vähenenud ( $P < 0.01$ ), kuid reetinas ei suudetud taolist *Ric8* mRNA taseme muutust statistiliselt tõestada (joonis 9A). RIC8 valgu taseme määramine P0 vanuste hiirte reetinas näitas aga, et võrreldes kontrolliga on *CKO* hiire reetinas RIC8 valgu hulk märkimisväärselt vähenenud (joonis 9B). Seega on *CKO* hiirte reetinas ja läätse *Ric8* ekspressioon maha reguleeritud ning *NestinCre;Ric8<sup>lacZ/lox</sup>* on sobiv hiireliin, millega uurida *Ric8* puuduse mõju läätse ja reetina arengule.

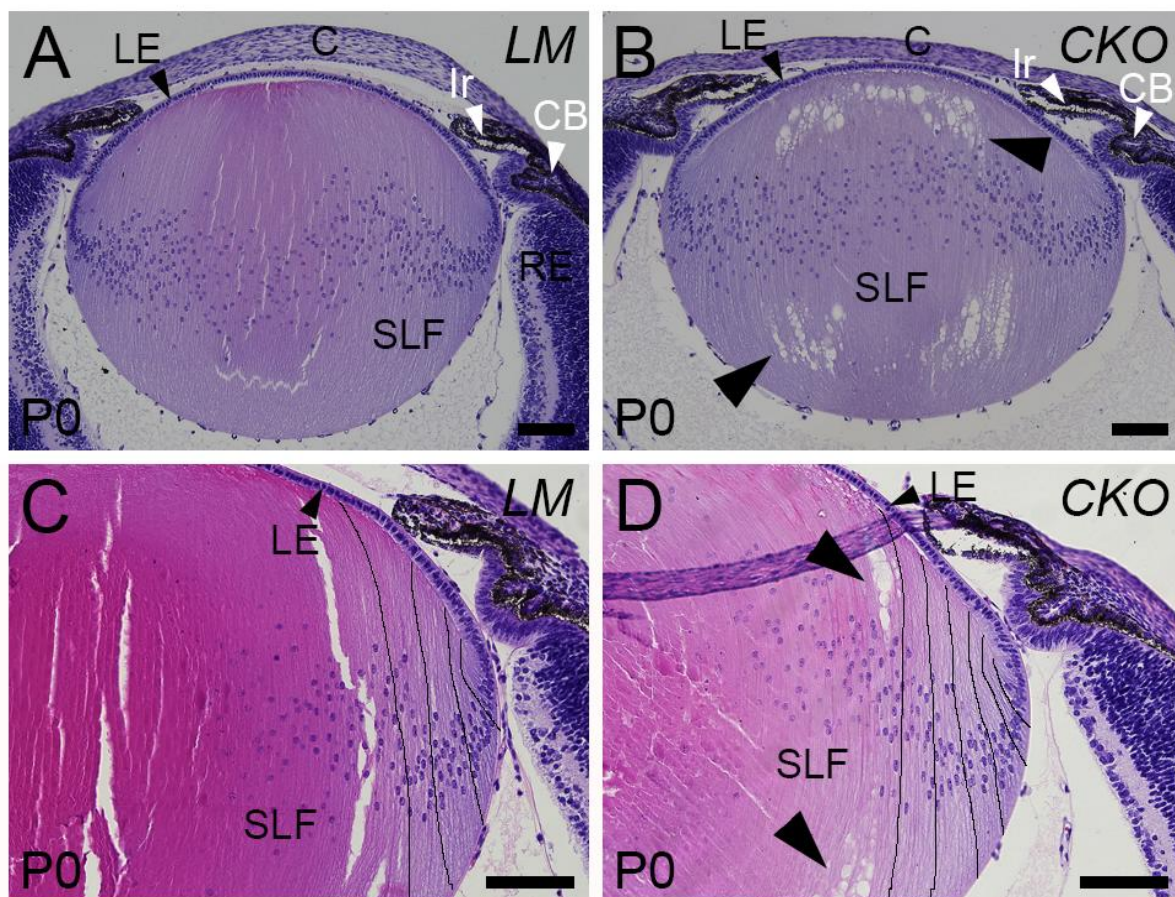


**Joonis 9.** *Ric8* ekspressioon on vähenenud *NestinCre;Ric8<sup>lacZ/lox</sup>* hiirte läätse ja reetinas. (A) qRT-PCR-ga määratud *Ric8* mRNA suhteline tase, mis on vähenenud *NestinCre;Ric8<sup>lacZ/lox</sup>* (*CKO*) hiire läätse (LEN) võrreldes pesakonnakaaslasega (*LM*) ning *Ric8* mRNA suhteline tase reetinas (RE) võrreldes *Ric8* mRNA hulgaga läätse. (B) *Western-blot* analüüsiga kindlaks tehtud RIC8 valgu hulga erinevus *CKO* ja *LM* reetinas, kus *CKO* hiire reetinas on RIC8 valgu hulk vähenenud. \*\*  $P < 0,01$ .

### 2.3.4. *NestinCre;Ric8<sup>lacZ/lox</sup>* läätse esinevad rakkudevahelised vakuoolid

Järgnevalt kontrolliti, kas *NestinCre;Ric8<sup>lacZ/lox</sup>* läätse tekib *Ric8* puuduse mõjul anatoomilis-morfoloogilisi defekte. Selleks kasutati P0 vanuse hiire läätse, mille tuumad ja tsütoplasma värviti hematoksüliin ja eosiiniga. *CKO* ( $n=3$ ) ja *LM* ( $n=3$ ) läätsetes on eristatavad ühekihiline läätse epiteel ja diferentseeruvad ning apikaalselt ja basaalselt pikenevad sekundaarsed fiibrid (joonis 10A-10D). Mõlemal hiirel on rohkem diferentseerunud läätse

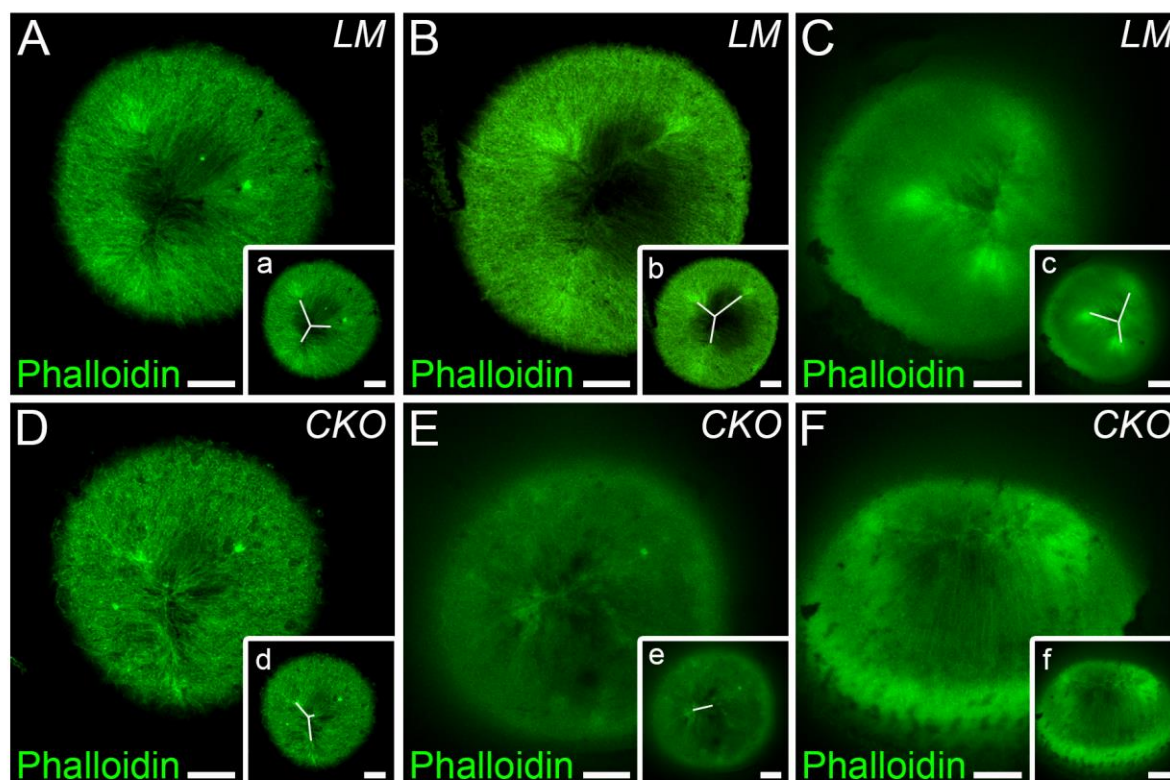
sekundaarsed fiibrid võimelised migreeruma läätse sisemusse ning on alanud fiiberrakkudes olevate tuumade loomulik lagundamine, millest on tingitud ka tuumade nõrgem värvumine hematoksüliiniga (joonis 10A, 10B). Selles vanuses puuduvad täielikult läätse sisemisest rakkudest tuumad, mis on iseloomulik nii *CKO* hiirele kui ka tema pesakonnakaaslasel (joonis 10C; 10D). Lisaks on ka morfoloogia sarnane *CKO* ja *LM* hiirel (joonis 10A; 10B). Üllatuslikult sisaldab *CKO* hiire lääts iseloomulike rakkudevahelisi vakuole, mis *LM* läätses puuduvad (joonis 10A-10D, suured mustad nooled).



**Joonis 10.** *NestinCre;Ric8<sup>lacZ/lox</sup>* läätses esinevad rakkudevahelised vakuolid. (A,C) Lääts morfoloogia P0 vanuse *NestinCre;Ric8<sup>lacZ/lox</sup>* hiire pesakonnakaaslasel (*LM*), kellel esineb ühekihiline läätse epiteel (*LE*) ning läätse sekundaarsed fiibrid (*SLF*), mis diferentseerudes pikenevad apikaalselt ja basaalselt ning migreeruvad läätse sisemusse, kus nende tuum lagundatakse. (B,D) *NestinCre;Ric8<sup>lacZ/lox</sup>* (*CKO*) hiire läätsel on säilinud ühekihiline epiteel ning sekundaarsed fiibrid migreeruvad läätse sisemusse, kus kaotavad oma tuumad. Erinevalt *LM* hiire läätses sisaldab *CKO* lääts rakkudevahelisi vakuole (suured mustad nooled). (C,D) *LM* ja *CKO* hiirete sekundaarsed fiibrid pikenevad diferentseerudes ja migreeruvad sarnaselt apiko-basaalselt (sekundaarsete fiibriraku piirid on tähistatud mustade joontega). Lühendid: C – sarvkest; CB – ripskeha; Ir – iiris; RE – reetina epiteel. Mõõtlõik 100µm.

