

TARTU ÜLIKOOL
BIOLOOGIA-GEOGRAAFIATEADUSKOND
ZOOLOOGIA JA HÜDROBIOLOOGIA INSTITUUT
ÜLDZOOLOOGIA ÕPPETOOL

Maarja Haugas

**Gata3 reguleerib plakoodi morfogeneesi ja Fgf-
signaliseerimist hiire sisekõrva arengus**

Magistritöö arengubioloogias

Juhendajad: Kersti Lilleväli, M.Sc

Prof. Jüri Kärner, Ph.D, D.Sc

TARTU 2005

SISUKORD

KASUTATUD MÕISTED JA LÜHENDID	3
SISSEJUHATUS	4
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1.1 SISEKÕRVA EHITUS JA FUNKTSIOONID.....	6
1.2 SISEKÕRVA ARENEMINE	8
1.2.1 <i>Kõrvaplakoodi induktsioon</i>	8
1.2.2 <i>Morfogenees</i>	10
1.2.2.1 <i>Fgf faktorid kõrva morfogeneesis</i>	13
1.3 GATA TRANSKRIPTSIOONIFAKTORID.....	14
1.3.1 <i>Gata3</i>	14
1.3.1.1 <i>Gata3 funktsioonid sisekõrvas</i>	14
1.3.1.2 <i>Gata3 ekspressioon sisekõrvas</i>	15
2. EKSPERIMENTAALNE TÖÖ	17
2.1 TÖÖ EESMÄRGID	17
2.2 MATERJALID JA MEETODID.....	18
2.2.1 <i>Kasutatud hiirelinn, genotüpeerimine</i>	18
2.2.2 <i>Embriote dissekteerimine</i>	18
2.2.3 <i>β-galaktosidaasi värvusreaktsioon hiireembrüotel</i>	19
2.2.4 <i>DIG-riboproovide sünteesimiseks kasutatud plasmiidid</i>	19
2.2.5 <i>DIG-märgistatud riboproovi sünteesimine</i>	19
2.2.6 <i>Whole mount in situ hübridisatsioon hiireembrüotele</i>	20
2.2.6.1 <i>Embriote eeltöötlus</i>	20
2.2.6.2 <i>Embriote hübridiseerimine, sellele järgnevad pesud ja antikehadega töötlemine</i>	20
2.2.6.3 <i>Pesud pärast antikehadega töötlemist ja histokeemia</i>	21
2.2.7 <i>Vibratoomilõikude valmistamine</i>	21
2.3 TULEMUSED.....	23
2.3.1 <i>Gata3 mutantsete hiirte sisekõrva morfogenees</i>	23
2.3.2 <i>Morfogeneesi uurimine ekspressioonimarkeri Pax8 abil</i>	27
2.3.3 <i>Gata3^{-/-} mutantse hiire pea ühel küljel paiknevate vesiikulite identiteedi määramine</i>	29
2.3.4 <i>Fgf-signalisatsioon Gata3^{-/-} hiireembrüote kõrvaalas</i>	30
2.4 ARUTELU.....	35
KOKKUVÕTE	38
SUMMARY	39
TÄNUAVALDUSED	41
KIRJANDUSE LOETELU	42

KASUTATUD MÕISTED JA LÜHENDID

BSA – veise seerumi albumiin (*Bovine Serum Albumine*)

DIG – digoksigeniin

E(10.5) – (10.5) embrüonaalne arengupäev

FCS – veise loote seerum (*Foetal Calf Serum*)

in situ – kohapeal

in vitro – katseklaasis

lacZ – *Escherichia coli* β -galaktosidaasi kodeeriv geen

nls – tuuma lokaliseerimise signaaljärjestus (*nuclear localization signal sequence*)

v/v – mahuosa mahu (*volume in volume*)

w/v – massiosa mahu (*weight in volume*)

whole mount – tervet embrüot hõlmav

X-Gal – 5-bromo-4-kloro-3-indolüül- β -D-galaktopüraanosiid

Märkus. Geenide tähistused on tekstis esitatud kaldkirjas, valkude tähised aga püstkirjas.

SISSEJUHATUS

Imetaja sisekõrv on organ, mille keerulise ehitusega kaasneb kahe olulise taju toimimine. Dorsaalset paiknev vestibulaaraparaat täidab tasakaaluelundi funktsioone ja ventraalne osa, kohlea, vastutab kuulmise eest. Lihtsa ehitusega kõrvavesiikuli arenemine kolmedimensionaalseks membraaneks labürindiks on detailselt kirjeldatud, kuid seda kontrollivate molekulaarsete mehhanismide kohta on veel vähe informatsiooni. Mutantsed hiireliinid on tänapäeva teaduses saanud tööriistaks, mille abil on kirjeldatud ka imetaja sisekõrva arengus oluliste funktsioonidega geene. Siiski puuduvad seni piisavad andmed kirjeldamiseks molekulaarset sidusust ja geneetilist hierarhiat sisekõrva arengus.

Gata-perekonna transkriptsioonifaktoritel on elutähtsaid rolle erinevates organismirühmades. Selgroogsete Gata-perekonna kuuel liikmel (*Gata1-6*) on teada olulisi mittekattuvaid rolle erinevate organite arengus, nad on vajalikud raku saamise määratlemisel, diferentseerumise regulatsioonis ning rakkude proliferatsiooni ja liikumise kontrollis. On kirjeldatud *Gata3* rolli vereloome, kesknärvisüsteemi, südame, neerude ja sisekõrva arengus. *Gata3*-puudulikel hiireembrüotel tekivad häired juba sisekõrva arengu varajases etapis, mistõttu on takistatud ka kõrva edasine korrapärane arenemine. *Gata3*^{-/-} hiired surevad embrüonaalse arengu vältel (E10.5-11.5), seetõttu on raskendatud geenifunktsioonide uurimine hilisemates arengustaadiumides. *Gata3*^{-/-} embrüote suremise peamiseks põhjuseks peetakse südame arenguhäireid, mis tekivad noradrenaliini puudulikkuse tõttu sümpaatilises närvisüsteemis. Katehoolamiini biosünteesiraja vaheühendite kunstlikul manustamisel suudavad *Gata3* mutantsed embrüod elada kuni vanuseni E18.5.

Gata3 haplopuudulikkus põhjustab inimestel HDR sündroomi, millega kaasneb kurtus ning neeru- ja kõrvalkilpnäärme häired. On teada, et heterosügootsed *Gata3* mutantsed hiired kannatavad progresseeruva Corti organi meeletu- ja tugirakkude degeneratsiooni all, mis põhjustab kuulmise kadumise. Täpsed mehhanismid, mis HDR sündroomi põhjustavad on ebaselged.

Gata3-puudulike hiirte kõrvafenotüüp on siiani detailselt kirjeldamata, samuti on iseloomustamata *Gata3* sihtmärkgeenid sisekõrvas. Kuigi Fgf-perekonna faktorite uurimine sisekõrva arengus on olnud pikka aega teadlaste huviorbiidis, ei ole seni kirjeldatud ühtki geeni, mis reguleerib Fgf liikmete avaldumist sisekõrvas. Sellest

lähtuvalt sai minu magistritöö eesmärgiks sisekõrva varajase fenotüübi kirjeldamine *Gata3* mutantsetel hiireembrüotel ning Fgf-signaliseerimise hindamine *Gata3*-puudulikus kõrvaepiteelis. Minu töö hõlmab osa suuremast projektist, mille tulemina on saadetud kirjastamiseks artikli käsikiri: Lilleväli, K., Matilainen, T., Haugas, M., Pussinen, C., Karis, A. ja Salminen, M. '*Gata3 controls placode morphogenesis, Fgf10-signalling and cochlear differentiation during otic development.*' .

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Sisekõrva ehitus ja funktsioonid

Sisekõrv on üks keerulisema ehitusega struktuure selgroogsetes. Sisekõrva kolmedimensionaalselt organiseerunud labürint täidab nii kuulmise kui tasakaaluelundi funktsioone. Ektodermaalsest plakoodist pärinevat membraanset labürinti ümbritseb mesodermaalse päritoluga luine kapsel. Vastavalt talitlusele jagatakse sisekõrv kaheks: dorsaalselt paiknev vestibulaarsüsteem on vajalik gravitatsiooni detekteerimiseks ja tasakaalu hoidmiseks ning ventraalselt asuv kohlea ehk tigu tagab kuulmise. Vestibulaaraparaati kuuluvad kolm üksteisest 90° nurga all paiknevat poolringkanalit, utriikul ehk mõik ja sakkul ehk kotike. Sisekõrva dorsaalsest osast väljub endolümfaatile juha, millel on laienenud lõpuosa ehk kotike. Need struktuurid ühendavad membraanses labürindis sisalduva endolümfi ajuvedelikuga, tagades sellega vedeliku tsirkulatsiooni ning endolümfi stabiilse koguse vältimaks liigse rõhu teket (joonis 1A).

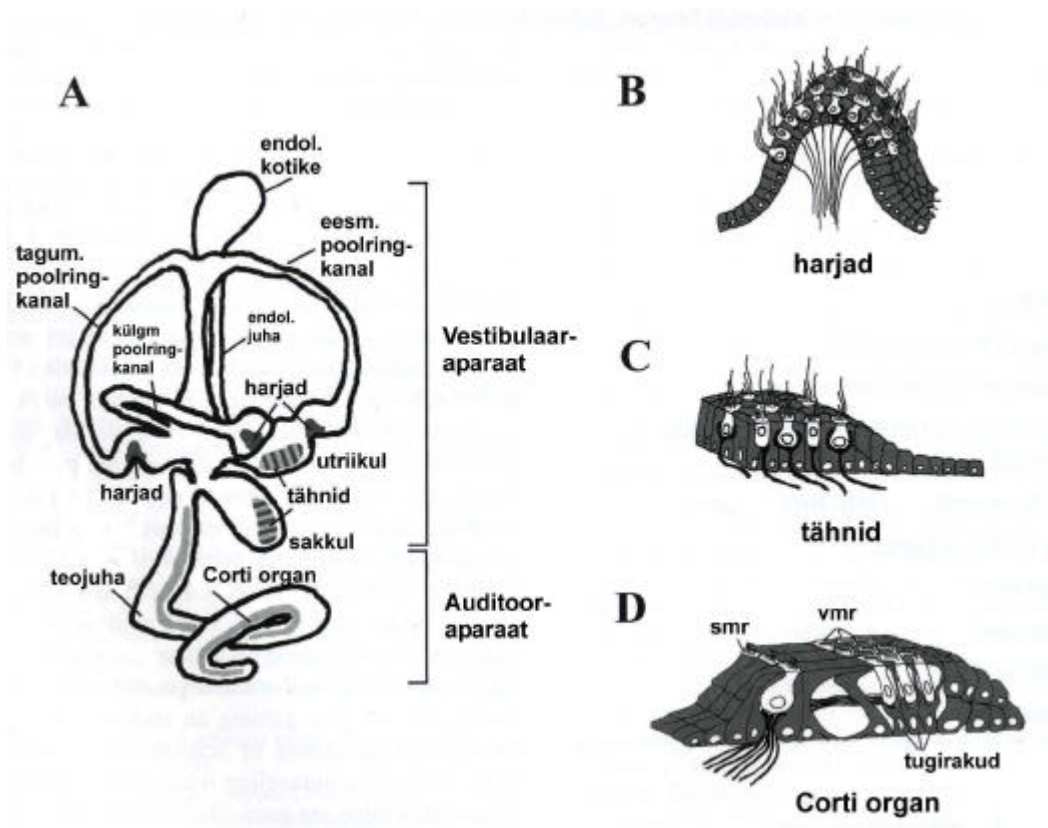
Sisekõrva funktsioonide eest vastutavad mehhanosensorsete muunduritena töötavad karvarakud, mis muudavad mehhaanilised võnkumised närviimpulssideks. Sensorsete karvarakkude poolt detekteeritud mehhaanilised lained saadetakse närviimpulssidena kesknärvisüsteemi spiraal- ja vestibulaarganglionist lähtuvate aferentsete juhteteede kaudu. Meelerakkudel lõpevad ka eferentsed juhteteed, mis muudavad retseptorite tundlikkust.