### 2.3.5. *NestinCre;Ric8<sup>lacZ/lox</sup>* läätse fiibrid on ebakorrapäraselt organiseeritud

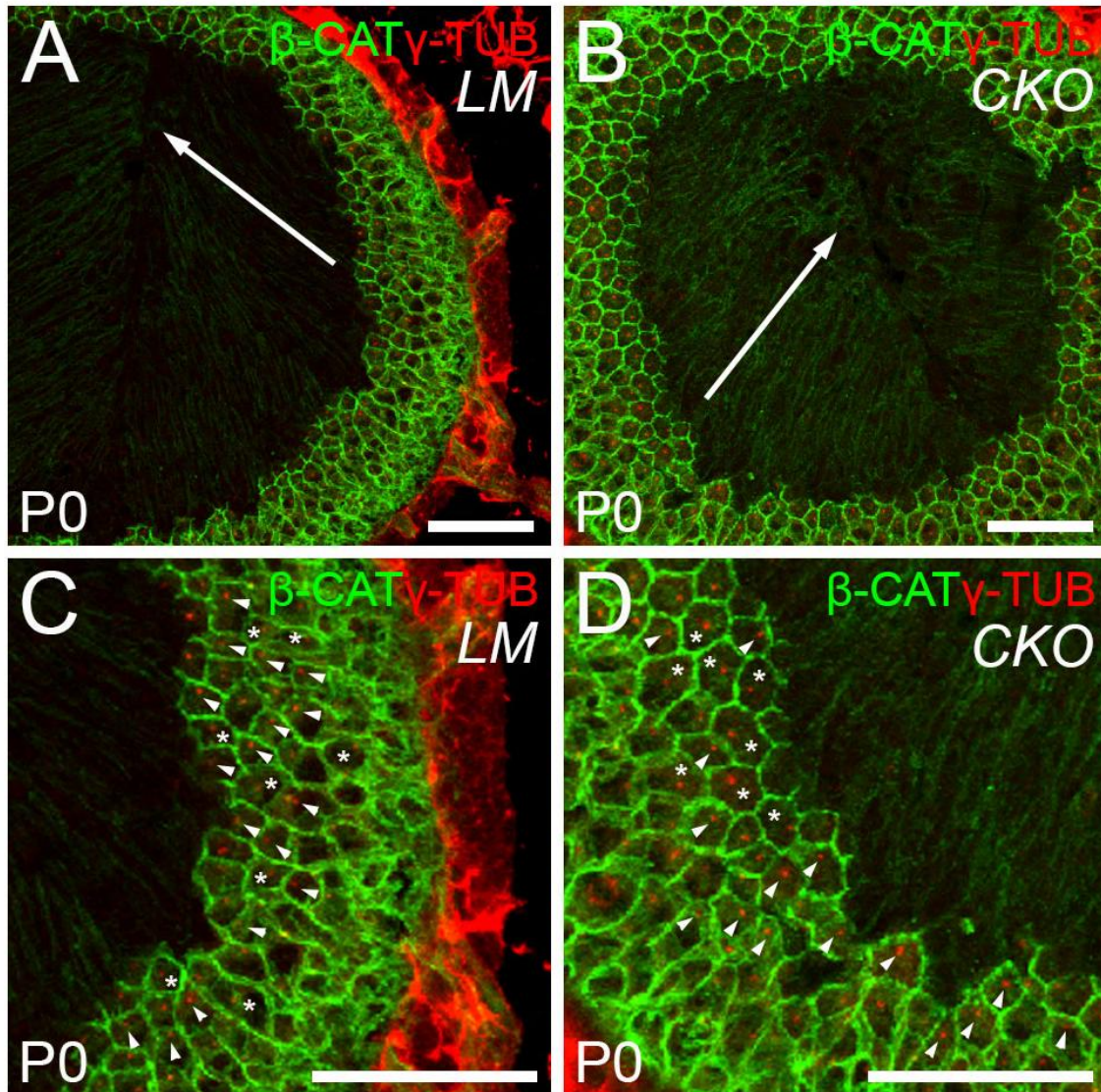
Varasemalt on näidatud, et RIC8 omab rolli rakkude adhesioonis ja migratsioonis. Kuna *NestinCre;Ric8<sup>lacZ/lox</sup>* hiireliinis esinesid läätstes vakuoolid, mis võivad olla põhjustatud rakkude vahelistest adhesiooni probleemidest, otsustati vaadelda lähemalt läätse sekundaarsete fiibrите migreerumist ja organiseeritust. Selleks kasutati postnataalseid P0 LM ja CKO läätssi, milles olev aktiin märgistati immuunohistokeemiliselt. Taoline värvimine paljastab normaalselt arenenud läätsetele iseloomuliku Y-kujulise õmbluse läätse anteriorsele ja sellest tulenevalt ka vastupidise λ-kujulise õmbluse läätse posterioorsele küljele. Vastav Y-kujuliste struktuuride tekkimine läätse vastaskülgedele näitab läätse sekundaarsete fiibrите õiget migreerumist läätse keskele ja samaaegset organiseeritust, moodustades kõrval olevate fiibrитеga ühtse ja sirgeid fiibreid sisaldava läätse koe (Al-Ghoul jt., 2010). Pesakonnakaaslase (n=5) läätstes oli vanuses P0 moodustunud läätse anteriorsele küljele Y-kujuline struktuur ning sekundaarse fiibrid paiknesid sirgelt Y-kujulise struktuuri läheduses (joonis 11A-11C). CKO (n=5) hiirte läätstes ei olnud kujunenud normaalset Y-kujulist struktuuri ning läätse sekundaarsed fiibrid paiknesid laineliselt (joonis 11D-11F).



**Joonis 11.** *NestinCre;Ric8<sup>lacZ/lox</sup>* hiirte läätsetes ei ole sekundaarsed fiibrid normaalselt organiseeritud. (A,B,C) LM hiirte läätsetes on moodustunud normaalne Y-kujuline struktuur ja läätse sekundaarsed fiibrid paiknevad sirgelt antud struktuuri läheduses. (D,E,F) CKO hiirte läätsetes ei ole moodustunud LM hiirtele sarnast Y-kujulist struktuuri ja sekundaarsed fiibrid asetsevad laineliselt. (a,b,c,d,e) LM ja CKO läätssed, kus on välja toodud moodustunud Y-kujuline struktuur. Phalloidin – falloidiin. Mõõtlõik 100μm.

### 2.3.6. *NestinCre;Ric8<sup>lacZ/lox</sup>* läätse epiteelirakkudes on säilinud rakkude planaarne polaarsus

Kuna *CKO* hiirte läätstes ei moodustu Y-kujulist struktuuri vaadeldi edasi läätse epiteeli rakkude planaarse polariseeritust, sest varasemalt on näidatud, et rakkude planaarse polaarsuse puudumisel on häiritud Y-kujulise struktuuri kujunemine läätstes (Sugiyama jt., 2011; Sugiyama jt., 2010). Rakkude planaarne polaarsus esineb läätse epiteeli ja sekundaarsetes fiibrites. Basaalkeha asukohaga saab kindlaks teha rakkudes esineva planaarse polaarsus, mille korral on basaalkeha lokaliseeritud enamikes rakkudes kindlas raku piirkonnas, rakumembraani ääres (Sugiyama jt., 2011; Sugiyama jt., 2010). Läätse epiteelirakkudes esineva rakkude planaarse polaarsuse vaatlemiseks *LM* ja *CKO* hiirte läätsetes kasutati hiiri vanuses P0 ja immuunohistokeemiat ko-lokaliseerides  $\beta$ -kateniini antikeha, et tuvastada rakkude vahelised kontaktid ja sellega rakkude piirid ning  $\gamma$ -tubuliini antikeha, et märkida rakus paiknev basaalkeha. *LM* (n=3) ja *CKO* (n=3) hiirte läätse epiteelirakkudes eksisteerib rakkude planaarne polaarsus, kus basaalkehake on paigutunud raku sellele küljele, mis on suunatud läätse Y-kujulise struktuuri poole nagu ka sekundaarsed fiibrid (joonis 12A-12D, valged pikad nooled ja valged nooleotsad). Samas esineb ka rakke, mille basaalkeha on lokaliseerunud raku keskele või Y-kujulisest struktuurist kaugemal paiknevasse raku küljele (joonis 12A-12D, valge tärn). Läätse  $\beta$ -kateniini immuunohistokeemiaga on selgesti nähtav ka varem kindlaks tehtud Y-kujulise struktuuri mitte moodustumine *CKO* hiire läätstes ja sekundaarsete fiibrite organiseerimatus võrreldes *LM* hiire läätsega (joonis 12A; 12B). Rakkude planaarselt polariseeritust läätse sekundaarsetes fiibrites *CKO* ja *LM* hiirtes ei õnnestunud metoodilistel põhjustel vaadelda.

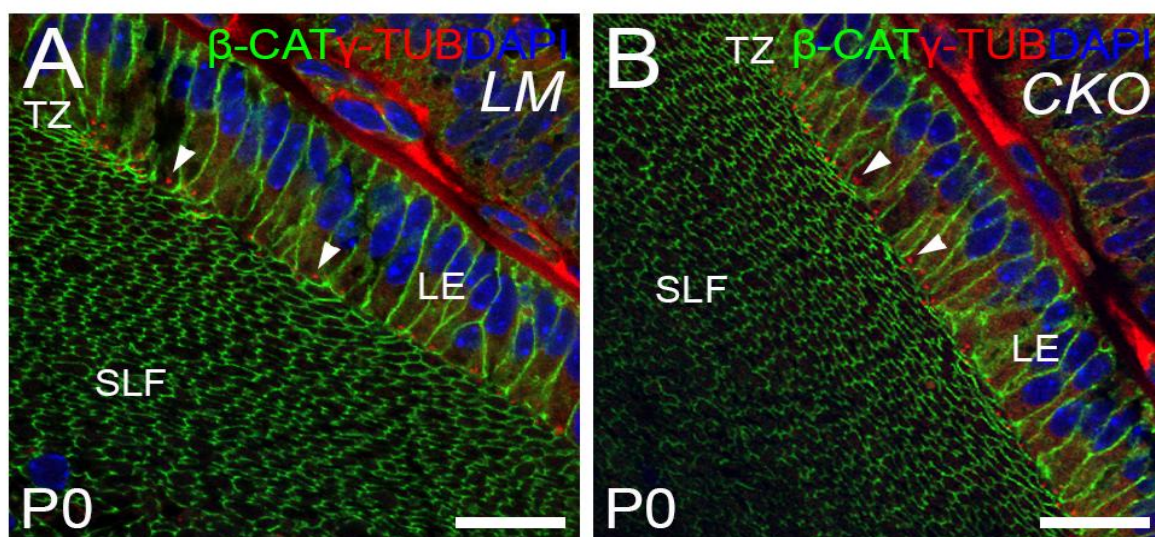


**Joonis 12.** *NestinCre;Ric8<sup>lacZ/lox</sup>* läätse epiteelirakud on planaarselt polariseeritud. (A,C) LM hiire läätse epiteeli rakkudes esineb planaarne polaarsus, mille korral on raku basaalkühake paigutatud raku sellele küljele, mis on kõige lähemal Y-kujulisele struktuurile. (B,D) CKO hiire läätse epiteelirakkudes eksisteerib planaarne polariseeritus sarnaselt LM hiire läätsele, kuid ei ole kujunenud Y-kujulist struktuuri ning sekundaarsed fiibrid ei ole suunatud sirgelt Y-kujulise struktuuri poole. Pikkade nooltega on tähistatud sekundaarsete fiibrile suundumist Y-kujulise struktuuri poole. Nooleotstega on tähistatud rakud, mis on planaarselt polariseeritud ning tärniga on märgitud rakud, mille basaalkühake paikneb raku keskel või teiselpool raku ääres. Lühendid:  $\beta$ -CAT –  $\beta$ -catenin;  $\beta$ -kateniin,  $\gamma$ -TUB –  $\gamma$ -tubuliin;  $\gamma$ -tubuliin. Mõõtlõik 40 $\mu$ m.

### 2.3.7. *NestinCre;Ric8<sup>lacZ/lox</sup>* läätse sekundaarsed fiibrid on heksagonaalse kujuga

Ehkki rakkude planaarsest polaarsusest läätse sekundaarsetes fiibrile ei õnnestunud vaadelda, hinnati nende rakkude kuju läätse ülemineku tsoonis, et hinnata kas CKO hiire läätse sekundaarsed fiibrid on heksagonaalse kujuga. LM ja CKO hiire läätse sekundaarsete fiibrile visualiseerimiseks kasutati  $\beta$ -kateniini ja  $\gamma$ -tubuliini immuunohistokeemiat läätse üleminekutsoonis, kus epiteelirakud jagunevad ning diferentseeruvad sekundaarseteks

fiibrteks. Basaalkeha paikneb nii *LM* (n=3) kui *CKO* (n=3) hiire läätse epiteelirakkudes apikaalselt (joonis 13A; 13B). Sarnane on ka *LM* ja *CKO* hiirte sekundaarsete fiibrte kuju läätse üleminekutsoonis, omades ristlõikelt normaalset kuusnurkset kuju (joonis 13A; 13B).

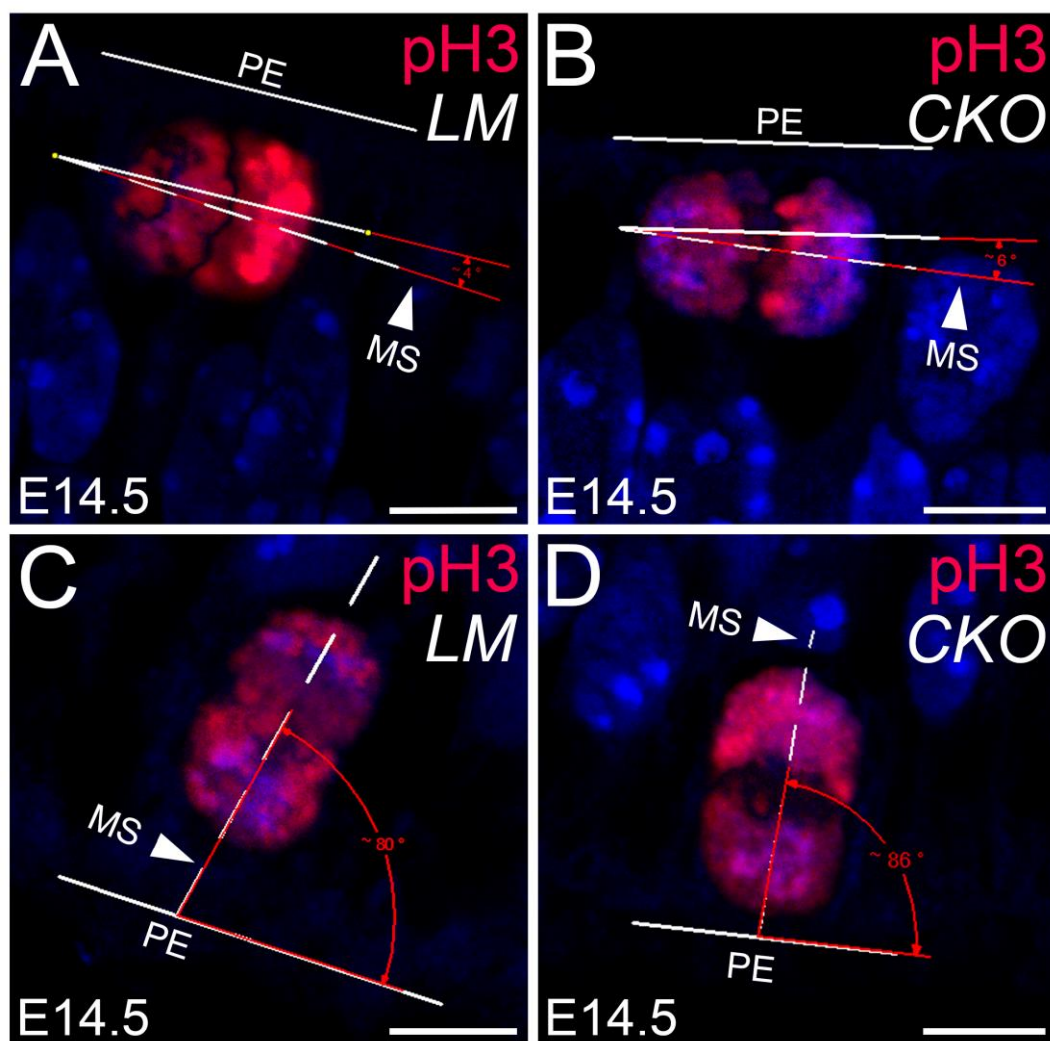


**Joonis 13.** *NestinCre;Ric8<sup>lacZ/lox</sup>* läätse sekundaarsed fiibrid on kuunenurkse kujuga. (A) *LM* hiire läätse epiteelirakkudes (LE) paikneb basaalkeha apikaalselt ning läätse sekundaarsed fiibrid (SLF) on ristlõikelt kuusnurkse kujuga. (B) *CKO* hiire läätse epiteelirakkudes lokaliseerub basaalkeha sarnaselt *LM* hiire läätsega rakkudes apikaalselt ning on säilinud diferentseeruvate sekundaarsete fiibrte kuusnurksus. Nooleotstega on tähistatud basaalkeha. Lühendid:  $\beta$ -CAT –  $\beta$ -kateniin,  $\gamma$ -TUB –  $\gamma$ -tubuliin. TZ – *transitional zone*; läätse üleminekutsoon. Mõõtlõik 10 $\mu$ m

### 2.3.8. *Ric8* ekspressiooni puudumine ei mõjuta reetina eellasrakkude mitoosikävi orientatsiooni

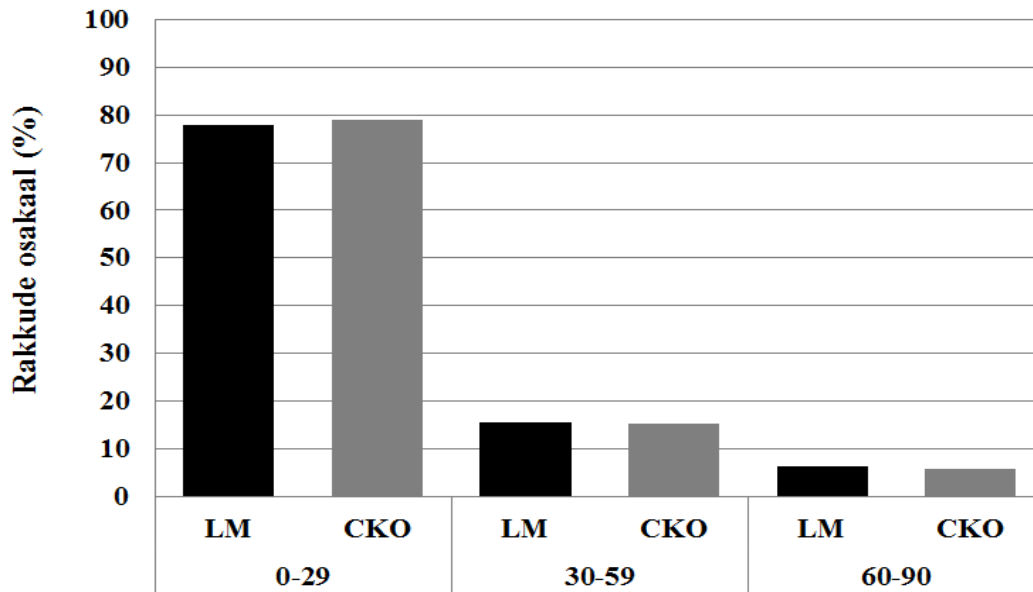
Reetina arengu käigus toimuvad eellasrakkude planaarsed ja vertikaalsed jagunemised. Kuna varasemalt on näidatud, et RIC8 reguleerib mitoosikävi orientatsiooni ning võib sellega mõjutada rakkude planaarseid ja vertikaalseid jagunemisi siis vaadeldi reetina epiteelis apikaalselt jagunevate eellasrakkude mitoosikävi orientatsiooni pigmentepiteeli suhtes. Selleks kasutati *CKO* ja *LM* hiire reetinaid vanuses E14.5, millal toimuvad reetinas sümmeetrilised ja asümmeetrilised rakkude jagunemised. Anafaasis olevad reetina eellasrakud märgistati mitoosi spetsiifilise fosforüleeritud histoon H3 antikehaga ja nende mitoosikävi orientatsioon toodi välja  $\gamma$ -tubuliini antikehaga, mis märgib raku tsentrosoome. Mitoosikävi orientatsioon mõõdeti reetinaga piirneva pigmentepiteeli suhtes. Planaarseks loeti eellasrakkude jagunemised, mille mitoosikäv oli orienteeritud 0°-29° pigmentepiteeli suhtes, apiko-basaalseks peeti jagunemisi, kus mitoosikäv oli suunatud 60°-90° pigmentepiteeli suhtes (joonis 14A-14D). 0°-29° ja 60°-90° vahepealseid rakke loeti kaldu jagunevateks (30°-59°). Mõlemas, *LM* (186 rakku) ja *CKO* (170 rakku) hiirte reetinales leidis nii apiko-basaalselt, kaldu

kui ka planaarselt jagunevaid eellasrakke, kuid *CKO* hiirte reetinas ei olnud jagunevate eellasrakkude vahetegur muutunud võrreldes *LM* hiire reetina eellasrakkudega vanuses E14.5 (joonis 15). Enamus reetina eellasrakke jagunes planaarselt, *LM* puhul 77,8% ja *CKO* puhul 78,8%. Apiko-basaalselt jagunevad reetina eellasrakud kõige vähem *LM* ja *CKO* hiirtes ning moodustavad ka kõige väiksema osa jagunevate rakkude koguhulgast (vastavalt 6,4% ja 5,8%). Vahepealset jagunemistüüpi ehk rakud, mis jagunesid kaldu oli 15,5% *LM*-i ja 15,2% *CKO* hiirte reetina eellasrakkudest. Kokkuvõtvalt näitasid katsed, et *Ric8* ei mõjuta reetina eellasrakkude mitoosikävi orientatsiooni vanuses E14.5, sest ei ole muutunud planaarselt ja vertikaalselt jagunevate eellasrakkude vahetegur.



**Joonis 14.** *NestinCre;Ric8<sup>lacZ/tox</sup>* hiire reetina eellasrakud jagunevad vanuses E14.5 apiko-basaalselt ja planaarselt. (A) *LM* hiire reetina eellasrakk, mis jaguneb pigmentepiteeli (PE) suhtes planaarselt (pigmentepiteeli ja mitoosikävi (MS) vaheline nurk on 4°). (B) *CKO* hiire reetina eellasrakk, mille mitoosikävi ja pigmentepiteeli vaheline nurk on 6° ning jaguneb planaarselt. (C,D) *LM* ja *CKO* hiire reetina eellasrakud, mis jagunevad pigmentepiteeli suhtes apiko-basaalselt (vastavalt 80° ja 86°). Punase kolmnurgaga on tähistatud jaguneva raku mitoosikävi ja pigmentepiteeli vaheline nurk. Lühendid: pH3 – phosphorylated histone H3; fosforüleeritud histoon H3, MS – mitotic spindle; mitoosikävi. Mõõtlõik 5μm.

### Reetina jagunevate eellasrakkude mitoosikäävi orientatsioon vanuses E14.5



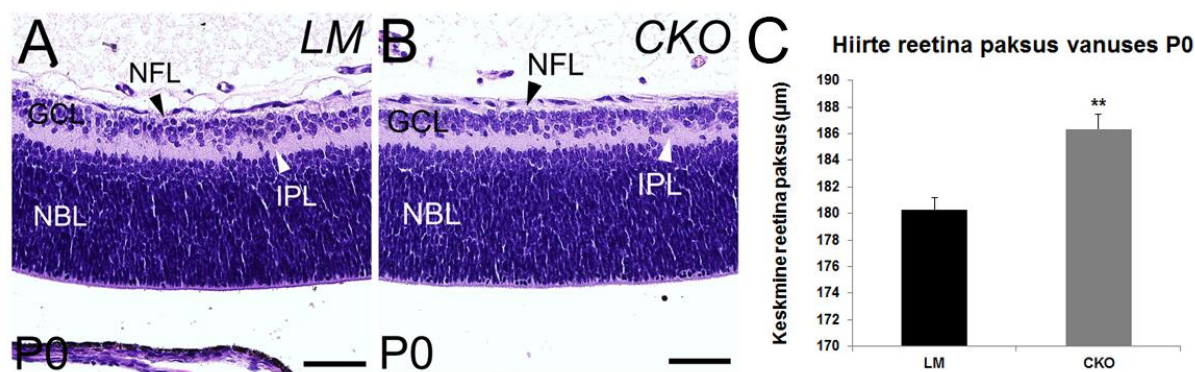
### Mitoosikäävi orientatsioon pigmentepiteeli suhtes (kraadides)

Joonis 15. *NestinCre;Ric8<sup>lacZ/lox</sup>* hiire reetinas ei ole muutunud apiko-basaalselt, planaarselt või kaldu jagunevate eellasrakkude hulk. *LM* ja *CKO* hiirte reetina jagunevate eellasrakkude mitoosikäävi orientatsioon pigmentepiteeli suhtes, kus 0°-29° mitoosikäävi orientatsiooni omavad rakud jagunevad planaarselt, 30°-59° kaldu ja 60°-90° apiko-basaalselt. *CKO* hiire reetinas on sarnane hulk apiko-basaalselt, kaldu ja planaarselt jagunevate rakkude hulk võrreldes *LM* hiire reetinaga. Apiko-basaalselt, kaldu ja planaarselt jagunevate rakkude hulk on arvatud anafaasis olevate rakkude hulga suhe pH3<sup>+</sup> jagunevate rakkude koguhulgast (*LM*=186 rakku; *CKO*=170 rakku).

2.3.9. *NestinCre;Ric8<sup>lacZ/lox</sup>* hiire reetina on vanuses P0 pesakonnakaaslase reetinast paksem

*Ric8* konditsionaalse hiireliini *NestinCre;Ric8<sup>lacZ/lox</sup>* vastündinud pojad surevad vanuses P0, mistõttu ei ole võimalik kasutada seda hiireliini *Ric8* ekspressiooni puudulikkuse mõju uurimiseks reetina postnataalses arengus. Seepärast uuriti, kuidas *RIC8* puudus on mõjutanud reetina arengut vanuseni P0. Selleks värviti silma parafiinlõigud hematoksüliini ja eosiiniga. Vanuseks P0 on sarnaselt *LM* (n=2) hiire reetinaga *CKO* (n=2) hiire reetinas moodustunud ganglionaarkiht, mille ganglioni rakkude aksonitest on kujunenud reetina närvikiudude kiht (joonis 16A; 16B). Ganglioni rakkude sünapsid on koos amakriinrakkude ja bipolaarsete rakkudega moodustanud sisemise põimikkihi. Peale ganglioni rakkude ei ole areneva reetina teised rakutüübid selleks vanuseks veel moodustunud täiskasvanud reetinale iseloomulike kihte ning asetsevad koos ühes neuroblastilises kihis. *CKO* hiire reetinas on

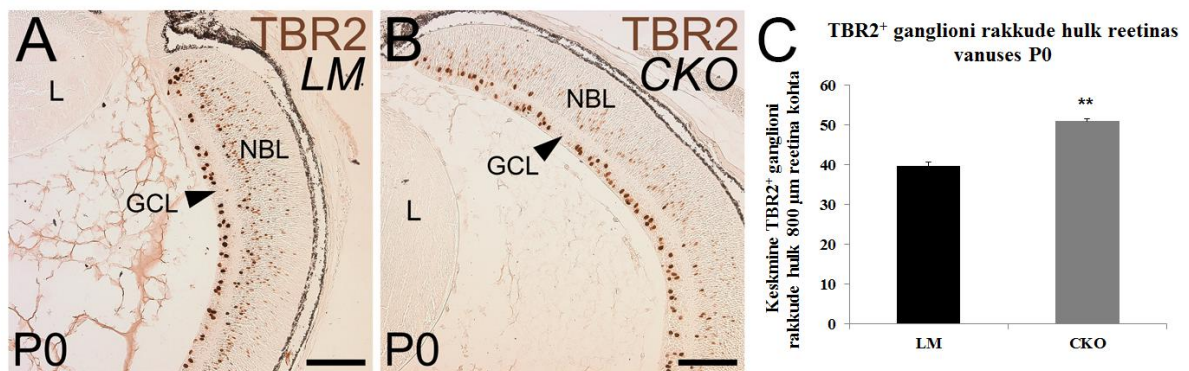
eristunud kõik selleks vanuseks omased kihid, kuid reetina läbimõõdu mõõtmisel selgus, et *CKO* hiire reetina on võrreldes *LM* hiire reetinaga vanuses P0 paksem ( $P < 0,01$ ) (joonis 16C).



**Joonis 16.** *NestinCre;Ric8<sup>lacZ/lox</sup>* hiire reetina on paksem vanuses P0. (A) *LM* hiire reetina kihid vanuses P0. (B) Vanuseks P0 moodustunud *CKO* hiire reetina kihid, mis ei erine *LM* hiires olevatest reetina kihtidest. (C) *LM* ja *CKO* hiirte keskmine reetina paksus. Lühendid: GCL – ganglionaarkiht, IPL – sisemine põimikkiht, NFL – närvikiudude kiht, NBL – neuroblastiline kiht. \*\*  $P < 0,01$ . Mõõtlõik 50µm.