Kuulmis- ja tasakaalusüsteemi meelerakud ja neid ümbritsevad tugirakud on koondunud kindlatesse regioonidesse. Imetajate vestibulaaraparaadis paikneb viis sensorset organit (meelerakkude ala), mis on kahte tüüpi: kristad ehk harjad ja maakulad ehk tähnid. Harjad on kühmukujulised organid, mis asuvad kolme poolringkanali alumises osas (joonis 1A, B) ja nende ülesandeks on nurkkiirenduse detekteerimine. Maakulad on lamedad organid, mis paiknevad vestiibuli kesksetes regioonides, sakkulis ja utriikulis. Neid nimetatakse ka tasakaalutähnideks (joonis 1A, C). Maakulate meelerakud asuvad geelja massi sees, mida nimetatakse otoliidi membraaniks. Otoliiidi membraani liikumine painutab sõltuvalt raskusjõust karvarakke, mille ülesandeks on lineaarse kiirenduse detekteerimine. Kohleas asub

üks sensoorne ala, s.o. Corti elund ehk spiraalorgan (joonis 1A). Erinevalt teistest sensoorsetest organitest on spiraalorgani karvarakud paigutatud korrapäraselt ridadesse: üks rida sisemisi ja kolm rida välimisi meelerakke (joonis 1D). Sisemised ja välimised karvarakud erinevad teineteisest nii morfoloogia kui funktsioonide poolest: sisemised rakud on otseselt Corti organi retseptorid, mis saavad aferentsete närvikiudude kaudu informatsiooni ajusse ja välimiste karvarakkude ülesandeks on esmase info vastuvõtmine ajust. Spiraalorgani kindlates positsioonides asuvad karvarakud detekteerivad vastavalt alusmembraani erinevale painduvusele kindlaid lainepikkusi. Inimesel on spiraalorganis umbes 3500 sisemist ja 12 000 välimist meelerakku.

Sisekõrva epiteelne labürint on täidetud endolümfiga, millel on ebatavaline ioonne koostis: kõrge K^+ -ioonide ja suhteliselt madal Na^+ -ioonide sisaldus. Selline ioonne tasakaal on oluline karvarakkude normaalseks talitluseks. Sisekõrva ümbritseva luise kõrvakapsli ja membraanse labürindi vahel on perilümf, kus on madal $[K^+]$ ja kõrge $[Na^+]$, mis iseloomustab rakuvälist vedelikku.

Erinevalt imetajatest toimub lindudel karvarakkude taastootmine, mille allikaks on dediferentseerunud tugirakud. Karvarakkude hävimise tõttu kannatavad miljonid inimesed maailmas kuulmishäirete all.



Joonis 1. Imetaja sisekõrva ehitus. (A) Sisekõrva üldstruktuur. Tumehalli värviga on tähistatud harjad, viiruliselt on märgistatud tähnid ning helehalliga Corti elund. (B-D) Sisekõrva sensoorse epiteeli kolm tüüpi. Valgega on tähistatud meelerakud, halliga tugirakud ja mustaga närvikiud. Lühendid: smr – sisemised meelerakud, vmr – välimised meelerakud. (Kiernan *et al.*, 2002 järgi).

1.2 Sisekõrva arenemine

1.2.1 Kõrvaplakoodi induktsioon

Kõrvaplakoodi indutseerimise saab jagada erinevateks etappideks. Gastrulatsiooni ajal tekib neuraalplaati ümbritsev hobuserauakujuline ektodermaalne ala, plakoodikompetentne regioon (joonis 2A, B). Vastavat piirkonda eristab mitmete markergeenide ekspressioon, näiteks Sox-, Dlx- ja Pax-perekonna liikmete oma (ülevaade Baker ja Bronner-Fraser, 2001). Sõltuvalt ümbritsevatest kudedest

tulenevatest signaalidest arenevad sellest regioonist kõik kranaalplakoodid (Torres ja Giraldez, 1998; Streit, 2004).

Kõrvaplakoodi indutseerimiseks hilises gastrulatsioonis on vajalik vähemalt kahe sõltumatu indutseeriva signaalmolekuli üheaegne olemasolu, mis pärinevad tulevast kõrvapiirkonda ümbritsevast endomesodermist ning neuraalkoest. Erinevatel loomarühmadel omavad siinjuures rolli erinevad faktorid ja võimalik, et isegi erinevad geeniperekonnad. Fgf-perekonna signaliseerimine on kõrvaplakoodi induktsioonis konserveerunud kõigis seni uuritud loomarühmades (Ladher *et al.*, 2000; Leger ja Brand, 2002; Maroon *et al.*, 2002; Phillips *et al.*, 2001; Wright ja Mansour, 2003). Hiire kõrvaplakoodi indutseerijatena on olulised tagaajust pärinev Fgf3 ning mesenhümaalne Fgf10. Wright ja Mansour (2003) näitasid, et vastavate geenide suhtes topeltmutantsetel hiireembrüotel ei toimu kõrva induktsiooni. Vastupidiselt eelmisele uurimusele on aga demonstreeritud, et *Fgf3/Fgf10* topeltmutantsetel hiireembrüotel kõrvaplakood siiski tekib, kuid see areneb vigaselt (Alvarez *et al.*, 2003). Samas töös näidati, et *Fgf3* ja *Fgf10* üleekspressioon neuraalkoes põhjustab lisa kõrvavesiikulite tekkimise. Seega on *Fgf3* ja *Fgf10* küll hiire kõrva induktsioonis olulise tähtsusega, kuid tõenäoliselt esineb antud protsessis lisaks veel seniavastamata faktor(eid). Hiljutises töös kinnitas Ladher'i uurimisgrupp (Ladher *et al.*, 2005), et endodermist tulenev Fgf8 on määrava tähtsusega kõrvainduktsioonis, nii kanas kui hiires. Katses, kus kasutati *Fgf3*-puudulikke ja *Fgf8* suhtes hüpomorfset alleeli kandvaid hiiri, detekteeriti embrüotel *Fgf10* ekspressiooni vähenemine ja kõrvainduktsiooni puudumine. Kanas näidati, et Fgf8 on oluline kõrva indutseeriva mesenhümaalse faktori - *Fgf19* - avaldumiseks. Kanaembrüotel on kõrva indutseeriva faktorina kirjeldatud veel neuraalse päritoluga ja Fgf19 poolt indutseeritav parakriinne faktor *Wnt8c* (Ladher *et al.*, 2000).

Kõrvaplakood eristub hiires ja kanas umbes 10 somiidipaari vanuselt. Algselt on tegemist morfoloogiliselt lihtsa epiteliaalse rakkude tihemikuga tagaaju 5. ja 6. rombomeeri kõrval. Varajane kõrvaplakood eristub ümbritsevast pinnaektodermist lisaks morfoloogiale ka spetsiifiliste geenide ekspressiooniga. Plakoodis on mitmeid diskreetse ekspressiooniga transkriptsioonifaktoreid, näiteks *Pax8*, *Pax2*, *Gata3*, *Six4*, *Dlx3*; samuti sekreteeritavaid faktoreid, nagu, näiteks, *Fgf3*, *Fgf10* ja *Bmp7* (Baker ja Bronner-Fraser, 2001). Kõrva arengu varaseim kirjeldatud markergeen hiires on

paired box perekonna liige *Pax8*, mis avaldub juba enne kõrvaplakoodi morfoloogilist eristumist pinnaektodermist (Mansouri *et al.*, 1996).