### 2.3.10. *NestinCre;Ric8<sup>lacZ/lox</sup>* hiire reetinas on suurenenud TBR2<sup>+</sup> rakkude hulk

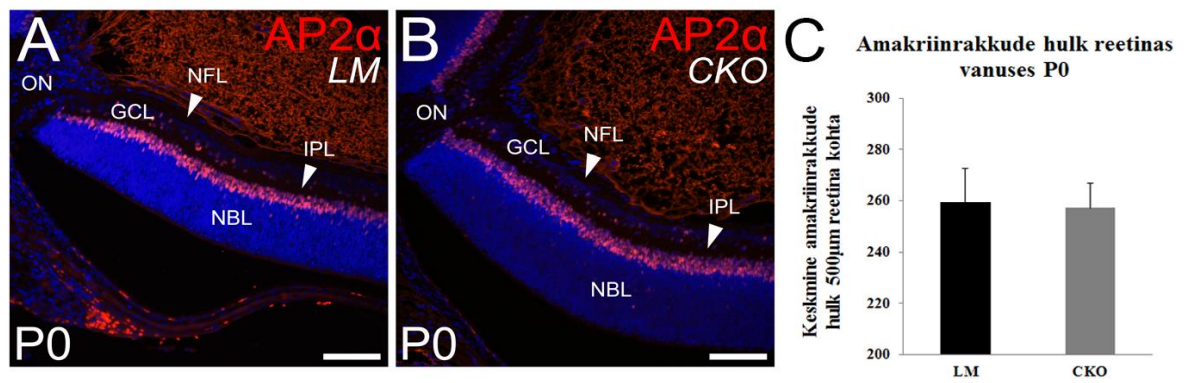
*CKO* hiire reetina oli paksem võrreldes pesakonnakaaslase reetinaga. Sellele võimaliku põhjuse leidmiseks vaadeldi edasi vanuseks P0 välja kujunenud reetina rakutüüpe. Esimestena läbivad terminaalse mitoosi reetina ganglioni rakud, mis diferentseeruvad ja migreeruvad reetina basaalsemasse ossa ning annavad aluse esimesena tekkivale ganglionaarkihile. Antud rakkude eristamiseks kasutati transkriptsiooni faktori TBR2 vastast antikeha, mida ekspresseerivad kõige varem tekkinud ganglioni rakud. Hiljem tekkinud ganglioni rakud ei ekspresseeri enam TBR2-te. Lisaks ekspresseeritakse *Tbr2*-te vähesel määral ka amakriinrakkudes ja horisontaalrakkudes, mis asuvad P0 vanuses reetina neuroblastilises kihis. Taoline rakkude erinevates kihtides paiknemine võimaldab TBR2<sup>+</sup> ganglioni rakke kergesti eristada teistest TBR2<sup>+</sup> rakutüüpidest. Nagu võis eeldada, paiknevad *LM* hiire TBR2<sup>+</sup> rakud reetina ganglionaarkihis ja neuroblastilises kihis (joonis 17A). *CKO* hiire reetina leidub samuti TBR2<sup>+</sup> rakke mõlemas reetina kihis (joonis 17B). Võimaliku erinevuse kindlaks tegemiseks *LM* (n=2) ja *CKO* (n=2) hiirte reetina ganglionaarkihis TBR2<sup>+</sup> rakkude hulgas, loendati 800µm pikkuse ganglionaarkihi TBR2<sup>+</sup> rakud. Leiti, et *CKO* hiires oli TBR2<sup>+</sup> ganglioni rakkude hulk märkimisväärselt ( $P < 0,01$ ) suurenenud reetina ganglionaarkihis (joonis 17C).



**Joonis 17.** *NestinCre;Ric8<sup>lacZ/lox</sup>* hiire P0 reetinas on TBR2<sup>+</sup> ganglioni rakkude hulk suurenenud. (A) LM hiire reetina, kus TBR<sup>+</sup> ganglioni rakud paiknevad reetina ganglionaarkihis (GCL) ja TBR2<sup>+</sup> amakriinrakud ja horisontaalrakud reetina neuroblastilises kihis (NBL). (B) CKO hiire reetina TBR2<sup>+</sup> ganglioni rakud. (C) TBR2<sup>+</sup> ganglioni rakkude hulk on suurenenud CKO hiire reetina ganglionaarkihis võrreldes LM hiire reetina. Lühend: L – lääts. \*\* P<0,01. Mõõtkava 100μm.

### 2.3.11. *NestinCre;Ric8<sup>lacZ/lox</sup>* hiire reetina amakriinrakkude hulk ei ole muutunud vanuses P0

Peale ganglioni rakkude alustavad varakult diferentseerumist ka amakriinrakud, mida vanuseks P0 enam reetina eellasrakkudest juurde ei moodustu. Amakriinrakud on selleks vanuseks migreerunud neuroblastilise kihi basaalsemasse ossa ning alustanud ganglioni rakkudega sünapside moodustamist. Selleks, et hinnata amakriinrakkude hulka ja asetust reetinas, kasutati amakriinrakkude spetsiifilist transkriptsiooni faktori AP2α vastast antikeha. Selgus, et nii LM (n=2) kui CKO (n=2) hiire reetinas on amakriinrakud paigutunud neuroblastilise kihi basaalsemasse ossa ning on moodustunud sisemine põimikkiht, mis näitab, et on kujunenud ühendused amakriinrakkude ja ganglioni rakkude vahele (joonis 18A; 18B). Reetinas olevate amakriinrakkude hulga kindlaks tegemiseks loendati AP2α<sup>+</sup> rakud, mis asetsesid 500μm pikkuse reetina neuroblastilises kihis. Vanuses P0 ei olnud CKO hiire reetina amakriinrakkude hulk muutunud võrreldes LM hiire reetina (joonis 18C).



**Joonis 18.** *NestinCre;Ric8<sup>lacZ/lox</sup>* hiire amakriinrakkude hulk ei ole muutunud vanuseks P0. (A) *LM* hiire reetinas olevad amakriinrakud, mis on paigutunud neuroblastilise kihi (NBL) basaalsemasse ossa. (B) *CKO* hiire reetina amakriinrakkude asetus ei erine *LM* hiire reetinast. (C) *LM* ja *CKO* hiirte reetina omavad võrreldavat amakriinrakkude hulka. Lühendid: ON – nägemisnärv, GCL – ganglionaarkiht, IPL – sisemine põimikkiht, NFL – närvikiudude kiht. Mõõtlõik 100µm.

## 2.4. ARUTELU

Silm on struktuuride-rohke meeleelundkonda kuuluv organ, mis vastutab väliskeskonnast saadavate valgusimpulsside vastuvõtmise ja ajju edastamise eest. Silma ehitusse kuuluvad mitmed struktuurid, mis osalevad silma funktsiooni täitmisel ja silma õige sisekeskkonna hoidmisel. Silma sisenev valgus murdub kokkupuutel sarvkestaga ning koondatakse läätse abil reetinale, et saavutada terav nägemispilt. Mitmekihiline reetina sisaldab valgustundlikke fotoretseptor-rakke, mis reageerivad spetsiifiliselt valguse intensiivsusele ja lainepikkusele (Lamb, 2013; Peichl, 2005). Valguse põhjustatud muutused fotoretseptorrakkudes on signaaliks fotoretseptoritega ühenduses olevatele neuronitele ning teistele reetina närvirakkudele, mis osalevad signaali vastuvõtmises ja edasi kandmises (Arshavsky ja Burns, 2012; Jeon jt., 1998; Masland, 2001; Sung ja Chuang, 2010). Signaal viiakse ganglioni rakkude aksonite vahendusel ajju, kus toimub valgusest saadud info töötlemine (Yu jt., 2013). Silma ehitus pannakse paika nii embrüonaalse kui postnataalse arengu käigus, mil toimub kindlatest lootekestadest silma erinevate struktuuride moodustumine. Silmas sisalduv reetina areneb neuraalplaadist ja läätse neuraalplaadi kõrval olevast plakoodi-eelsest ektodermist (Fernández-Garre jt., 2002; Saint-Jeannet ja Moody, 2014). Struktuuride vahele tekib tihe kontakt ning selle vahendusel mõjutatakse teineteise arengut (Furuta ja Hogan, 1998; Klimova ja Kozmik, 2014; Kobayashi jt., 2010). Läätses moodustub läbipaistev ja kristalliseerunud epiteelirakkudega ellipsoid, reetinast aga õhuke paljudest erinevatest rakutüüpidest koosnev kihiline närvikude (Andley, 2007; Bassnett jt., 2011; Sung ja Chuang, 2010). Kuigi läätse ja reetina puhul on ehituslikult ja funktsioonilt tegemist väga erinevate struktuuridega, toimuvad mõlemates struktuurides arengule iseloomulikud mehhanismid nagu rakkude jagunemised, apoptoos, rakkude migratsioon, rakkudevahelised signaaliülekanDED ning muutused rakkude morfoloogias ja ekspressioonis.

Osades loetletud protsessides on näidatud ka guaniini nukleotiidivahetusfaktor RIC-8 rolli, mis osaleb imetaja  $G_{\alpha i}/G_{\alpha o}$ ,  $G_{\alpha q}/G_{\alpha 11}$  ja  $G_{\alpha 12}/G_{\alpha 13}$  perekondadesse kuuluvate heterotrimeersete G-valkude  $\alpha$ -subühikute GEF-na ja *chaperonina* (Gabay jt., 2011; Nishimura jt., 2006; Tall jt., 2003). Kuna protsessid, milles RIC8 osaleb on tähtsad ka läätse ja reetina normaalses arengus on tarvis uurida RIC8 võimalikku rolli ka silma arengus. Varasemalt on näidatud, et *Ric8*<sup>-/-</sup> puudulikkus on letaalne juba gastrulatsioonis, seega saab selleks kasutada ainult *Ric8* konditsionaalset hiireliini, kus *Ric8* on välja lülitatud ainult kindlates embrüo rakkudes (Tonisoo jt., 2010). Antud töös on kasutatud RIC8 rolli uurimiseks silma arengus *NestinCre;Ric8*<sup>lacZ/lox</sup> hiireliini, kus *Ric8* ei ekspresseerita intermediaalset filamentset valku NESTIN-it ekspresseeritavates rakkudes, milleks on neuraalsed eellasrakud (Gilyarov, 2008).

RIC8 võimaliku rolli uurimiseks lüüsi ja reetina arengus tehti kindlaks, kas *Ric8* on ekspresseerunud vastavates kudedes. Varasemalt on kirjeldatud *Ric8* ekspressioon reetina embrüonaalses arengus, kuid mitte lüüsis. *Ric8* ekspresseerub reetinas alates vanusest E12.5, kui RIC8 on tuvastatav reetina epiteelis. Arengu jätkudes on *Ric8* ekspresseerunud peale neuroblastilise kihi ka postmitoosilistes rakkudes ja nende jätketes (Tikker, 2011). See näitab, et RIC8 on reetina varajases arengus ekspresseerunud eellasrakke sisaldavas reetina kihis ning diferentseeruvates rakkudes, omades võimalike rolle eellasrakkude jagunemises või rakkude signaaliradades (Tikker, 2011). Kuna varasemalt pole *Ric8* ekspressioon lüüsis kirjeldatud tehti seda käesolevas töös. Vanuses E11.5 puudus *Ric8* ekspressioon lüüsi vesiikulist täiesti, mis näitab, et RIC8 ei osale lüüsi plakoodi invagineerumisel ega lüüsi vesiikuli moodustumisel. *Ric8* ekspressioon on lüüsis tuvastatav alates vanusest E12.5 lüüsi primaarsetes fiibrites, kuid mitte lüüsi epiteelis. Hilisemates vanustes E15.5 ja P0 on *Ric8* lüüsis sekundaarsetes fiibrites, kuid jätkuvalt puudub selle ekspressioon lüüsi epiteelist. Taoline *Ric8* ekspressioonimuster lüüsi arengus viitab, et RIC8 võib osaleda lüüsi primaarsete fiibrile piknemises ja primaarsete ja sekundaarsete fiibrile diferentseerumises, kuid ei ole vajalik lüüsi epiteeli rakkude arengus.

Antud töös tehti kindlaks, kas *Ric8* konditsionaalset hiireliini *NestinCre;Ric8<sup>lacZ/lox</sup>* saab kasutada RIC8 funktsiooni uurimiseks lüüsi ja reetina arengus. Selleks tuvastati *NestinCre* ekspressioon silma arengus. Varasemates silma arengu staadiumites vanustes E9.5 ja E10.5 puudus *NestinCre* ekspressiooni olemasolevatest silma struktuuridest nagu optilisest vesiikulist ja lüüsi august. Kõige varasem *NestinCre* ekspressioon oli täheldatav vanuses E11.5 lüüsi vesiikulis ja reetinas. Vanuses E12.5 tugevnes selle ekspressioon lüüsi epiteelis ja sekundaarsetes fiibrites, kuid puudus primaarsetes fiibrites. E13.5-E14.5 on *NestinCre* tugevamini ekspresseerunud reetinas ning ka lüüsi rakkudes. Selline *NestinCre* ekspressioon muster silma arengus näitab, et *NestinCre;Ric8<sup>lacZ/lox</sup>* silmas initseeritakse Cre-rekombinaasi aktiivsus vanuses E11.5 lüüsi vesiikulis ja reetinas põhjustades neis struktuurides RIC8 valgu puudumise. Hilisemates silma arengu etappidel on RIC8 välja lüülitatud ka lüüsi epiteelis ja sekundaarsetes fiibrites ning reetinas, kuid mitte lüüsi primaarsetes fiibrites. Kuigi *Ric8* oli ekspresseerunud ka lüüsi primaarsetes fiibrites ei ole nendes rakkudes ekspresseerunud *NestinCre*, mille tõttu on *NestinCre;Ric8<sup>lacZ/lox</sup>* hiirel nendes rakkudes RIC8 ilmselt funktsionaalne. *NestinCre* on jällegi ekspresseerunud lüüsi epiteelis, kuid nendes rakkudes ei ole *Ric8* ekspresseerunud. *Ric8* ja *NestinCre* ekspressiooni erinevused ja sarnasused näitavad, et *NestinCre;Ric8<sup>lacZ/lox</sup>* hiireliini saab kasutada RIC8 rolli uurimiseks lüüsi sekundaarsete fiibrile diferentseerumises ja reetina arengus. Seda demonstreerisid ka qRT-PCR ja Western-

blot analüüs, mis näitasid, et RIC8 valgu ja *Ric8* suhteline mRNA tase on *NestinCre;Ric8<sup>lacZ/lox</sup>* hiireliini läätstes ja reetinas väiksem võrreldes pesakonnakaaslastega.

RIC8 võimaliku funktsiooni uurimiseks sekundaarsete fiibrите diferentseerumises vaadeldi läätse morfoloogiat P0 vanusetes *NestinCre;Ric8<sup>lacZ/lox</sup>* hiireliini esindajates ja tema pesakonnakaaslastes. *CKO* hiire läätse omas normaalset kuju, kuid sekundaarsete fiibrите vahel esinesid vakuoolid, mis *LM* puudusid. Taolised vakuoolid on iseloomulikud tavaliselt läätsele, mille rakkudel on adhesiooni probleemid või loomadel, kes põevad katarakti (Hsu jt., 2006; Shakespeare jt., 2009; Son jt., 2013). Näiteks läätsele, mis on defektsed Rho GTPaasi raja komponentide suhtes, on samuti näidatud taoliste vakuoolide esinemist. Rho signaalirada on rakkude adhesiooni, migratsiooni ja aktiini tsütoskeleti organiseerumise peamisi vahendajaid (Maddala jt., 2011; Maddala jt., 2004; Maddala jt., 2003; Maddala jt., 2008). RIC8-1 on varasemalt samuti näidatud osalemist rakkude adhesiooniprotsessides (Fuentealba jt., 2013). Rho signaaliraja aktiveerimises osalevad  $G_{\alpha 12}/G_{\alpha 13}$  perekonda kuuluvad G-valgud, mis aktiveerivad Rho GTPaaside spetsiifilisi guaniini nukleotiidivahetusfaktoreid (Rho-GEF-d) (Collins jt., 1996; Siehler, 2009; Suzuki jt., 2003). RIC8 ise osaleb aga GEF-na ja *chaperonina*  $G_{\alpha 12}/G_{\alpha 13}$  G-valkudele (Gabay jt., 2011; Peters ja Rogers, 2013; Tall jt., 2003) ning võib läbi nende osaleda ka Rho GTPaasi signaaliraja reguleerimises. Selline mehhanism võibki põhjustada vakuole RIC8 puudulikus läätstes.

Kuna *Ric8* defektses hiire läätstes esinesid vakuoolid, mis viitavad sekundaarsete fiibrите adhesiooni probleemidele, vaadeldi edasi läätse sekundaarsete fiibrите organiseeritust ja nende võimet migreeruda. Selleks tehti kindlaks Y-kujuliste struktuuride olemasolu läätsele, sest varasemalt on näidatud, et antud struktuurid ei moodustu, kui esinevad vead rakkude adhesioonis või kui sekundaarsete fiibrите organiseeritus või migratsioon läätse sisemusse on häiritud (Al-Ghoul jt., 2010; Son jt., 2013). *Ric8* puudulikus läätstes ei olnud moodustunud Y-kujulist struktuuri ning fiibrите olid üksteise suhtes organiseerumata. See näitab, et RIC8 on vajalik läätse sekundaarsete fiibrите migratsiooniks ja normaalseks organiseerumiseks. Lisaks on varasemalt on näidatud, et RIC8 osaleb rakkude migratsioonis, täpsemalt näidati RIC8 funktsiooni kannuskonna (*Xenopus laevis*) neuraalharja rakkude migratsioonil (Fuentealba jt., 2013). Y-kujulise struktuuri moodustumiseks on vajalik ka Rho-GTPaasi signaalirada, mille puudumisel on häiritud läätse sekundaarsete fiibrите organiseerumine ning Rho-GTPaasi defektsed hiired omavad sarnast fenotüüpi *NestinCre;Ric8<sup>lacZ/lox</sup>* mutantidega (Maddala jt., 2011). Eelnevad tulemused viitavad, et RIC8 võib osaleda läätse sekundaarsete fiibrите organiseerumises läbi Rho-GTPaasi signaaliraja.

Y-kujulise struktuuri kujunemiseks läätstes on lisaks õigele rakkude migratsioonile vajalik säilitada ka läätstes rakkudes esinev planaarne rakkude polaarsus (PCP) (Chen jt., 2008; Sugiyama jt., 2010), mistõttu pöörati tähelepanu ka planaarsele rakkude polaarsusele *NestinCre;Ric8<sup>lacZ/lox</sup>* hiirete läätstes. PCP esineb nii läätse epiteeli kui ka sekundaarsete fiibrirakkudes, kuid meetodilistel põhjustel õnnestus planaarset polaarsust jälgida ainult läätse epiteeli rakkudes. *NestinCre;Ric8<sup>lacZ/lox</sup>* hiireliini läätse epiteeli rakkudes PCP ei erinenud peakonnakaaslase omast. See võib olla põhjustatud sellest, et *Ric8* ei ole ekspresseerunud läätse epiteelis ning ei saa nendes rakkudes olla seotud planaarse polaarsuse tagamisega. Kuigi ei õnnestunud vaadelda planaarset polaarsust läätse sekundaarsetes fiibrirakkudes, kus *Ric8* on ekspresseeritud, võib RIC8 osaleda PCP tagamises reguleerides heterotrimeerseid G-valke, mis osalevad Wnt/PCP signaalirajas (Katanaev ja Tomlinson, 2006). Kuna PCP on vajalik ka läätse fiibrirakkude heksagonaalse kuju saavutamiseks, vaadeldi fiibrirakkude kuju läätse üleminekutsoonis, kus sekundaarsed fiibrirakud on alustanud diferentseerumist (Chen jt., 2008). Rakkude kujus ei esinenud silmnähtavaid erinevusi, mis näitab, et RIC8 puudulikkus ei mõjuta läätse sekundaarsete fiibrirakkude kuju muutusi diferentseerumise alguses, kuid siiski ei saa välistada, et antud rakkudes ei ole planaarses polaarsuses defekte.

RIC8 osaleb peale rakkude migratsiooni ja adhesiooni tagamise ka jagunevates rakkudes mitoosikävi orientatsiooni reguleerimises (Wang jt., 2005; Woodard jt., 2010). Seda protsessi on võimalik vaadelda ka reetina eellasrakkude puhul. Reetina eellarakud jagunevad reetina arengu käigus planaarselt ja apiko-basaalselt ning jagunemise tüübist sõltub ka mitoosikävi orientatsioon. Taoline mitoosikävi orientatsiooni muutmine võimaldab rakusaatust määravaid determinante jagada kahe tüürraku vahel võrdselt või erinevalt, mis määrab tüürraku saatuse jääda kas eellarakuks või diferentseeruda kindlaks rakutüübiks (Cayouette, 2003; Cayouette jt., 2001; Das ja Storey, 2012; Dooley jt., 2003; Imayoshi jt., 2013; Kechad jt., 2012; Tibber jt., 2006). Suutmatus kindlustada õige mitoosikävi asetus võib põhjustada tüürrakkude liigse diferentseerumise ja eellasrakkude vähenemise või muutusi erinevate rakutüüpide hulgas (Kechad jt., 2012; Zigman jt., 2005). RIC8 võimaliku rolli uurimiseks reetina eellasrakkude mitoosikävi orientatsiooni reguleerimises, vaadeldi jagunevaid eellarakke E14.5 vanuse *NestinCre;Ric8<sup>lacZ/lox</sup>* hiireliini reetinas. Antud vanuses esinesid *Ric8* defektsetes reetinas nii apiko-basaalsed kui ka planaarsed jagunemised ning nende hulk ei olnud muutunud võrreldes pesakonnakaaslastega. See näitab, et *Ric8* puudumine ei mõjuta selles vanuses mitoosikävi asetust reetina eellasrakkudes, kuid ei välista *Ric8* vajalikkust reetina hilisemateel arengu perioodidel.

Tegemaks kindlaks, kuidas RIC8 puudulikkus on mõjutanud reetina arengut, vaadeldi P0 vanuse hiire reetina morfoloogiat, paksust ja erinevaid rakutüüpe. *Ric8* puudumisele vaatamata on reetinale selleks vanuseks iseloomulikud kihid moodustunud, kuid *NestinCre;Ric8<sup>lacZ/lox</sup>* hiireliini reetina on paksem. See näitab, et *Ric8* puudumine on mõjutanud osade reetina rakkude arengut. Selgitamaks välja, missuguste rakkude areng on sõltuv RIC8-st, tehti kindlaks reetina ganglioni rakkude ja amakriinrakkude hulk. *Ric8* defektse reetinas oli suurenenud ganglioni rakkude hulk, kuid amakriinrakkude arv sarnanes pesakonnakaaslase omaga, mis viitab, et *NestinCre;Ric8<sup>lacZ/lox</sup>* hiireliini paksem reetina võib olla põhjustatud suuremast ganglioni rakkude hulgast. Ganglioni rakkude suurem hulk võib aga olla põhjustatud reetina eellasrakkude vales mitoosikävi orientatsioonist teistes vanuses, kui vaadeldud E14.5 või RIC8 osalusest reetina rakkude diferentseerumises. Samas ei ole välistatud, et RIC8 on vajalik mõne teise reetina rakutüübi arenguks kuna vanuseks P0 ei ole reetina areng lõpuni jõudnud ning kõik rakutüübid ei ole veel moodustunud.

Läbiviidud katsed näitavad, et RIC8 omab oma iseloomulike funktsioone ka läätse ja reetina arengus olles vajalik läätse normaalse organiseerituse ja reetina rakutüüpide õige vahekorra tagamises. Selle tõttu on RIC8 hädavajalik ka silma põhifunktsiooni garanteerimises, sest *Ric8* puudumine põhjustab läätse fenotüübi, mis ei ole võimeline valgust normaalset läbi laskma ning koondama reetinale. Samas sisaldab *Ric8<sup>-/-</sup>* reetina vales vahekorras erinevaid rakutüüpe, mis tooks kaasa häired signaali edasikandmises reetina rakkude vahel, kuid see vajab täpsemat uurimist järgmistes katsetes.

## KOKKUVÕTE

Käesolevas magistritöös uuriti guaniini nukleotiidivahetusfaktori RIC8 funktsiooni koduhiire (*Mus musculus*) läätse ja reetina arengus. Selle töö käigus tehti kindlaks *Ric8* ekspressioon läätse primaarsetes ja sekundaarsetes fiiber-rakkudes kogu arengu vältel. Samuti kontrolliti *NestinCre* ekspressiooni olemasolu läätse ja reetina varajases arengus, mis võimaldas kasutada edasises töös *Ric8* konditsionaalset hiireliini *NestinCre;Ric8<sup>lacZlox</sup>*, kus *Ric8* ekspressioon oli nii läätstes kui ka reetinas vähenenud. *Ric8* ekspressiooni vähenemise põhjustas läätstes sekundaarsete fiibrите vaheliste vakuoolide tekke ning fiibrите ebakorrapärasest organiseeritust. Sellele vaatamata oli säilinud sekundaarsete fiibrите normaalne kuju ning läätse epiteeli rakkude planaarne polariseeritus. See näitab, et RIC8 mängib rolli just läätse sekundaarsete fiibrите diferentseerumises, olles vajalik nende migratsioonis ja adhesioonis, kuid ei ole vajalik läätse epiteeli rakkude diferentseerumiseks ja planaarse polaarsuse tagamiseks. *Ric8* ekspressiooni puudumine reetinas ei tekitanud vanuses E14.5 muutusi eellasrakkude mitoosikävi orientatsioonis. Sellest hoolimata oli *Ric8* puudumine vanuseks P0 siiski põhjustanud paksema reetina, kus oli suurenenud reetina ganglioni rakkude hulk, kuid mitte amakriinrakkude arv. See näitab, et RIC8 mõjutab reetina arengu jooksul eellasrakkude jagunemist.