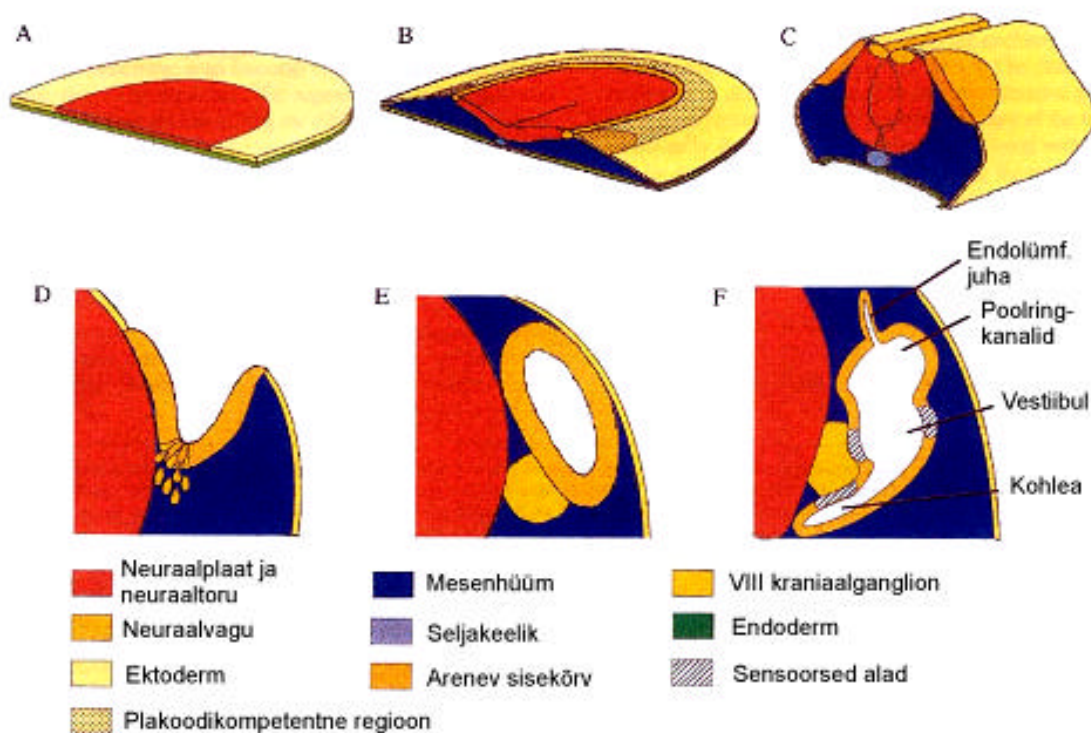
1.2.2 Morfogenees

Pärast kõrvaplakoodi formeerumist hakkab epitelialne tihemik mesenhüümi sisse sopistuma ja moodustab kausja kõrvasüvendi (*otic cup*; joonis 2D). Invagineerumise mehhanismid on tänaseni suurel määral ebaselged. Huvitava faktina on näidatud, et imetaja ja linu kõrvaplakoodi invagineerumine ei ole nii energiat nõudev kui lätse- ja ninaplakoodi ning kala ja konna kõrvaplakoodide sissesopistumine (Legan ja Richardson, 1997). Kõrvaplakoodi invaginatsioonis võib olla oluline osa ekstratsellulaarse maatriksi adhesioonimolekulide vahendusel toimuv signalisatsioonil. Katses, kus kana embrüos blokeeriti rakuväliste molekulide (N-CAM) vastaste antikehadega kõrvaepiteeli ja neuraaloru vaheline adhesioon, häiris kõrvaplakoodi invaginatsioon ning hilisem sulgumine ototsüstiks (Brown *et al.*, 1998). Invaginatsioonis on ilmselt oluline ka rakkude jagunemine ja ümbritseva mesenhüümi mehhaaniline surve kõrvaplakoodile. Kõrvavesiikul ehk ototsüst moodustub hiirel vanuseks E9.5 (joonis 2E). Osa kõrvavesiikuli anterioventraalsetest rakkudest migreerub ventraalselt ja moodustab VIII kraniaal- ehk kõrvaganglioni (joonis 2D, E). Lihtne epitelialne ototsüst allub seejärel kiiretele morfoloogilistele muutustele: nelja päevaga kujunevad kõik peamised kõrvastruktuurid. Esmalt hakkab ümmargune vesiikul dorsoventraalselt pikenema ning nähtavale ilmuvad esimesed sisekõrva struktuuride alged: dorsaalselt eristub kõrvavesiikuli sulgumise kohas tulevane endolümfaatiline juha, anteriodorsaalselt sopistub välja poolringkanalite piirkond ning ventraalselt areneb tigu (joonis 2F). Kiires morfoloogilises muutuses on olulisel kohal rakutsükli ja apoptoosi täpne regulatsioon. Huvitav on siinjuures asjaolu, et väljakasvavates piirkondades ei ole rakkude jagunemise tase alati suurenenud. Näiteks, dorsaalsetes endolümfijuha ja kanalitasku väljasopistumise domäänides on rakkude jagunemise tase madal võrreldes ototsüsti ventraalse regiooniga (Lang *et al.*, 2000).

Poolringkanalite keeruline süsteem kujuneb väljakasvavate `taskute` abil, mille vastakuti paiknevad pinnad lähenevad teineteisele kuni liituvad ühtseks epiteliaalseks plaadiks. Hiljem kanaliplaat kaob hiirel rakkude migreerumise ja kanal apoptoosi

tagajärjel. Alles jäävad vaid poolringkanalid, millest eesmine ja tagumine liituvad ühissääre (*crus commune*) kaudu (Martin ja Swanson, 1993).

E14.5 arengupäevaks on hiire sisekõrva aparaadis kujunenud kõik peamised osad, kuid nende lõplik eristumine toimub kuni sünnini.



Joonis 2. Sisekõrva arenemine. Neuraalplaati ümbritsev hobuserauakujuline ektodermaalne ala (A) omab kraniaalplakoodide kompetentset piirkonda (B), mis annab aluse kõrvaplakoodi tekkimiseks (C). Kõrvaplakood invagineerub ja moodustub kausjas kõrvasüvend ehk *otic cup* (D). Epiteelirakkude süvenemise jätkudes kõrva avaus kitseneb ja moodustub kõrvavesiikul (E). Vesiikuli moodustumisel delamineeruvad kõrvaepiteeli anterioventraalsed rakud (D), mille tulemusel tekib VIII kraniaalganglion (E). Morfoloogiliste muutuste tulemusel arenevad välja kõik sisekõrva struktuurid (F) (Torres ja Giraldez, 1998 järgi).

Juba aastakümneid on püütud leida selgitusi mehhanismidele, mis juhivad lihtsa plakoodi kujunemist keerulise struktuuriga membraanseks labürindiks. Plakoodi varajane polariseerumine ning ka hilisem morfogenees toimub koostöös

ümbritsevate kudede. Arenev kõrvaplakood ja -vesiikul on tihedas kontaktis nii neuraalkoe kui mesenhüümiga.

Kõrvaepiteel on polariseeritud juba enne sissesopistumist, mis väljendub mitmete geenide kindlalt lokaliseeritud ekspressioonis (Fekete ja Wu, 2002). Arvatakse, et esimesena määratletakse anterioposterioorne telg, mis võib olla tingitud 5. ja 6. rombomeeri ning kõrvaplakoodi vahel toimivast efriinide signaliseerimisest (ülevaade Brigande *et al.*, 2000). Ent hiljutises töös näitas Bok kaasautoritega (Bok *et al.*, 2005), et anterioposterioorne polarisatsioon kujuneb korrektselt ka juhul, kui närvitoru polaarsus mehhaaniliselt muuta. Dorsaalse domääni kujunemise eest peetakse samuti vastutavaks närvitorust tulenevaid signaale. Lateroventraalse telje määratlemine toimub viimasena.

On loodud hüpoteetiline kõrvastruktuuride piirimudel (*compartment boundary model*), mille alusel jaotatakse kõrvavesiikul erinevaid gene ekspresseerivateks domäänideks (Kiernan *et al.*, 1997; Brigande *et al.*, 2000; Rinkwitz *et al.*, 2001; Fekete ja Wu, 2002). Vastavate domäänide rakud ei segune oluliselt omavahel ja erinevate geenide kokkupuutepiirkonnad on arvatavasti organisaatoriteks erinevate struktuuride induktsioonis. Huvitav on siinjuures endolümfaatilise juha väljakasvamise/arenemise teooria, mille kohaselt indutseeritakse see kõrvavesiikuli sulgumise piirkonnas kolme erineva domääni kokkupuutekohas (Brigande *et al.*, 2000). Varakult määratletakse ka tulevane sensoorne-neuraalne piirkond, millest arenevad hiljem nii sensoorne epiteel kui kõrvaganglion (Wu *et al.*, 1998).

Tänapäeval on kõrva varajasse arengusse palju selgust toonud mitmete mutantsete hiireliinide loomine, mille abil on selgitatud nii ümbritsevates kudedes kui ka kõrvaepiteelis ekspresseerivate geenide osalust. Neuraalkoe otsest rolli sisekõrva arengule on selgitatud mutantide abil, milles on rikutud tagaaju 5. ja 6. rombomeeri identiteet. Näiteks *kreisler*, *Hoxa1* ning retinoolhappe signaalraja komponentide mutantidel on häiritud normaalse kõrvavesiikuli areng vaatamata sellele, et mainitud geenid ise ei avaldu kõrvaepiteelis (McKay *et al.*, 1994; Mark *et al.*, 1993; Niederreither *et al.*, 2000). Samuti on näidatud mesodermi signaliseerimise osalust nimetatud koes ekspresseeruva *Pou3f4* mutantidega, kellel on häiritud teojuha normaalne areng (Phippard *et al.*, 1999).

Kõrvaepiteelis ekspresseerivate geenide väljalülitamisel on sageli täheldatav kõrva selle piirkonna ebanormaalne areng, kus vastav geen on avaldunud. Näiteks,

lateroventraalselt ekspresseeruva *Pax2* mutantsetel embrüotel ei arene tejuha ning ototsüstis dorsaalselt ekspresseerunud geenide, nagu, näiteks, *Dlx5* ja *Hmx3* mutantidel puudub või on tõsiselt häiritud poolringkanalite areng (Torres *et al.*, 1996; Depew *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1998).

1.2.2.1 Fgf faktorid kõrva morfogeneesis

Fgf-perekonna liikmed on olulised mitmete organite kujunemisel, signaliseerides sageli kõrvalasetsevatest kudedest. Neuraalkoest ning kõrva ümbritsevast mesenhüümist tulenevad Fgf-perekonna faktorid on olulised sisekõrva induksioonis. Hiljem, ekspresseerudes lisaks ka kõrvaepiteelis, on neil roll ka morfogeneesis. *Fgf10* ja *Fgf3* inaktivatsioon põhjustab häireid morfogeneesi hilisemates arengustaadiumides (Mansour *et al.*, 1993; Alvarez *et al.*, 2003; Pauley *et al.*, 2003). *Fgf10* mutantsetel hiirtel puudub täielikult tagumine poolringkanal koos sensoorse alaga, lisaks on häiritud ka eesmise ja külgmise poolringkanali arenemine (Pauley *et al.*, 2003). On näidatud, et poolringkanalite sensoorsetes alades avalduv Fgf10 indutseerib *Bmp2* ekspressiooni külgnevas mittesensoorses epiteelis, mis omakorda signaliseerib poolringkanalite väljakasvamise (Chang *et al.*, 2004). Selline näide, kus epiteelisiselt toimub Fgf-signaliseerimine on organogeneesis suhteliselt unikaalne. Tagaajust tulenev Fgf3 on oluline endolümfaatilise juha väljakujunemiseks (Mansour, 1994).

Fgf-perekonna neljast retseptorist on FgfR1b ja FgfR2b võimelised siduma Fgf3 ja Fgf10 (Ornitz *et al.*, 1996; Pirvola *et al.*, 2000). *FgfR2(IIIb)* inaktivatsioon põhjustab tõsiseid sisekõrva morfogeneesi häireid (Pirvola *et al.*, 2000). *Fgf10* puudumisel ei ole kõrva fenotüüp nii tõsine kui *FgfR2(IIIb)* mutantide puhul, mistõttu arvatakse, et Fgf3 võib nimetatud retseptoriga seondudes asendada osaliselt Fgf10 puudumise (Pauley *et al.*, 2003).

1.3 Gata transkriptsioonifaktorid

Gata transkriptsioonifaktorid on oma nime saanud võime järgi seonduda spetsiifilise DNA järjestusega (A/T)GATA(A/G). Selgroogsete Gata-perekonda kuulub kuus liiget, Gata1-6. Omavahel jagatakse need nii järjestuse kui funktsioonide alusel kaheks alamperekonaks: Gata1, -2, -3 on olulised valgud eelkõige hematopoeesis ning Gata4, -5, -6 osalevad südame ja kopsude kujunemisel. Organismide arengus on Gata faktoritele omistatud hulgaliselt mittekattuvaid elutähtsaid funktsioone. Nad osalevad rakkude jagunemise, liikumise ja diferentseerumise protsessides (ülevaade Patient ja McGhee, 2002).

1.3.1 Gata3

Gata3-puudulikud hiireembrüod surevad vanuses E10.5-11.5 mitmete organite arenguhäirete tõttu (Pandolfi *et al.*, 1995; Ting *et al.*, 1996; Pata *et al.*, 1999; Lim *et al.*, 2000). Arvatakse, et mutandid surevad eelkõige südamefunktsioonide häirete tõttu, mis omakorda tulenevad noradrenaliini vaegusest põhjustatud sümpaatilise närvisüsteemi puudulikkusest (Lim *et al.*, 2000). Lisaks enimuuritud funktsioonile T-rakkude diferentseerumises, on *Gata3-1* olulisi rolle ka neeru, näokolju, naha, kesknärvisüsteemi ja sisekõrva arengus. Närvisüsteemis ja sisekõrvas on ekspresseerunud sellest perekonnast vaid *Gata3* ja *Gata2* (Pata *et al.*, 1999; Nardelli *et al.*, 1999; Lilleväli *et al.*, 2004).

1.3.1.1 Gata3 funktsioonid sisekõrvas

Gata3-1 on sisekõrva arengus mitmeid funktsioone, olles asendamatu nii vaadeldava organi morfogeneesis kui ka oluline tegur kõrva innervatsioonil tagaajust (Karis *et al.*, 2001). *Gata3*-le on omistatud ka võimalikku osa meelerakkude diferentseerumise kontrollis (Lawoko-Kerali *et al.*, 2002). Lawoko-Kerali kaasautoritega viitab ka *Gata3* osalusele auditoorse ja vestibulaarse ganglioni määratlemisel, mil *Gata3* reguleerib selektiivselt *NeuroD* ekspressiooni auditoorsetes neuroblastides (Lawoko-Kerali *et al.*, 2004).

Olgu märgitud, et *Gata3* mutantne kõrvavesiikul on väiksem ja dorsoventraalselt pikenenud võrreldes normaalsete ja *Gata3* heterosügootsete embrüotega. Mutandi

kõrv jääb tsüstiks, millel puuduvad kõik kolm poolringkanalit, sakkul ja utriikul ning teo väljakasv on pidurdunud (Karis *et al.*, 2001). *Gata3* mutandi sisekõrva fenotüüp on detailselt kirjeldamata ning ühtki *Gata3* märklaudgeeni varajases kõrvaepiteelis ei ole seni iseloomustatud. Vaatamata tõsisele fenotüübile on *Gata3* mutantses ototsüstis säilinud dorsoventraalne polarisatsioon ning *Pax2*, *Six1* ja *Eya1* geeniekspressiooni muutusi ei ole täheldatud (Lilleväli *et al.*, 2004).

Inimesel põhjustab *Gata3* haplopuudulikkus HDR (*hypoparathyroidism, deafness, renal dysplasia*) sündroomi, mille tunnusteks on kõrvalkilpnäärme alaareng, neerudefektid ja kurtus (Van Esch *et al.*, 2000). Ka *Gata3* alleeli suhtes heterosügootsetel hiirtel on kuulmishäireid. Van der Wees kaasautoritega (van der Wees *et al.*, 2004) on näidanud, et *Gata3* haplopuudulikkusega kaasnev kuulmisfuntsiooni häire hiires on tingitud eelkõige Corti organi mee- ja tugirakkude progresseeruvast degeneratsioonist. Nad täheldasid, et kuulmise kadu korreleerub välimiste karvarakkude hävimise tasemega.

1.3.1.2 *Gata3* ekspressioon sisekõrvas

Gata3 ekspressioon initsieeritakse kõrvaplakoodis vanuses E8.5 (Lawoko-Kerali *et al.*, 2002), olles detekteeritav ühtlaselt üle kogu plakoodiala. Arengu edenedes (E9.5) on *Gata3* ekspresseerunud kõrvavesiikuli epiteelis, puududes vaid üksikutes rakkudes vesiikuli dorsolateraalses osas (Lawoko-Kerali *et al.*, 2002; Lilleväli *et al.*, 2004). Ototsüsti pikenedes (E10.5) on *Gata3* ekspresseerunud kahe domäänina, kattes nii ventraalse ehk tulevase teo piirkonna kui ka dorsaalse ehk tulevaste poolringkanalite regiooni. Selles vanuses ilmub *Gata3* ekspressioon ka dorsaalsesse ning ventraalsesse kõrvamesenhüümi. Hiire arengu 11.ndal embrüonaalsel päeval reguleeritakse *Gata3* ekspressioon alla tulevases vestibulaarpiirkonnas, ent tugev ekspressioon säilib arenevas auditoorses aparaadis ja seda ümbritsevas mesenhüümis (Lilleväli *et al.*, 2004).

Gata3 ekspresseerub arengu jooksul kõikides tulevastes sensoorsetes alades, välja arvatud sakkuli tähnides. Vestibulaaraparaadi sensoorses epiteelis ei ole *Gata3* täheldatav enam vanuses E18.5. Auditoorses sensoorses epiteelis säilib ekspressioon ka hilisemates etappides. Sõltumatute gruppide poolt avaldatud andmed on vastakad. Rivolta ja Holley (1998) näitasid immunoloogiliste meetoditega, et pärast

karvarakkude diferentseerumist jääb *Gata3* ekspressioon püsima selektiivselt vaid Corti organi tugirakkudes, olles maha reguleeritud karvarakkudest ning hiljem, 14.ndaks elupäevaks kogu epiteelist. Vastupidised tulemused sai van der Wees kaasautoritega (van der Wees *et al.*, 2004), kes visualiseerisid *Gata3* lookuse poolt reguleeritavat β -galaktosidaasi ekspressiooni sisekõrvas ning kasutasid *in situ* hübriidisatsiooni meetodit. Autorid detekteerisid *Gata3* ekspressiooni täiskasvanud hiire Corti organis nii tugi- kui karvarakkudes. Antud tööde tulemuste erinevus võib tuleneda kasutatud meetodikate erinevast tundlikkusest.

Gata3 ekspressioon kõrvaganglionis on domineeriv spiraalganglionis; vestibulaarganglionis annavad hübriidisatsioonisignaali vaid üksikud rakud (Lilleväli *et al.*, 2004).

2. EKSPERIMENTAALNE TÖÖ

2.1 Töö eesmärgid

- *Gata3* mutantsete hiirte sisekõrva varajase fenotüübi kirjeldamine
- Fgf-signaliseerimise hindamine *Gata3*-puudulikus kõrvaepiteelis

2.2 Materjalid ja meetodid

2.2.1 Kasutatud hiireliin, genotüpeerimine

Kasutasin *Gata3^{nlslacZ}* hiireliini (Hendriks *et al.*, 1999). Embrüote genotüpeerimiseks kasutasin rebukotist võetud koematerjali. Koetüki lüüsisin puhveris, mis koosnes 1× puhverB (FIREPol) ning 0.1 µg/ml proteinaasK. Materjali inkubeerisin üleöö 56 °C juures, seejärel segasin väristil ning kuumutasin 20 min 98 °C juures. Lüüsilahuse fuugisin 1 min täispööretel. Järgnevalt teostasin PCR reaktsiooni, kus kasutasin järgmised primereid:

G3ex2-F 5'-CCT CCG ACG GCA GGA GTC-3' ,

G3ex2-R 5'-ACC GTA GCC CTG ACG GAG TTT-3' ja

LacZ-R1 5'-ACG GCG GAT TGA CCG TAA TG-3'.

PCR viisin läbi 10 µl-s ning selle koostis oli järgmine: ~20 ng DNA-d, 1× (NH₄)₂SO₄ puhver (Fermentas), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.25 µM praimerit G3ex2-F, 0.1 µM praimerit G3ex2-R, 0.15 µM praimerit LacZ-R ning 1 ühik Taq DNA polümeraasi.

PCR tingimused olid järgmised: 94 °C 5 min, seejärel 94 °C 30 sek, 60 °C 30 sek, 72 °C 40 sek, 33 tsükli. PCR tulemused analüüsisin 1.5% TAE agarosgeel elektroforeesil.

Gata3^{nlslacZ} hiiri genotüpeerisin β-galaktosidaasi värvusreaktsiooni meetodil. Sel juhul kasutasin materjalina hiire sabaotsa ja/või varvast. Värvusreaktsiooni esiletoomiseks lisasin materjalile värskelt valmistatud substraadi lahust (lahuse koostis punktis 2.2.3 β-galaktosidaasi värvusreaktsioon hiireembrüotel). Inkubeerisin materjali 1-2 tundi 37 °C juures pimedas ning detekteerisin tulemuse vastavalt hiire genotüübile.

2.2.2 Embrüote dissekteerimine

Embrüote vanuseks E0.5 märgiti päev, mil detekteeriti emahiire vaginaalne limakork. Embrüod dissekteerisin 1× PBS-s ja eemaldasid ekstraembrüonaalsed membraanid. *Whole mount in situ* hübridisatsiooni tarbeks dissekteeritud embrüotel avasin tagaaju

vatsakese, punkteerisin eesaju vatsakese ning südame parema vatsakese. Inkubeerisin embrüod üks kuni viis ööpäeva 4% PFA¹ lahuses 4 °C juures.

2.2.3 β -galaktosidaasi värvusreaktsioon hiireembrüotel

β -galaktosidaasi värvusreaktsiooni esiletoomiseks fikseerisin embrüod 4% PFA-s 30 min jääl, seejärel loputasin 1× PBS lahuses ning pesin 1× RINSE puhvris² kolm korda 5 min toatemperatuuril. Värvuse esiletoomiseks kasutasin värvilahust, mis sisaldas 1× RINSE puhvrit, 5 mM kaalium ferritsüaniidi ja 5 mM kaalium ferrotsüaniidi ning 1 mg/ml X-Gal (20 mg/ml dimetüülformamiidis; Fermentas). Värvusreaktsioon toimus üleöö toatemperatuuril pimedas. Pärast sobiliku tulemuse saavutamist peatasin reaktsiooni 1× PBS lahusega, pestes embrüod neli korda 5 min. Järelfikseerimine toimus 4% PFA/PBS lahusega 4 °C juures üleöö. Embrüote pildistamiseks kasutasin mikroskoopi Olympus SZX12 ja CCD kaamerat SensiCam. Jooniste töötlemiseks kasutasin programmi Adobe Photoshop.