## Function of RIC8 in the development of mouse (*Mus musculus*) lens and retina

Laura Tikker

### Summary

Present thesis examined the function of guanine nucleotide exchange factor RIC8 in development of mouse (*Mus musculus*) lens and retina. Experiments in this study show that *Ric8* is expressed in lens primary and secondary fiber cells throughout lens development. Also, the expression of *NestinCre* was confirmed in the same areas. Therefore, it was possible to use *Ric8* conditional knock-out mouse line *NestinCre;Ric8<sup>lacZlox</sup>*, to study the function of RIC8 in lens and retina. Decrease in *Ric8* expression in lens resulted in vacuoles between secondary fiber cells and abnormal arrangement of those fibers. Regardless, the shape of secondary fibers and planar cell polarity of lens epithelial cells had maintained normal. This confirms the role of RIC8 specifically in differentiation of lens secondary fibers and indicates that RIC8 is necessary for their right migration and adhesion but is not needed in differentiation or planar cell polarity of lens epithelial cells. Lack in expression of *Ric8* in retina does not affect the orientation of mitotic spindle in progenitor cells in E14.5 retina. Despite of this, downregulation of *Ric8* expression in retina caused thicker retina in P0 old mutant mice. The thicker retina contained more ganglion cells than in littermate controls, but the amount of amacrine cells had not changed. These results indicate that RIC8 influences the division of progenitor cells in the development of retina.

## TÄNUSÕNAD

Sooviksin tänada oma häid magistritöö juhendajad Merly Saare't, Keiu Kask'e ja Tambet Tõnissoo'd! Samuti on väga suurt tänu väärt Riho Meier ja Katrin Ruisu, kelle ideedeta ja abita poleks antud töö valminud.

Meetodite läbiviimises aitasid kaasa Toomas Jagomäe, Sirje Lulla, Triin Tekko, Kersti Lilleväli ja Mall Kure. Samuti tänan kõiki meie laborikaaslasi.

Sooviksin tänada ka kõiki Tartu Ülikooli õppejõude, kes jagasid oma teadmisi ning alati innustasid.

Laura Tikker

Antud magistritööga tegelenud inimeste enda mõtted:

„Kõige rohkem tahaks tänada Katrin Ruisut, kes on täiega ilus ja hea. Ülejäänud käigu pekki.“ – Katrin Ruisu

"Tahaksin ainult tänada Toomas Jagomäe'd, kes oli antud töö valmimisel võtmeisikuks. Tema geniaalsed mõtted inspireerisid mind semestrist-semestrisse. Peale selle on tal väga lahedad prillid. Katrin on jah täiega ilus ja hea, aga tema koos teistega käigu pekki! Tom on lahe" – Toomas Jagomäe

„Samas tahaks hea sõnaga meenutada ka Tambet Tõnissoo'd ehkki ta on seksistlik siga ja empaatiavõimetu imbetsill ja üleüldse käib närvidele, aga samas kuradi hea iseloomuga ja jube tark ja oskab ilusasti öelda...“ – Tambet Tõnissoo

„Ja kõige lõppu võiks ju paar sõna öelda ka mu põhijuhendaja Keiu Kase kohta, kuigi ei tea kas tasub. Aga noh, arvestades seda, et ta on täiega printsess ja naerab palju, siis loomulikult tuleks siia kamaluga kiidusõnu laduda.“ – Keiu Kask

## KASUTATUD KIRJANDUS

Afonso, C., Henrique, D. (2006). PAR3 acts as a molecular organizer to define the apical domain of chick neuroepithelial cells. *Journal of Cell Science* **119**, 4293-4304.

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

Ahmad, N., Aslam, M., Muenster, D., Horsch, M., Khan, M. A., Carlsson, P., Beckers, J., Graw, J. (2013). Pitx3 directly regulates Foxe3 during early lens development. *The International journal of developmental biology* **57**, 741-751.

Al-Ghoul, K. J., Lindquist, T. P., Kirk, S. S., Donohue, S. T. (2010). A novel terminal web-like structure in cortical lens fibers: architecture and functional assessment. *Anatomical record* **293**, 1805-1815.

Andley, U. P. (2007). Crystallins in the eye: Function and pathology. *Progress in retinal and eye research* **26**, 78-98.

Arshavsky, V. Y., Burns, M. E. (2012). Photoreceptor signaling: supporting vision across a wide range of light intensities. *The Journal of biological chemistry* **287**, 1620-1626.

Bailey, A. P., Bhattacharyya, S., Bronner-Fraser, M., Streit, A. (2006). Lens specification is the ground state of all sensory placodes, from which FGF promotes olfactory identity. *Developmental cell* **11**, 505-517.

Barbieri, A. M., Lupo, G., Bulfone, A., Andreazzoli, M., Mariani, M., Fougerousse, F., Consalez, G. G., Borsani, G., Beckmann, J. S., Barsacchi, G., Ballabio, A., Banfi, S. (1999). A homeobox gene, *vax2*, controls the patterning of the eye dorsoventral axis. *PNAS* **96**, 10729-10734.

Bassnett, S., Shi, Y., Vrensen, G. F. (2011). Biological glass: structural determinants of eye lens transparency. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **366**, 1250-1264.

Bäumer, N., Marquardt, T., Stoykova, A., Ashery-Padan†, R., Chowdhury, K., Gruss, P. (2002). Pax6 is required for establishing naso-temporal and dorsal characteristics of the optic vesicle. *Development* **129**, 4535-4545.

Baye, L. M., Link, B. A. (2008). Nuclear migration during retinal development. *Brain research* **1192**, 29-36.

Beebe, D. C., Feagans, D. E., Jebens, H. A. H. (1980). Lentropin: A factor in vitreous humor which promotes lens fiber cell differentiation. *PNAS* **77**, 490-493.

Bharti, K., Liu, W., Csermely, T., Bertuzzi, S., H., A. (2008). Alternative promoter use in eye development: complex role and regulation of the transcription factor MITF. *Development* **135**, 1169-1178.

Bhattacharyya, S., Bronner-Fraser, M. (2008). Competence, specification and commitment to an olfactory placode fate. *Development* **135**, 4165-4177.

Borges, R. M., Lamers, M. L., Forti, F. L., Santos, M. F., Yan, C. Y. (2011). Rho signaling pathway and apical constriction in the early lens placode. *Genesis* **49**, 368-379.

Boswell, B. A., Overbeek, P. A., Musil, L. S. (2008). Essential role of BMPs in FGF-induced secondary lens fiber differentiation. *Developmental Biology* **324**, 202-212.

Braga, V. M. M., Machesky, L. M., Hall, A., Hotchin, N. A. (1997). The Small GTPases Rho and Rac Are Required for the Establishment of Cadherin-dependent Cell-Cell Contacts. *The Journal of Cell Biology* **137**, 1421-1431.

Brown, N. L., Patel, S., Brzezinski, J., Glaser, T. (2001). Math5 is required for retinal ganglion cell and optic nerve formation. *Development* **128**, 2497-2508.

Brzezinski, J. A. t., Prasov, L., Glaser, T. (2012). Math5 defines the ganglion cell competence state in a subpopulation of retinal progenitor cells exiting the cell cycle. *Developmental Biology* **365**, 395-413.

Cappello, S., Attardo, A., Wu, X., Iwasato, T., Itohara, S., Wilsch-Brauninger, M., Eilken, H. M., Rieger, M. A., Schroeder, T. T., Huttner, W. B., Brakebusch, C., Gotz, M. (2006). The Rho-GTPase cdc42 regulates neural progenitor fate at the apical surface. *Nature neuroscience* **9**, 1099-1107.

Cavodeassi, F., Ivanovitch, K., Wilson, S. W. (2013). Eph/Ephrin signalling maintains eye field segregation from adjacent neural plate territories during forebrain morphogenesis. *Development* **140**, 4193-4202.

Cayouette, M. (2003). The orientation of cell division influences cell-fate choice in the developing mammalian retina. *Development* **130**, 2329-2339.

Cayouette, M., Whitmore, A. V., Jeffery, G., Raff, M. (2001). Asymmetric Segregation of Numb in Retinal Development and the Influence of the Pigmented Epithelium. *The Journal of Neuroscience* **21**, 5643-5651.

Chauhan, B. K., Lou, M., Zheng, Y., Lang, R. A. (2011). Balanced Rac1 and RhoA activities regulate cell shape and drive invagination morphogenesis in epithelia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 18289-18294.

Chen, Y., Stump, R. J., Lovicu, F. J., Shiono, A., McAvoy, J. W. (2008). Wnt signaling is required for organization of the lens fiber cell cytoskeleton and development of lens three-dimensional architecture. *Developmental Biology* **324**, 161-176.

Clark, B. S., Cui, S., Miesfeld, J. B., Klezovitch, O., Vasioukhin, V., Link, B. A. (2012). Loss of Llg11 in retinal neuroepithelia reveals links between apical domain size, Notch activity and neurogenesis. *Development* **139**, 1599-1610.

Collins, L. R., Minden, A., Karin, M., Brown, J. H. (1996). Gα12 Stimulates c-Jun NH2-terminal Kinase through the Small G Proteins Ras and Rac. *The Journal of biological chemistry* **271**, 17349-17353.

Couwenbergs, C., Spilker, A. C., Gotta, M. (2004). Control of embryonic spindle positioning and Galpha activity by *C. elegans* RIC-8. *Current biology : CB* **14**, 1871-1876.

Das, R. M., Storey, K. G. (2012). Mitotic spindle orientation can direct cell fate and bias Notch activity in chick neural tube. *EMBO reports* **13**, 448-454.

Dave, R. K., Ellis, T., Toumpas, M. C., Robson, J. P., Julian, E., Adolphe, C., Bartlett, P. F., Cooper, H. M., Reynolds, B. A., Wainwright, B. J. (2011). Sonic hedgehog and notch signaling can cooperate to regulate neurogenic divisions of neocortical progenitors. *PloS one* **6**, e14680.

David, N. B., Martin, C. A., Segalen, M., Rosenfeld, F., Schweisguth, F., Bellaiche, Y. (2005). *Drosophila* Ric-8 regulates Galphai cortical localization to promote Galphai-dependent planar orientation of the mitotic spindle during asymmetric cell division. *Nature cell biology* **7**, 1083-1090.

Dooley, C. M., James, J., Jane McGlade, C., Ahmad, I. (2003). Involvement of numb in vertebrate retinal development: evidence for multiple roles of numb in neural differentiation and maturation. *Journal of neurobiology* **54**, 313-325.

Downs, K. M., Davies, T. (1993). Staging of gastrulating mouse embryos by morphological landmarks in the dissecting microscope. *Development* **118**, 1255-1266.

Du, Q., Macara, I. G. (2004). Mammalian Pins is a conformational switch that links NuMA to heterotrimeric G proteins. *Cell* **119**, 503-516.

Dyer, M. A., Livesey, F. J., Cepko, C. L., Oliver, G. (2003). Prox1 function controls progenitor cell proliferation and horizontal cell genesis in the mammalian retina. *Nature Genetics* **34**, 53-58.

Faber, S. C., Robinson, M. L., Makarenkova, H. P., Lang1, R. A. (2002). Bmp signaling is required for development of primary lens fiber cells. *Development* **129**, 3727-3737.

Fenech, C., Patrikainen, L., Kerr, D. S., Grall, S., Liu, Z., Laugrette, F., Malnic, B., Montmayeur, J. P. (2009). Ric-8A, a G $\alpha$  protein guanine nucleotide exchange factor potentiates taste receptor signaling. *Frontiers in cellular neuroscience* **3**, 11.

Feng, L., Eisenstat, D. D., Chiba, S., Ishizaki, Y., Gan, L., Shibasaki, K. (2011). Brn-3b inhibits generation of amacrine cells by binding to and negatively regulating DLX1/2 in developing retina. *Neuroscience* **195**, 9-20.

Feng, L., Xie, Z. H., Ding, Q., Xie, X., Libby, R. T., Gan, L. (2010). MATH5 controls the acquisition of multiple retinal cell fates. *Molecular brain* **3**, 36.

Fernández-Garre, P., Rodríguez-Gallardo, L., Gallego-Díaz, V., S. Alvarez, I., Puelles, L. (2002). Fate map of the chicken neural plate at stage 4. *Development* **129**, 2807-2822.

Formosa-Jordan, P., Ibanes, M., Ares, S., Frade, J. M. (2013). Lateral inhibition and neurogenesis: novel aspects in motion. *The International journal of developmental biology* **57**, 341-350.

Fu, X., Kiyama, T., Li, R., Russell, M., Klein, W. H., Mu, X. (2009). Epitope-tagging Math5 and Pou4f2: new tools to study retinal ganglion cell development in the mouse. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **238**, 2309-2317.

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., Torrejon, M. (2013). Ric-8A, a guanine nucleotide exchange factor for heterotrimeric G proteins, is critical for cranial neural crest cell migration. *Developmental Biology* **378**, 74-82.

Furuta, Y., Hogan, B. L. M. (1998). BMP4 is essential for lens induction in the mouse embryo. *Genes & Development* **12**, 3764-3775.

Gabay, M., Pinter, M. E., Wright, F. A., Chan, P., Murphy, A. J., Valenzuela, D. M., Yancopoulos, G. D., Tall, G. G. (2011). Ric-8 proteins are molecular chaperones that direct nascent G protein alpha subunit membrane association. *Science signaling* **4**, ra79.

Garcia, C. M., Huang, J., Madakashira, B. P., Liu, Y., Rajagopal, R., Dattilo, L., Robinson, M. L., Beebe, D. C. (2011). The function of FGF signaling in the lens placode. *Developmental Biology* **351**, 176-185.

Garcia, C. M., Yu, K., Zhao, H., Ashery-Padan, R., Ornitz, D. M., Robinson, M. L., Beebe, D. C. (2005). Signaling through FGF receptor-2 is required for lens cell survival and for withdrawal from the cell cycle during lens fiber cell differentiation. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **233**, 516-527.