2.2.4 DIG-riboproovide sünteesimiseks kasutatud plasmiidid

Riboproovide (*sense* ja *antisense* orientatsioonis) sünteesimiseks kasutasin järgmisi plasmide:

- Bluescript BSK plasmiid, mis sisaldas 780 bp pikkust Dlx5 cDNA järjestust
- pBluescript KS plasmiid, mis sisaldas 866 bp pikkust Lfng cDNA järjestust
- Bluescript KS II (+) plasmiid, mis sisaldas 584 bp pikkust Fgf10 cDNA järjestust
- pCMV-SPORT6 plasmiid, mis sisaldas 557 bp pikkust Etv5 cDNA järjestust
- Bluescript/p31A plasmiid, mis sisaldas 400 bp pikkust Pax8 cDNA järjestust
- Bluescript KS II (+) plasmiid, mis sisaldas 500 bp pikkust Fgf3 cDNA järjestust

2.2.5 DIG-märgistatud riboproovi sünteesimine

Hiire *Dlx5*, *Lfng*, *Pax8*, *Fgf3*, *Fgf10* ja *Etv5* *sense* ja *antisense* riboproovid sünteesisin vastavate eelpool nimetatud lineariseeritud plasmiididelt. Sünteesiks kasutasin rNTP-de segu, kus sisaldas 10 mM rGTP, 10 mM rCTP, 10 mM rATP, 6.5 mM rUTP ja 3.5 mM DIG-rUTP. Kasutasin T7, T3 ja SP6 RNA polümeraase.

2.2.6 Whole mount in situ hübridisatsioon hiireembrüotele

2.2.6.1 Embrüote eeltöötlus

Eelnevalt 4% PFA/PBS-is fikseeritud embrüod eeltöötlesin järgmiselt: pesin embrüod PBT³-s 10 min ning dehüdreerisin 25%, 50%, 75% metanooliga (lahjendused olid tehtud PBT-s) ja kaks korda 100% metanooliga. Seejärel rehüdreerisin vastassuunalise metanooli kontsentratsioonide reaga, millele järgnes vesinikperoksiidi töötlus (6% H₂O₂ PBT-s) 1 tund embrüotele vanuses E9.5-10.5. Embrüoid vanuses E8.5-9.0 ei töödeldud vesinikperoksiidi lahusega. Järgnevalt pesin embrüod PBT-ga ning töötlesin neid proteinaasK lahusega (0.1 µg/ml protK PBT-s) sõltuvalt embrüo suurusest 2 min kuni 10 min. ProteinaasK inhibeerisin glütsiinilahuses (2 mg/ml glütsiin PBT-s) 5 min jooksul ning refikseerisin 4% PFA lahusega, mis sisaldas 0.2% glutaaraldehüüdi (20 min). Loputasin embrüod kaks korda PBT lahusega ning prehübridiseerisin⁴ embrüod 70 °C juures vähemalt 1 tund.

Eeltöödeldud embrüod säilitasin prehübridisatsioonilahuses, milles puudus SDS; embrüod hoidsin –20 °C juures kuni kasutamiseni.

2.2.6.2 Embrüote hübridiseerimine, sellele järgnevad pesud ja antikehadega töötlemine

Eeltöödeldud hiireembrüotele lisasin hübridisatsioonilahuse⁵ ning inkubeerisin 70 °C juures üleöö. Seejärel pesin embrüod lahusega⁶ kaks korda 30 min 70 °C juures. Järgnevalt lahus1 / lahus2⁷ (1:1) seguga 10 min 70 °C juures, millele järgnes pesu lahusega2 kolm korda. RNaseA (100 µg/ml RNaseA lahuses2) töötlus kestis 45 min 37 °C juures, misjärel pesin embrüod korra lahusega2 ja lahusega3⁸. Pikem pesu lahusega3 toimus kaks korda 30 min 65 °C juures. Järgnevalt pesin embrüod 1× TBST lahusega⁹, millele lisasin 2 mM levamisooli. Embrüod blokeerisin 10% FCS-ga (eelnevalt 30 min 70 °C juures kuumutatud) TBST-s vähemalt 1 tund. Pärast 10%-lise seerumi eemaldamist lisasin aluselise fosfaataasiga konjugeeritud anti-DIG antikehade (Boehringer Mannheim GmbH) lahjenduse TBST-s (1% FCS-ga), suhtes 1:2000 ja inkubeerisin üleöö 4 °C juures.

2.2.6.3 Pesud pärast antikehadega töötlemist ja histokeemia

Pesin embrüod 1× TBST-ga kolm korda 5 minutit, seejärel viis kuni kuus korda 1 tund ning jätsin nimetatud lahusega pesema üleöö. Järgnevalt pesin embrüod NTMTL¹⁰ lahusega kolm korda 10 min ning inkubeerisin NTMTL-s, mis sisaldas aluselise fosfataasi substraate: 4.5 µg/ml NBT¹¹-d ja 3.5 µg/ml BCIP¹²-d, 37 °C juures pimedas. Kui signaal oli küllaldaselt tugev, pesin embrüod PBT-ga üleöö 4 °C juures ning fikseerisin 4% PFA-ga 2 tundi 4 °C juures. Embrüod säilitasin 1× PBS-s.

2.2.7 Vibratoomilõikude valmistamine

Hübridiseeritud embrüod asetasin 3 ml želatiini/albumiini sisestuslahusesse (0.5% želatiin, 30% BSA, 20% sahharoos/1× PBS-s, kõik w/v), millesse oli vahetult enne lisatud glutaaraldehüüd lõppkontsentratsiooniga 1.8% (v/v). Kui sisestuslahus hakkas tahenema, katsin embrüod sama lahusega (ca 3 ml-lise kogusega). Lasin plokil kõvastuda 10 min ning seejärel lõikasin vibratoomiga (TSE GmbH) embrüotest 30 µm paksused lõigud, mis asetasin PBS-i. Säilitasin lõikusid 4 °C juures kuni 70% glütserooli sisestamiseni ja mikroskopeerimiseni.

Märkused. Pesud, mille puhul pole aega märgitud, keetsid 5 kuni 10 minutit ning kõik protseduurid, kus pole temperatuuri märgitud, toimusid toatemperatuuril. *Whole mount in situ* hübridisatsiooni puhul toimusid kõik etapid loksutil.

Molekulaarbioloogias tarvitavad üldtuntud lahused (SDS, SSC) olid valmistatud tavapärasel koostisel ja meetoditel (Sambrook *et al.*, 1989).

Kasutatud *sense* riboproovid ei andnud *whole mount in situ* hübridisatsioonil spetsiifilist signaali.

Kasutatud lahused:

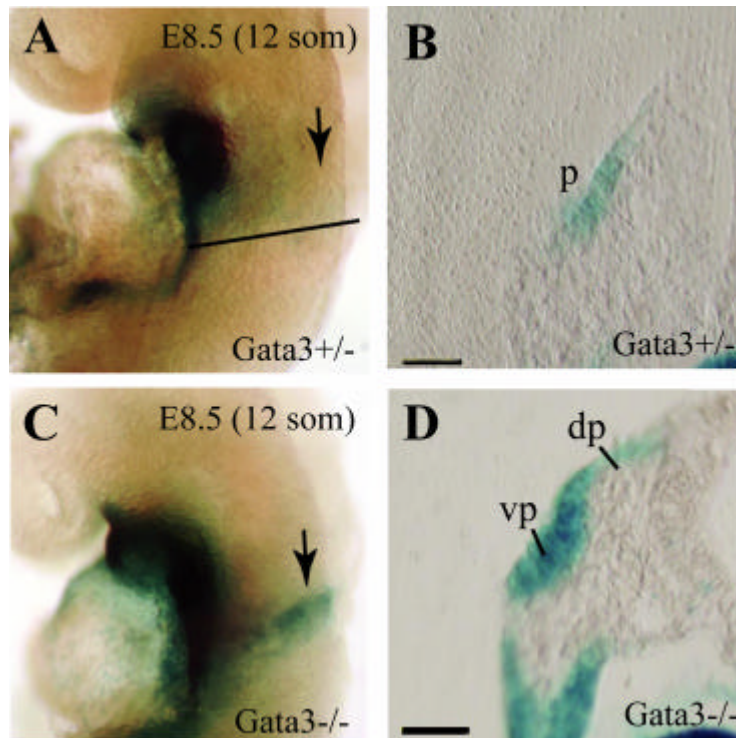
1. 4% PFA – 4% PFA fosfaatpuhveris (PBS)
2. 1× RINSE puhver – 100 mM PBS (pH 7.3), 72 mM Na₂HPO₄, 28 mM NaH₂PO₄, 2 mM MgCl₂
3. PBT - 1× PBS; 0.1% Tween 20
4. Prehübridisatsiooni lahus – 50% formamiid, 5× SSC (pH 5), 1% SDS, 50 µg/ml hepariini, 50 µg/ml pärmi tRNA
5. Hübridisatsiooni lahus – prehübridisatsiooni lahus, millele on lisatud denatureeritud DIG-RNA proov kontsentratsiooniga 1 µg/ml
6. Lahus 1 – 50% formamiid, 5× SSC (pH 5), 1% SDS
7. Lahus 2 – 0.5 M NaCl, 10 mM Tris (pH 7.5), 0.1% Tween 20
8. Lahus 3 – 50% formamiid, 2× SSC (pH 4.5)
9. 10× TBST – 0.25 M Tris-HCl (pH 7.5), 1.4 M NaCl, 27 mM KCl, 1% Tween 20
10. NTMTL – 100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH 9.5), 50 mM MgCl₂, 0.1% Tween 20, 2 mM levamisool
11. NBT (*4-nitro blue tetrazolium chloride*) hoiulahus – 75 mg/ml, lahustatud 70% dimetüülformamiidis
12. BCIP (5-bromo-4-kloro-3-indolüül-fosfaat) hoiulahus – 50 mg/ml, lahustatud 100% dimetüülformamiidis

2.3 Tulemused

2.3.1 *Gata3* mutantsete hiirte sisekõrva morfogenees

Homosügootsete *Gata3* mutantsete hiirte (edaspidi *Gata3*^{-/-}) sisekõrva morfoloogia kirjeldamiseks kasutasin *Gata3*^{nlslacZ} hiireliini embrüoid vanuses E8.5-9.5 (joonised 3, 4, 5). Kuna nimetatud hiireliini embrüotes peegeldab β-galaktosidaasi ekspressioon endogeense *Gata3* ekspressiooni (Pata *et al.*, 1999) ning heterosügootsetel (edaspidi *Gata3*^{+/-}) hiireembrüotel areneb sisekõrv normaalselt, võrreldavalt normaalsete hiirte sisekõrva arenguga, siis kasutasin neid kontrollembriüotena.