Giannaccini, M., Giudetti, G., Biasci, D., Mariotti, S., Martini, D., Barsacchi, G., Andreazzoli, M. (2013). Brief Report: Rx1 Defines Retinal Precursor Identity by Repressing Alternative Fates Through the Activation of TLE2 and Hes4. *STEM CELLS* **31**, 2842-2847.

Gilyarov, A. V. (2008). Nestin in Central Nervous System Cells. *Neuroscience and Behavioral Physiology* **38**, 165-169.

Hallonet, M., Hollemann, T., Pieler, T., Gruss, P. (1999). Vax1, a novel homeobox-containing gene, directs development of the basal forebrain and visual system. *Genes & Development* **13**, 3106-3114.

Hampoelz, B., Hoeller, O., Bowman, S. K., Dunican, D., Knoblich, J. A. (2005). Drosophila Ric-8 is essential for plasma-membrane localization of heterotrimeric G proteins. *Nature cell biology* **7**, 1099-1105.

Hatakeyama, J., Tomita, K., Inoue, T., Kageyama, R. (2001). Roles of homeobox and bHLH genes in specification of a retinal cell type. *Development* **128**, 1313-1322.

Hess, H. A., Roper, J. C., Grill, S. W., Koelle, M. R. (2004). RGS-7 completes a receptor-independent heterotrimeric G protein cycle to asymmetrically regulate mitotic spindle positioning in *C. elegans*. *Cell* **119**, 209-218.

Horsford, D. J., Nguyen, M. T., Sellar, G. C., Kothary, R., Arnheiter, H., McInnes, R. R. (2005). Chx10 repression of Mitf is required for the maintenance of mammalian neuroretinal identity. *Development* **132**, 177-187.

Hsu, C.-D., Kymes, S., Petrash, J. M. (2006). A Transgenic Mouse Model for Human Autosomal Dominant Cataract. *Investigative ophthalmology & visual science* **47**, 2036-2044.

Imayoshi, I., Shimojo, H., Sakamoto, M., Ohtsuka, T., Kageyama, R. (2013). Genetic visualization of notch signaling in mammalian neurogenesis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **70**, 2045-2057.

Inoue, T., Hojo, M., Bessho, Y., Tano, Y., Lee, J. E., Kageyama, R. (2002). Math3 and NeuroD regulate amacrine cell fate specification in the retina. *Development* **129**, 831-842.

Jarrin, M., Pandit, T., Gunhaga, L. (2012). A balance of FGF and BMP signals regulates cell cycle exit and Equarin expression in lens cells. *Molecular biology of the cell* **23**, 3266-3274.

Jeon, C.-J., Strettoi, E., Masland, R. H. (1998). The Major Cell Populations of the Mouse Retina. *The Journal of Neuroscience* **18**, 8936-8946.

Jia, M., Li, J., Zhu, J., Wen, W., Zhang, M., Wang, W. (2012). Crystal structures of the scaffolding protein LGN reveal the general mechanism by which GoLoco binding motifs inhibit the release of GDP from Galphai. *The Journal of biological chemistry* **287**, 36766-36776.

Jones, C., Chen, P. (2007). Planar cell polarity signaling in vertebrates. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **29**, 120-132.

Kaibuchi, K., Kuroda, S., Amano, M. (1999). Regulation Of The Cytoskeleton and Cell Adhesion By The Rho Family GTPases In mammalian Cells. *Annual Review of Biochemistry*. **68**, 459-486.

Kanesaki, T., Hirose, S., Grosshans, J., Fuse, N. (2013). Heterotrimeric G protein signaling governs the cortical stability during apical constriction in *Drosophila* gastrulation. *Mechanisms of development* **130**, 132-142.

Kask, K. 2010. Nukleotiidi vahetusfaktor Ric-8 uurimine imetajate neurogeneesis ja NestinCre;Ric-8lacZ/lox hiireliini iseloomustamine. Magistritöö.

Katanaev, V. L., Tomlinson, A. (2006). Multiple Roles of a Trimeric G Protein in *Drosophila* Cell Polarization. *Cell Cycle* **5**, 2464-2472.

Kechad, A., Jolicoeur, C., Tufford, A., Mattar, P., Chow, R. W., Harris, W. A., Cayouette, M. (2012). Numb is required for the production of terminal asymmetric cell divisions in the developing mouse retina. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **32**, 17197-17210.

Klimova, L., Kozmik, Z. (2014). Stage-dependent requirement of neuroretinal Pax6 for lens and retina development. *Development* **141**, 1292-1302.

Kobayashi, T., Yasuda, K., Araki, M. (2010). Coordinated regulation of dorsal bone morphogenetic protein 4 and ventral Sonic hedgehog signaling specifies the dorso-ventral polarity in the optic vesicle and governs ocular morphogenesis through fibroblast growth factor 8 upregulation. *Development, growth & differentiation* **52**, 351-363.

Koshiba-Takeuchi, K. (2000). Tbx5 and the Retinotectum Projection. *Science* **287**, 134-137.

Kotak, S., Busso, C., Gonczy, P. (2012). Cortical dynein is critical for proper spindle positioning in human cells. *Journal of Cell Biology* **199**, 97-110.

Kuszak, J. R., Zoltoski, R. K., Tiedemann, C. E. (2004). Development of lens sutures. *The International journal of developmental biology* **48**, 889-902.

Lamb, T. D. (2013). Evolution of phototransduction, vertebrate photoreceptors and retina. *Progress in retinal and eye research* **36**, 52-119.

Leconte, L., Lecoin, L., Martin, P., Saule, S. (2004). Pax6 interacts with cVax and Tbx5 to establish the dorsoventral boundary of the developing eye. *The Journal of biological chemistry* **279**, 47272-47277.

Lelievre, E. C., Lek, M., Boije, H., Houille-Vernes, L., Brajeul, V., Slembrouck, A., Roger, J. E., Sahel, J. A., Matter, J. M., Sennlaub, F., Hallbook, F., Goureau, O., Guillonnet, X. (2011). Ptf1a/Rbpj complex inhibits ganglion cell fate and drives the specification of all horizontal cell subtypes in the chick retina. *Developmental Biology* **358**, 296-308.

Leonard, M., Zhang, L., Zhai, N., Cader, A., Chan, Y., Nowak, R. B., Fowler, V. M., Menko, A. S. (2011). Modulation of N-cadherin junctions and their role as epicenters of differentiation-specific actin regulation in the developing lens. *Developmental Biology* **349**, 363-377.

Li, H., Tierney, C., Wen, L., Wu, J. Y., Rao, Y. (1997). A single morphogenetic field gives rise to two retina primordia under the influence of the prechordal plate. *Development* **124**, 603-615.

Li, R., Wu, F., Ruonala, R., Sapkota, D., Hu, Z., Mu, X. (2014). Isl1 and Pou4f2 form a complex to regulate target genes in developing retinal ganglion cells. *PloS one* **9**, e92105.

Liu, W., Lagutin, O. V., Mende, M., Streit, A., Oliver, G. (2006). Six3 activation of Pax6 expression is essential for mammalian lens induction and specification. *The EMBO Journal* **25**, 5383-5395.

Livesey, F. J., Cepko, C. L. (2001). Vertebrate Neural Cell-Fate Determination: Lessons From The Retina. *Nature Review Neuroscience* **2**, 109-118.

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. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **32**, 14979-14993.

Macdonald, R., Barth, K. A., Xu, Q., Holder, N., Mikkola, I., Wilson, S. W. (1995). Midline signalling is required for Pax gene regulation and patterning of the eyes. *Development* **121**, 3267-3278.

Maddala, R., Chauhan, B. K., Walker, C., Zheng, Y., Robinson, M. L., Lang, R. A., Rao, P. V. (2011). Rac1 GTPase-deficient mouse lens exhibits defects in shape, suture formation, fiber cell migration and survival. *Developmental Biology* **360**, 30-43.

Maddala, R., Deng, P. F., Costello, J. M., Wawrousek, E. F., Zigler, J. S., Rao, V. P. (2004). Impaired cytoskeletal organization and membrane integrity in lens fibers of a Rho GTPase functional knockout transgenic mouse. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **84**, 679-692.

Maddala, R., Reddy, V. N., Epstein, D. L., Rao, V. (2003). Growth factor induced activation of Rho and Rac GTPases and actin cytoskeletal reorganization in human lens epithelial cells. *Molecular Vision* **9**, 329-336.

Maddala, R., Reneker, L. W., Pendurthi, B., Rao, P. V. (2008). Rho GDP dissociation inhibitor-mediated disruption of Rho GTPase activity impairs lens fiber cell migration, elongation and survival. *Developmental Biology* **315**, 217-231.

Maeda, A., Moriguchi, T., Hamada, M., Kusakabe, M., Fujioka, Y., Nakano, T., Yoh, K., Lim, K. C., Engel, J. D., Takahashi, S. (2009). Transcription factor GATA-3 is essential for lens development. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists* **238**, 2280-2291.

Mao, C. A., Kiyama, T., Pan, P., Furuta, Y., Hadjantonakis, A. K., Klein, W. H. (2008). Eomesodermin, a target gene of Pou4f2, is required for retinal ganglion cell and optic nerve development in the mouse. *Development* **135**, 271-280.

Martinez-Morales, J. R., Signore, M., Acampora, D., Simeone, A., Bovolenta, P. (2001). Otx genes are required for tissue specification in the developing eye. *Development* **128**, 2019-2030.

Masland, R. H. (2001). The fundamental plan of the retina. *Nature neuroscience* **4**, 877-886.

Matsuda, M., Keino, H. (2001). Possible roles of  $\beta$ -catenin in evagination of the optic primordium in rat embryos. *Development Growth and Differentiation* **43**, 391-400.

Matsushima, D., Heavner, W., Pevny, L. H. (2011). Combinatorial regulation of optic cup progenitor cell fate by SOX2 and PAX6. *Development* **138**, 443-454.

Mayor, R., Theveneau, E. (2014). The role of the non-canonical Wnt-planar cell polarity pathway in neural crest migration. *The Biochemical journal* **457**, 19-26.

Medina-Martinez, O., Brownell, I., Amaya-Manzanares, F., Hu, Q., Behringer, R. R., Jamrich, M. (2005). Severe defects in proliferation and differentiation of lens cells in Foxe3 null mice. *Molecular and cellular biology* **25**, 8854-8863.

Miller, K. G., Emerson, M. D., McManus, J. R., Rand, J. B. (2000). RIC-8 (Synembryn): A Novel Conserved Protein that Is Required for Gq Signaling in the *C. elegans* Nervous System. *Neuron* **27**, 289-299.

Mitchell, D. C., Bryan, B. A., Liu, J.-P., Liu, W.-B., Zhang, L., Qu, J., Zhou, X., Liu, M., Li, D. W. (2007). Developmental expression of three small GTPases in the mouse eye. *Molecular Vision* **13**, 1144-1153.

Mu, X., Fu, X., Beremand, P. D., Thomas, T. L., Klein, W. H. (2008). Gene regulation logic in retinal ganglion cell development: Isl1 defines a critical branch distinct from but overlapping with Pou4f2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 6942-6947.

Mui, S. H., Kim, J. W., Lemke, G., Bertuzzi, S. (2005). Vax genes ventralize the embryonic eye. *Genes & Development* **19**, 1249-1259.

Muto, A., Iida, A., Satoh, S., Watanabe, S. (2009). The group E Sox genes Sox8 and Sox9 are regulated by Notch signaling and are required for Muller glial cell development in mouse retina. *Experimental eye research* **89**, 549-558.

Nishida, A., Furukawa, A., Koike, C., Tano, Y., Aizawa, S., Matsuo, I., Furukawa, T. (2003). Otx2 homeobox gene controls retinal photoreceptor cell fate and pineal gland development. *Nature neuroscience* **6**, 1255-1263.

Nishihara, D., Yajima, I., Tabata, H., Nakai, M., Tsukiji, N., Katahira, T., Takeda, K., Shibahara, S., Nakamura, H., Yamamoto, H. (2012). Otx2 Is Involved in the Regional Specification of the Developing Retinal Pigment Epithelium by Preventing the Expression of Sox2 and Fgf8, Factors That Induce Neural Retina Differentiation. *PloS one* **7**, e48879.

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 to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* **11**, 487-498.

Ogino, H., Ochi, H., Reza, H. M., Yasuda, K. (2012). Transcription factors involved in lens development from the preplacodal ectoderm. *Developmental Biology* **363**, 333-347.

Ohsaki, K., Morimitsu, T., Ishida, Y., Kominami, R., Takahashi, N. (1999). Expression of the Vax family homeobox genes suggests multiple roles in eye development. *Genes to Cells* **4**, 267-276.

Ou, J., Bharti, K., Nodari, A., Bertuzzi, S., Arnheiter, H. (2013). Vax1/2 genes counteract Mitf-induced respecification of the retinal pigment epithelium. *PloS one* **8**, e59247.

Peichl, L. (2005). Diversity of mammalian photoreceptor properties: adaptations to habitat and lifestyle? *The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology* **287**, 1001-1012.

Peters, K. A., Rogers, S. L. (2013). Drosophila Ric-8 interacts with the Galpha12/13 subunit, Concertina, during activation of the Folded gastrulation pathway. *Molecular biology of the cell* **24**, 3460-3471.

Peyre, E., Jaouen, F., Saadaoui, M., Haren, L., Merdes, A., Durbec, P., Morin, X. (2011). A lateral belt of cortical LGN and NuMA guides mitotic spindle movements and planar division in neuroepithelial cells. *Journal of Cell Biology* **193**, 141-154.