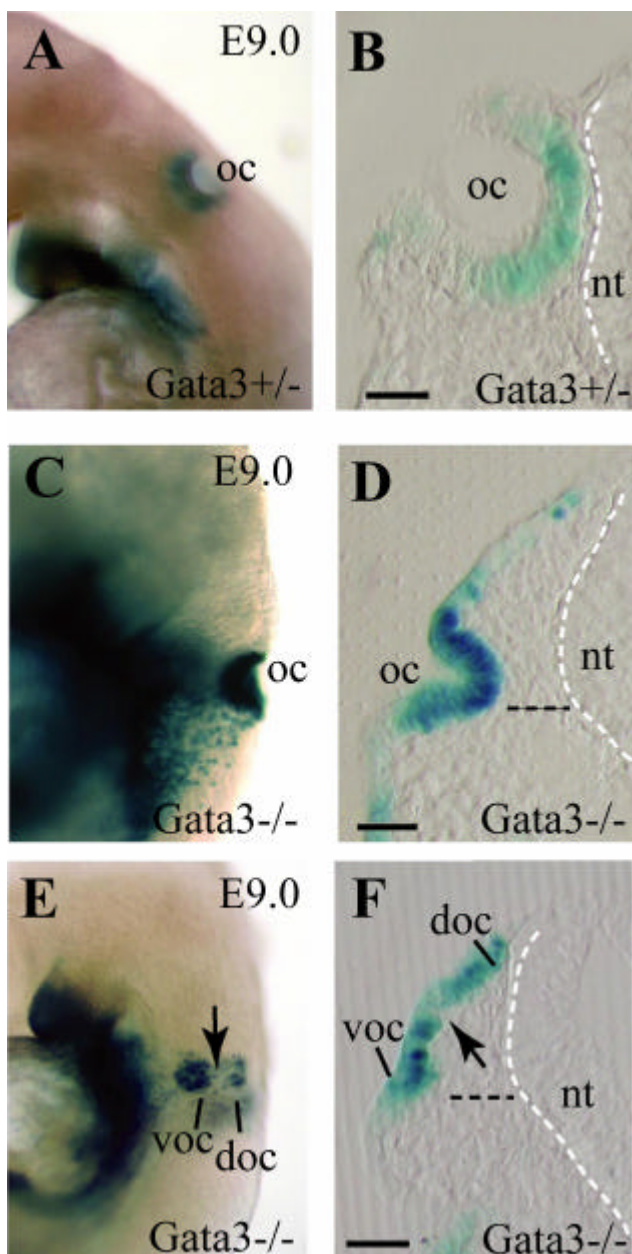
Nii *Gata3*^{+/-} kui *Gata3*^{-/-} embrüotel initsieeritakse *Gata3/nlslacZ* ekspressioon 12 somiidipaari staadiumis (E8.5). *Gata3/nlslacZ* avaldub terves kõrvaplakoodis (joonis 3A-D), selles vanuses ei ole aga *Gata3/nlslacZ* ekspressioon detekteeritav kõrvaala ümbritsevates kudedes: mesenhüümis ja neuraalkoes. Kõrvaplakoodi initsiatsioon ei ole mutantidel häiritud ning enamusel juhtudel on plakoodi kuju ja suurus võrreldavad kontrollembriüote omaga. Ent siiski võib mõnel *Gata3* mutantsel embrüol juba plakoodi staadiumis märgata esimesi morfoloogilisi muutusi arenevas kõrvas. *Gata3*^{-/-} embrüotel võib plakoodi alas esineda kaks eristunud domääni: ventraalne laiem ja dorsaalne kitsam regioon (joonis 3D).



Joonis 3. *Gata3*^{+/-} ja *Gata3*^{-/-} hiireembrüote kõrvaplakoodi morfoloogia, β-galaktosidaasi värvusreaktsioon. *Gata3/nlslacZ* ekspressioon *Gata3*^{+/-} (A, B) ja *Gata3*^{-/-} (C, D) hiireembrüotes vanuses E8.5 (12 somiidipaari staadium). Pildidel A ja C on noolega märgitud kõrvaplakoodi ala. 30 μm vibratoomilõigud (B, D) on lõigatud vastavalt A ja C embrüotest horisontaalselt läbi kõrvapiirkonna, nagu on näidatud pildil A musta joonega. Mõõtskaala on 50 μm. Lühendid: p, kõrvaplakood; vp, plakoodi ventraalne domään; dp, plakoodi dorsaalne domään.

Vanuses E9.0 on *Gata3*^{+/-} ja *Gata3*^{-/-} hiirtel *Gata3/nlslacZ* ekspressioon detekteeritav kogu kõrvaepiteelis (joonis 4A). Heterosügootsetel *Gata3* embrüotel on tugevam ekspressioon kõrvasüvendi ventromediaalses pooles ning nõrgem dorsaalses regioonis (joonis 4B). Kõrvaepiteeli invagineerumise staadiumis on sisekõrva arenguhäired *Gata3* puudumisel juba väga selgelt avaldunud: areneva kõrva kuju on muutunud ja see on väiksem võrreldes *Gata3*^{+/-} embrüotega (joonis 4A-D). Selles arengujärgus on ligi pooltel *Gata3*^{-/-} hiireembrüotel *otic cup* struktuuri keskel täheldatav kitsendus, mis jagab sissesopistuva kõrvaepiteeli kaheks domääniks: ventraalseks ja dorsaalseks regiooniks (joonis 4E, F).

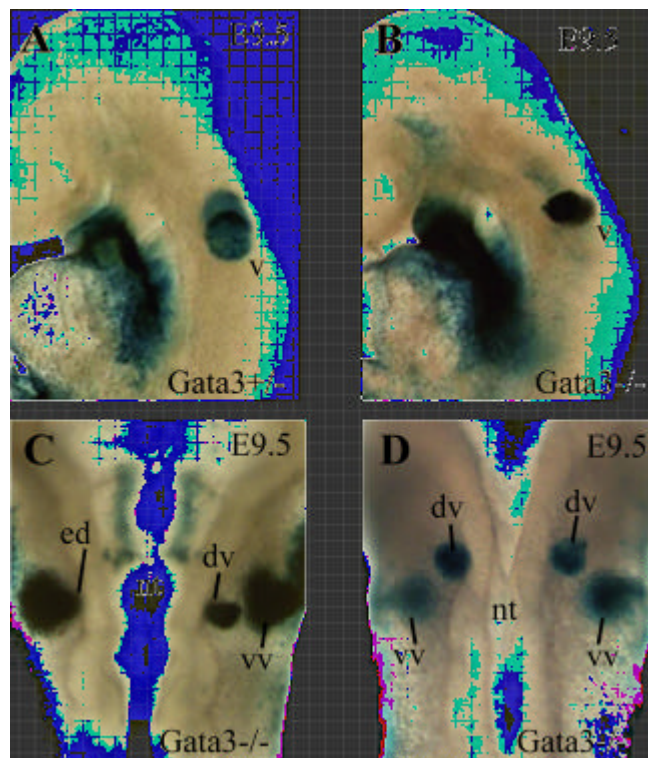
Gata3^{+/-} hiireembrüotel toimub normaalne kõrvaplakoodi invagineerumine, mil neuraalitoru ja kõrvaepiteeli vahel on tihe kontakt (joonis 4B). Kõrvaplakoodi invaginatsiooni mehhanismide kohta puudub seni täpne arusaam. Kaks uurimisrühma on näidanud, et kõrvaplakoodi normaalseks sissesopistumiseks võib olla vajalik kõrvaepiteeli tihe seotus neuraalitoruga (Moro-Balbàs *et al.*, 2000; Visconti ja Hilfer, 2002). *Gata3*-puudulikel embrüotel on kõrvaepiteeli kontakteerumine neuraalitoruga häiritud (joonis 4D, F märgitud musta punktiirjoonega). Siiski tekib *Gata3*^{-/-} embrüotel kontakt kõrvaepiteeli dorsaalse domääni ja neuraalitoru vahel, kuid kokkupuutepiirkond on kitsam ja kontakt ajaliselt lühem võrreldes kontrollembriotega (joonis 4F).



Joonis 4. *Gata3*^{+/-} ja *Gata3*^{-/-} areneva sisekõrva (*otic cup*) morfoloogia, β -galaktosidaasi värvusreaktsioon.

Gata3/nls lacZ ekspressioon *Gata3*^{+/-} (A, B) ja *Gata3*^{-/-} (C, D, E, F) embrüotes vanuses E9.0. Vibratoomilõigud (B, D, F) on lõigatud eelnevalt värvitud vastavalt (A, C, E) embrüotest horizontaalselt läbi kõrvapiirkonna nagu on näidatud joonisel 3A. Nooled piltidel E ja F märgivad epiteeli sissesopistumisel tekkivate kahe domääni piiri. Piltidel B, D, F on valge punktiirjoonega märgitud neuraalitoru välimine piir ning piltidel D ja F märgib must punktiirjoon kahe epiteeli vahelist ala. Lühendid: oc, *otic cup*; voc, *otic cup* ventraalne domään; doc, *otic cup* dorsaalne domään; nt, neuraalitoru. Mõõtskaala 50 μ m.

Vanuses E9.5 on *Gata3/nlslacZ* ekspresseerunud üle terve kõrvaepiteeli (joonis 5A, B). Selleks vanuseks on nii *Gata3*^{+/-} kui ka *Gata3*^{-/-} embrüote kõrvavesiikulid sulgunud, kuid mutantsetel hiirtel on vesiikuli kuju muutunud. *Gata3*^{+/-} embrüote ototsüstid on ümmarguse kujuga (joonis 5A), ent *Gata3* puudumine põhjustab vesiikuli dorsoventraalse väljavenimise ja seega ovaalse kuju (joonis 5B). Huvitava asjaoluna selgus, et *Gata3*-puudulikes embrüotes võib pea ühele või mõlemale küljele areneda kaks kõrvavesiikulit (joonis 5C, D). *Gata3* mutantsetest embrüotest esines 48.5% (16/33) kaks eraldiseisvat vesiikulit pea ühel poolel (joonis 5C) või mõlemal poolel (joonis 5D). Sagedamini olid kaks vesiikulit vaadeldavad pea ühel küljel (13/16); dorsaalselt asetsev vesiikul on alati ventraalsest väiksem ning neid ei moodustunud pea ühele küljele kunagi rohkem kui kaks.