Plageman, T. F., Jr., Chauhan, B. K., Yang, C., Jaudon, F., Shang, X., Zheng, Y., Lou, M., Debant, A., Hildebrand, J. D., Lang, R. A. (2011). A Trio-RhoA-Shroom3 pathway is required for apical constriction and epithelial invagination. *Development* **138**, 5177-5188.

Plageman, T. F., Jr., Chung, M. I., Lou, M., Smith, A. N., Hildebrand, J. D., Wallingford, J. B., Lang, R. A. (2010). Pax6-dependent Shroom3 expression regulates apical constriction during lens placode invagination. *Development* **137**, 405-415.

Pontoriero, G. F., Deschamps, P., Ashery-Padan, R., Wong, R., Yang, Y., Zavadil, J., Cvekl, A., Sullivan, S., Williams, T., West-Mays, J. A. (2008). Cell Autonomous Roles for AP-2 $\alpha$  in Lens Vesicle Separation and Maintenance of the Lens Epithelial Cell Phenotype. *Developmental Dynamics* **237**, 602-617.

Postiglione, M. P., Juschke, C., Xie, Y., Haas, G. A., Charalambous, C., Knoblich, J. A. (2011). Mouse inscuteable induces apical-basal spindle orientation to facilitate intermediate progenitor generation in the developing neocortex. *Neuron* **72**, 269-284.

Prasov, L., Glaser, T. (2012). Dynamic expression of ganglion cell markers in retinal progenitors during the terminal cell cycle. *Molecular and cellular neurosciences* **50**, 160-168.

Rajagopal, R., Huang, J., Dattilo, L. K., Kaartinen, V., Mishina, Y., Deng, C. X., Umans, L., Zwijsen, A., Roberts, A. B., Beebe, D. C. (2009). The type I BMP receptors, *Bmpr1a* and *Acvr1*, activate multiple signaling pathways to regulate lens formation. *Developmental Biology* **335**, 305-316.

Ring, B. Z., Cordes, S. P., Overbeek, P. A., Barsh, G. S. (2000). Regulation of mouse lens fiber cell development and differentiation by the *Maf* gene. *Development* **127**, 307-317.

Ruisu, K., Kask, K., Meier, R., Saare, M., Raid, R., Veraksits, A., Karis, A., Tonissoo, T., Pooga, M. (2013). Ablation of *RIC8A* function in mouse neurons leads to a severe neuromuscular phenotype and postnatal death. *PloS one* **8**, e74031.

Saint-Jeannet, J. P., Moody, S. A. (2014). Establishing the pre-placodal region and breaking it into placodes with distinct identities. *Developmental Biology* **389**, 13-27.

Schwarz, M., Cecconi, F., Bernier, G., Andrejewski, N., Kammandel, B., Wagner, M., Gruss, P. (2000). Spatial specification of mammalian eye territories by reciprocal transcriptional repression of *Pax2* and *Pax6*. *Development* **127**, 4325-4334.

Shakespeare, T. I., Sellitto, C., Li, L., Rubinos, C., Gong, X., Srinivas, M., White, T. W. (2009). Interaction between *Connexin50* and mitogen-activated protein kinase signaling in lens homeostasis. *Molecular biology of the cell* **20**, 2582-2592.

Siehler, S. (2009). Regulation of RhoGEF proteins by G12/13-coupled receptors. *British journal of pharmacology* **158**, 41-49.

Singh, J., Mlodzik, M. (2012). Planar cell polarity signaling: coordination of cellular orientation across tissues. *Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology* **1**, 479-499.

Son, A. I., Cooper, M. A., Sheleg, M., Sun, Y., Kleiman, N. J., Zhou, R. (2013). Further analysis of the lens of *ephrin-A5<sup>-/-</sup>* mice: development of postnatal defects. *Molecular Vision* **19**, 254-266.

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

Spana, E. P., Doe, C. Q. (1996). *Numb* Antagonizes Notch Signaling to Specify Sibling Neuron Cell Fates. *Neuron* **17**, 21-26.

Stump, R. J. W., Ang, S., Chen, Y., von Bahr, T., Lovicu, F. J., Pinson, K., de Iongh, R. U., Yamaguchi, T. P., Sassoan, D. A., McAvoy, J. W. (2003). A role for Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in lens epithelial differentiation. *Developmental Biology* **259**, 48-61.

Suga, A., Taira, M., Nakagawa, S. (2009). LIM family transcription factors regulate the subtype-specific morphogenesis of retinal horizontal cells at post-migratory stages. *Developmental Biology* **330**, 318-328.

Sugiyama, Y., Lovicu, F. J., McAvoy, J. W. (2011). Planar cell polarity in the mammalian eye lens. *Organogenesis* **7**, 191-201.

Sugiyama, Y., Stump, R. J., Nguyen, A., Wen, L., Chen, Y., Wang, Y., Murdoch, J. N., Lovicu, F. J., McAvoy, J. W. (2010). Secreted frizzled-related protein disrupts PCP in eye lens fiber cells that have polarised primary cilia. *Developmental Biology* **338**, 193-201.

Sung, C. H., Chuang, J. Z. (2010). The cell biology of vision. *Journal Cell Biology* **190**, 953-963.

Suzuki, N., Nakamura, S., Mano, H., Kozasa, T. (2003). G $\alpha$  12 activates Rho GTPase through tyrosine-phosphorylated leukemia-associated RhoGEF. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 733-738.

Swaroop, A., Kim, D., Forrest, D. (2010). Transcriptional regulation of photoreceptor development and homeostasis in the mammalian retina. *Nature reviews. Neuroscience* **11**, 563-576.

Take-uchi, M., Clarke, J. D. W., Wilson, S. W. (2003). Hedgehog signalling maintains the optic stalk-retinal interface through the regulation of Vax gene activity. *Development* **130**, 955-968.

Tall, G. G. (2013). Ric-8 regulation of heterotrimeric G proteins. *Journal of Receptor Signal Transduction Res* **33**(3).

Tall, G. G., Gilman, A. G. (2005). Resistance to inhibitors of cholinesterase 8A catalyzes release of Galphai-GTP and nuclear mitotic apparatus protein (NuMA) from NuMA/LGN/Galphai-GDP complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 16584-16589.

Tall, G. G., Krumins, A. M., Gilman, A. G. (2003). Mammalian Ric-8A (synembryn) is a heterotrimeric G $\alpha$  protein guanine nucleotide exchange factor. *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 8356-8362.

T treault, N., Champagne, M.-P., Bernier, G. (2009). The LIM homeobox transcription factor Lhx2 is required to specify the retina field and synergistically cooperates with Pax6 for Six6 trans-activation. *Developmental Biology* **327**, 541-550.

Tibber, M. S., Whitmore, A. V., Jeffery, G. (2006). Cell division and cleavage orientation in the developing retina are regulated by L-DOPA. *The Journal of comparative neurology* **496**, 369-381.

Tikker, L. 2011. Guaniini nukleotiivahetusfaktor RIC-8 ekspressioon arenevas ja täiskasvanud hiire reetinas. Bakalaureuset o.

Tissir, F., Goffinet, A. M. (2013). Shaping the nervous system: role of the core planar cell polarity genes. *Nature reviews. Neuroscience* **14**, 525-535.

Tonissoo, T., Koks, S., Meier, R., Raud, S., Plaas, M., Vasar, E., Karis, A. (2006). Heterozygous mice with Ric-8 mutation exhibit impaired spatial memory and decreased anxiety. *Behavioural brain research* **167**, 42-48.

Tonissoo, 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. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **239**, 3404-3415.

Toy, J., Yang, J.-M., Leppert, G. S., Sundin, O. H. (1998). The Optx2 homeobox gene is expressed in early precursors of the eye and activates retina-specific genes. *PNAS* **95**, 10643-10648.

Wallingford, J. B. (2012). Planar cell polarity and the developmental control of cell behavior in vertebrate embryos. *Annual review of cell and developmental biology* **28**, 627-653.

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

Wang, S. W. (2001). Requirement for math5 in the development of retinal ganglion cells. *Genes & Development* **15**, 24-29.

Weber, G. F., Menko, A. S. (2006). Actin filament organization regulates the induction of lens cell differentiation and survival. *Developmental Biology* **295**, 714-729.

Westenskow, P., Piccolo, S., Fuhrmann, S. (2009). Beta-catenin controls differentiation of the retinal pigment epithelium in the mouse optic cup by regulating Mitf and Otx2 expression. *Development* **136**, 2505-2510.

Wettschureck, N., Offermanns, S. (2005). Mammalian G Proteins and Their Cell Type Specific Functions. *Physiological Reviews* **85**, 1159-1204.

Wiley, L. A., Dattilo, L. K., Kang, K. B., Giovannini, M., Beebe, D. C. (2010). The tumor suppressor merlin is required for cell cycle exit, terminal differentiation, and cell polarity in the developing murine lens. *Investigative ophthalmology & visual science* **51**, 3611-3618.

Woodard, G. E., Huang, N. N., Cho, H., Miki, T., Tall, G. G., Kehrl, J. H. (2010). Ric-8A and Gi alpha recruit LGN, NuMA, and dynein to the cell cortex to help orient the mitotic spindle. *Molecular and cellular biology* **30**, 3519-3530.

Wride, M. A. (2011). Lens fibre cell differentiation and organelle loss: many paths lead to clarity. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **366**, 1219-1233.

Wu, F., Li, R., Umino, Y., Kaczynski, T. J., Sapkota, D., Li, S., Xiang, M., Fliesler, S. J., Sherry, D. M., Gannon, M., Solessio, E., Mu, X. (2013). Onecut1 is essential for horizontal cell genesis and retinal integrity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **33**, 13053-13065, 13065a.

Wurm, A., Sock, E., Fuchshofer, R., Wegner, M., Tamm, E. R. (2008). Anterior segment dysgenesis in the eyes of mice deficient for the high-mobility-group transcription factor Sox11. *Experimental eye research* **86**, 895-907.

Yamada, R. (2003). Cell-autonomous involvement of Mab2111 is essential for lens placode development. *Development* **130**, 1759-1770.

Yang, Z., Ding, K., Pan, L., Deng, M., Gana, L. (2003). Math5 determines the competence state of retinal ganglion cell progenitors. *Developmental Biology* **264**, 240-254.

Yu, D. Y., Cringle, S. J., Balaratnasingam, C., Morgan, W. H., Yu, P. K., Su, E. N. (2013). Retinal ganglion cells: Energetics, compartmentation, axonal transport, cytoskeletons and vulnerability. *Progress in retinal and eye research* **36**, 217-246.

Yuzawa, S., Kamakura, S., Iwakiri, Y., Hayase, J., Sumimoto, H. (2011). Structural basis for interaction between the conserved cell polarity proteins Inscuteable and Leu-Gly-Asn repeat-enriched protein (LGN). *PNAS* **108**, 19210-19215.

Zhang, X., Serb, J. M., Greenlee, M. H. (2011). Mouse retinal development: a dark horse model for systems biology research. *Bioinformatics and biology insights* **5**, 99-113.

Zhao, H., Yang, T., Madakashira, B. P., Thiels, C. A., Bechtel, C. A., Garcia, C. M., Zhang, H., Yu, K., Ornitz, D. M., Beebe, D. C., Robinson, M. L. (2008). Fibroblast growth factor receptor signaling is essential for lens fiber cell differentiation. *Developmental Biology* **318**, 276-288.

Zhao, L., Saitsu, H., Sun, X., Shiota, K., Ishibashi, M. (2010). Sonic hedgehog is involved in formation of the ventral optic cup by limiting Bmp4 expression to the dorsal domain. *Mechanisms of development* **127**, 62-72.

Zhao, S., Chen, Q., Hung, F.-C., Overbeek, P. A. (2002). BMP signaling is required for development of the ciliary body. *Development* **129**, 4435-4442.

Zheng, Z., Zhu, H., Wan, Q., Liu, J., Xiao, Z., Siderovski, D. P., Du, Q. (2010). LGN regulates mitotic spindle orientation during epithelial morphogenesis. *Journal of Cell Biology* **189**, 275-288.

Zhu, J., Wen, W., Zheng, Z., Shang, Y., Wei, Z., Xiao, Z., Pan, Z., Du, Q., Wang, W., Zhang, M. (2011). LGN/mInsc and LGN/NuMA complex structures suggest distinct functions in asymmetric cell division for the Par3/mInsc/LGN and Galphai/LGN/NuMA pathways. *Molecular cell* **43**, 418-431.

Zigman, M., Cayouette, M., Charalambous, C., Schleiffer, A., Hoeller, O., Dunican, D., McCudden, C. R., Firnberg, N., Barres, B. A., Siderovski, D. P., Knoblich, J. A. (2005). Mammalian inscuteable regulates spindle orientation and cell fate in the developing retina. *Neuron* **48**, 539-545.

Zuber, M. E., Gestri, G., Viczian, A. S., Barsacchi, G., Harris, W. A. (2003). Specification of the vertebrate eye by a network of eye field transcription factors. *Development* **130**, 5155-5167.

## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina Laura Tikker (sünnikuupäev: 15.09.1988)

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

**RIC8 funktsioon koduhiire (*Mus musculus*) läätse ja reetina arengus,**

mille juhendajad on Keiu Kask ja Tambet Tõnissoo,

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni 26.05.2017 autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

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

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

Tartus, 26.05.2014