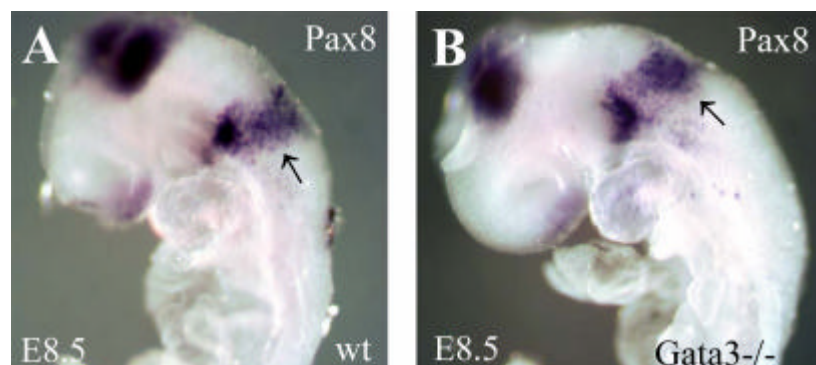


Joonis 5. *Gata3*^{+/-} ja *Gata3*^{-/-} sisekõrva vesiikuli morfoloogia, β-galaktosidaasi värvusreaktsioon. *Gata3/nlslacZ* ekspressioon *Gata3*^{+/-} (A) ja *Gata3*^{-/-} (B, C, D) embrüotes vanuses E9.5. *Gata3*^{-/-} embrüo pea ühel küljel (C) ja mõlemal küljel (D) paiknevad kaks eraldiseisvat vesiikulit. Pildid C ja D on pildistatud dorsaalsest vaatest. Lühendid: v, kõrvavesiikul; ed, endolümfaatiline juha; nt, neuraalitoru; dv, dorsaalselt asuv kõrvavesiikul; vv, ventraalselt asuv kõrvavesiikul.

2.3.2 Morfogeneesi uurimine ekspressioonimarkeri *Pax8* abil

Paired box transkriptsioonifaktorite perekonda kuuluv *Pax8* ekspresseerub sisekõrvas arengu algetappidel. *Pax8* on varaseim geen, mis ekspresseerub spetsiifiliselt ektodermaalsetes kõrva eellasrakkudes ning mesenhüümis juba enne plakoodi formeerumist (Noramly ja Grainger, 2002; Riley ja Phillips, 2003), seega varem kui *Gata3*. Kõrvaplakoodi ja *otic cup*’i morfoloogia ja identiteedi täiendavaks uurimiseks analüüsisin *Pax8* ekspressiooni *Gata3*-puudulikel hiireembrüotel.

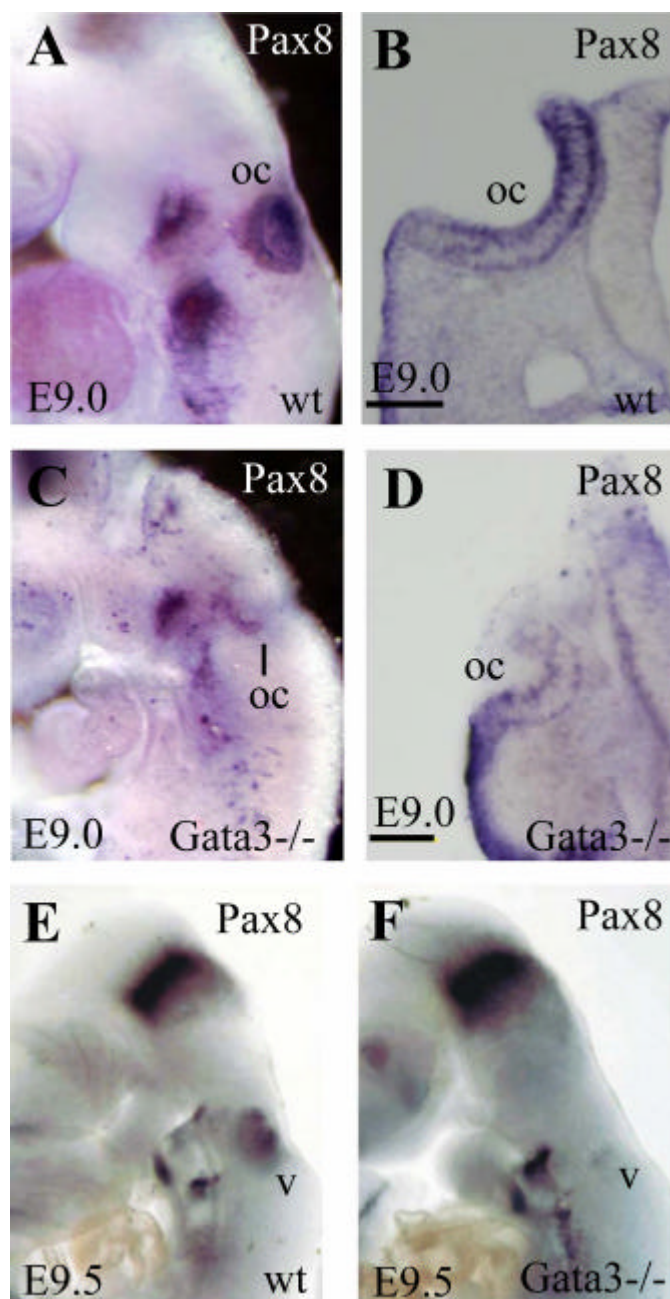
Vanuses E8.5 ekspresseerub *Pax8* kõrvaplakoodis ning ventraalselt paiknevas pindmises ektodermis (joonis 6A). Selles vanuses avaldub *Pax8* ka *Gata3*-puudulike embrüote arenevas kõrvaplakoodis, olles võrreldav normaalsete embrüotega (joonis 6B). See näitab, et *Gata3* mutandi kõrvaplakoodi kuju ja suurus ei ole märkimisväärselt muutunud ning varajane kõrvaepiteel ekspresseerib nn kõrva identifitseerimismarkerit.



Joonis 6. *Pax8* ekspressiooni analüüs embrüotele vanuses E8.5. *Whole mount in situ* hübriidsatsiooni analüüs *Pax8 antisense* prooviga metsiktüüpi (A) ja *Gata3*^{-/-} (B) embrüotele. Nooled märgivad kõrvaplakoodi ala.

Vanuses E9.0 avaldub *Pax8* terves *otic cup* epiteelis, samas on mutantsetel *Gata3*^{-/-} embrüotel *Pax8* ekspressioon alla reguleeritud (joonis 7A-D). Vanuses E9.5 on *Pax8* detekteeritav normaalsete hiireembrüote kõrvavesiikuli dorsomediaalses domäänis, kuid puudub täielikult *Gata3*^{-/-} isenditel (joonis 7E, F).

Alates vanusest E10.5-11.5 reguleeritakse *Pax8* ekspressioon normaalsete hiirte kõrvavesiikulis maha (andmed esitamata). Seega reguleeritakse *Gata3* puudumisel *Pax8* ekspressioon arenevas sisekõrvas alla enneaegselt, juba kõrvaepiteeli sissesopistumise staadiumis.



Joonis 7. *Pax8* ekspressiooni analüüs E9.0 ja E9.5 embrüotele. *Whole mount in situ* hübridisatsiooni analüüs *Pax8 antisense* prooviga normaalsetele (A, E) ja *Gata3*^{-/-} (C, E) embrüotele. Piltidel B ja D kujutatud vibratoomilõigud on lõigatud eelnevalt hübridiseeritud embrüotest (vastavalt A, C) horisontaalselt läbi kõrvapiirkonna, nagu on näidatud joonisel 3A. Mõõtskaala 50 µm. Lühendid: oc, *otic cup*; v, kõrvavesiikul.

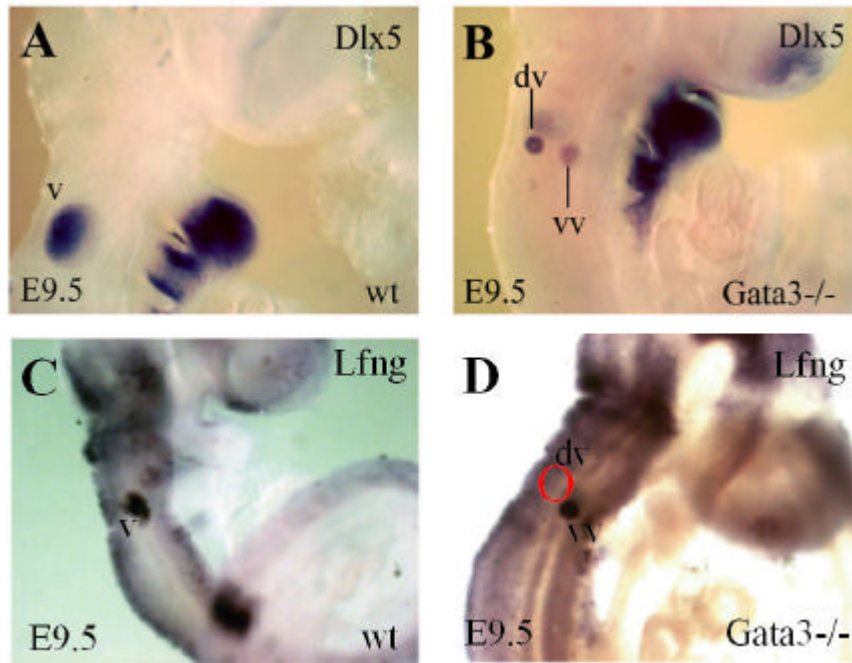
2.3.3 *Gata3*^{-/-} mutantse hiire pea ühel küljel paiknevate vesiikulite identiteedi määramine

Varem on näidatud, et *Gata3*^{-/-} embrüotel on säilinud kõrvavesiikulite dorsoventraalne polaarsus: mutantsetes vesiikulites ei ole *Pax2*, *Eya1* ning *Six1* ekspressioonid muutunud (Lilleväli *et al.*, 2004). Nimetatud geenid kuuluvad konserveerunud *Pax-Six-Eya-Dach* geenivõrgustikku, mis kontrollivad kärbses imetajani erinevate organite arengut (Ozaki *et al.*, 2004).

Gata3^{-/-} embrüote kahe vesiikuli iseloomustamiseks kasutasin sisekõrva spetsiifilistes domäänides ekspresseeruvaid kõrva markergeene. Selleks analüüsisin otsüsti dorsaalses domäänis ekspresseeruva geeni *Dlx5* ja ventraalselt avalduva geeni *Lfn3* ekspressiooni kahte eraldiseisvat vesiikulit omavates mutantides. Vanuses E9.5 ekspresseerub *Dlx5* kõrvaepiteeli dorsaalses domäänis, kattes tulevaste poolringkanalite ja endolümfaatilise juha regiooni (Merlo *et al.*, 2002). Sama ekspressioonimustrit täheldasin ka käesoleva töö käigus (joonis 8A). Pea ühel küljel kahte vesiikulit omavate *Gata3* mutantsete embrüote analüüsil detekteerisin tugeva *Dlx5* ekspressiooni dorsaalselt asetsevas vesiikulis, vaid nõrga ekspressiooni ventraalses vesiikulis (joonis 8B).

Teadaolevalt, ekspresseerub *Lfn3* kõrvavesiikuli anterioventraalses domäänis, kattes tulevaste sensoorsete alade regiooni (Morsli *et al.*, 1998). Sama tulemuse sain ka antud töö raames teostatud *Lfn3* ekspressioonanalüüsil (joonis 8C). *Gata3* mutantse hiireembrüo kahest kõrvavesiikulist on *Lfn3* detekteeritav ainult ventraalselt paiknevas otsüstis ja puudub täielikult dorsaalses vesiikulis (joonis 8D).

Saadud tulemused näitavad, et *Gata3*^{-/-} embrüote pea ühel küljel esinevatel eraldiseisvatel kõrvavesiikulitel on erinev identiteet sõltuvalt dorsaalsest või ventraalsest positsioonist. Ühel küljel paiknevate vesiikulite erinev identiteet võib tuleneda nii ühe kõrvaepiteeli jagunemisest kaheks, mil erinevad domäänid on juba määratletud, või kahe sõltumatu vesiikuli tekkimisest, mille identiteet määratletakse vastavalt ümbritsevale keskkonnale. *Gata3* mutantide puhul on tõenäoline esimene variant, kuna kahte kõrvaplakoodi ei täheldanud ma katsete käigus kordagi ning kõrvaplakoodi invagineerumisel oli sageli nähtav epiteeli jagunemine dorsaalseks ning ventraalseks domääniks.

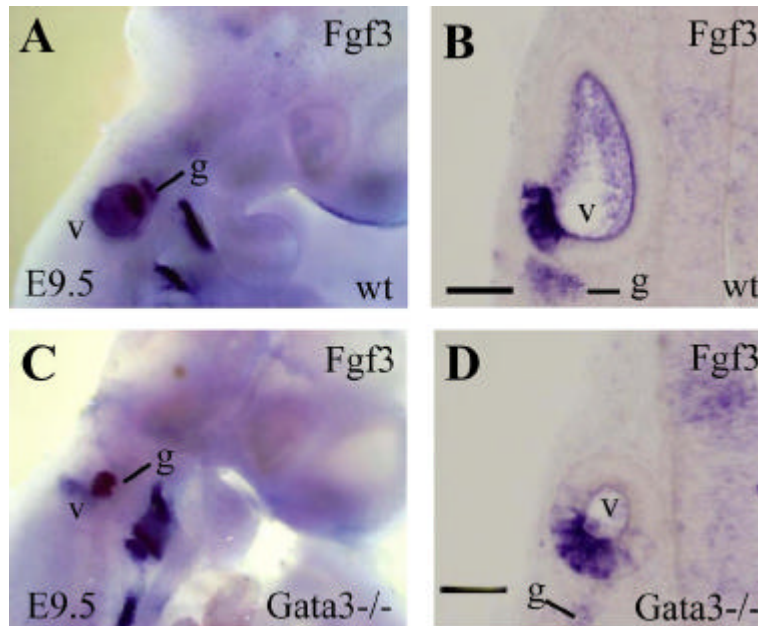


Joonis 8. *Gata3*^{-/-} embrüo dorsaalse ja ventraalse vesiikuli identiteedi analüüs. *Whole mount in situ* hübridisatsiooni analüüs E9.5 vanuses normaalsetele (A, C) ja *Gata3*^{-/-} (B, D) hiireembrüotele dorsaalse markergeeni *Dlx5* (A, B) ja ventraalse markergeeni *Lfng* (C, D) antisense prooviga. Pildil D on punase ringjoonega tähistatud dorsaalselt paikneva vesiikuli asukoht. Lühendid: v, vesiikul; dv, dorsaalselt asetsev kõrvavesiikul; vv, ventraalselt asetsev kõrvavesiikul.

2.3.4 Fgf-signalisatsioon *Gata3*^{-/-} hiireembrüote kõrvaalas

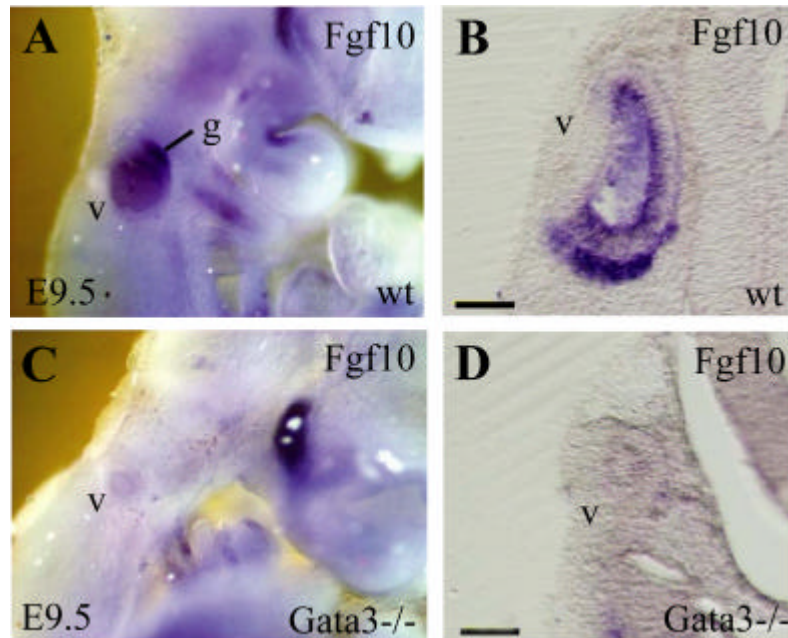
Erinevad Fgf faktorid on vajalikud mitmete organite väljakujunemisel. Sisekõrvas omavad Fgf faktorid olulisi rolle nii induktsiooni protsessis kui ka hilisemas morfogeneesis ning sensoorsete rakkude arengus. Varem on näidatud, et *Fgf3* ja *Fgf10* topelmutantsed hiired omavad tõsiseid sisekõrva induktsiooni- ning arenguhäireid (Wright ja Mansour, 2003; Alvarez *et al.*, 2003). Analüüsisin *Fgf3* ja *Fgf10* ekspresiooni ning Fgf-signaaliraja sihtmärkgeeni *Etv5* avaldumist *Gata3*^{-/-} mutantide kõrvaepiteelis. *Fgf3* ja *Fgf10* ekspresioonimustrid on osaliselt kattuvad vesiikuli anterioventraalses domäänis ning arenevas kõrvaganglionis (joonis 9A, B ja 10A, B).

Fgf3 ekspressioon initsieeritakse hiire kõrvaepiteelis 14 somiidi staadiumis (E8.5) (Alvarez *et al.*, 2003). Pärast vesiikuli sulgumist vanuses E9.5 on *Fgf3* detekteeritav ototsüsti anterioventraalses regioonis ning VIII kraniaalganglionis (joonis 9A, B). Homosügootsetel *Gata3* mutantsetel hiireembrüotel ei ole *Fgf3* ekspressioon muutunud kõrvaepiteelis ega -ganglionis võrreldes normaalsete hiirtega (joonis 9C, D).



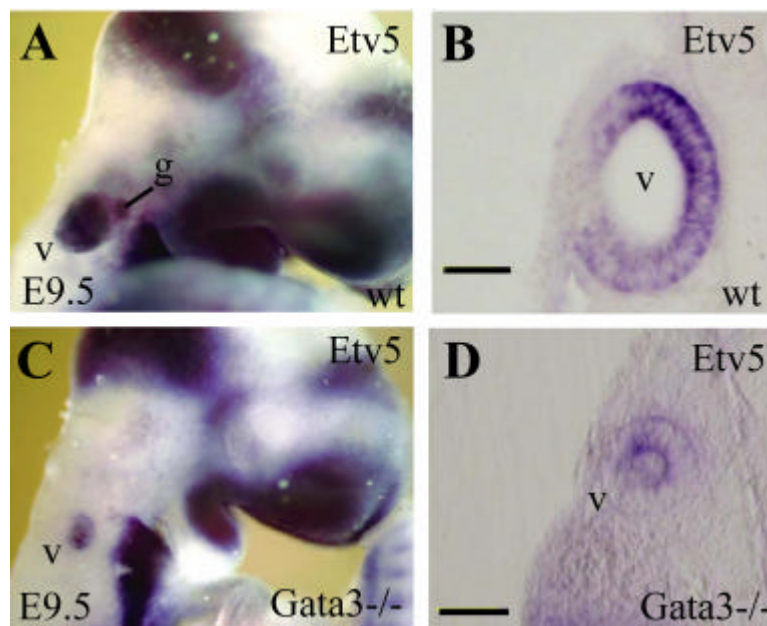
Joonis 9. *Fgf3* ekspressioon kõrvavesiikulis ja arenevas VIII kraniaalganglionis hiireembrüotel vanuses E9.5. *In situ* hübridisatsiooni analüüs *Fgf3 antisense* prooviga normaalsetele (A, B) ning *Gata3*^{-/-} (C, D) embrüotele. Lõigud (B, D) on tehtud vastavalt eelnevalt hübridiseeritud embrüotest (A, C). Vibratoomilõikude tegemise skeem on kujutatud joonisel 3A. Mõõtskaala 50 μm. Lühendid: v, vesiikul; g, arenev VIII kraniaalganglion.

Fgf10 ekspressioon on detekteeritav kõrvaepiteeli sissesopistumisel pärast *Fgf3* ekspressiooni initsiatsiooni (Alvarez *et al.*, 2003). Erinevalt *Fgf3* avaldumisest *Gata3*^{-/-} hiireembrüote kõrvaalas, ei initsieerita *Fgf10* ekspressiooni mutantses kõrvaepiteelis ega ka -ganglionis (joonis 10C, D).



Joonis 10. *Fgf10* ekspressiooni analüüs kõrvavesiikulis ja arenevas VIII kraniaalganglionis hiireembrüotel vanuses E9.5. *In situ* hübridisatsiooni analüüs *Fgf10* antisense prooviga normaalsetele (A, B) ja *Gata3*^{-/-} embrüotele (C, D). Piltidel B ja D kujutatud vibratoomilõigud on tehtud eelnevalt hübridiseeritud embrüotest (vastavalt A ja C). Lõikude tegemise skeem on toodud joonisel 3A. Mõõtskaala 50 µm. Lühendid: v, kõrvavesiikul; g, arenev VIII kraniaalganglion.

Järgnevalt analüüsisin *Fgf10* sihtmärkgeeni *Etv5* (nimetatud ka *Erm*; Roehl ja Nüsslein-Vollhard, 2001) ekspressiooni sisekõrvas. Vanuses E9.5 ekspresseerub *Etv5* kõrvavesiikuli anterioorses, ventraalses ja posterioorses domäänis ning arenevas kõrvaganglionis (joonis 11A, B). Samas vanuses on *Gata3* puudumisel *Etv5* ekspressioon osaliselt alla reguleeritud (joonis 11C, D).



Joonis 11. *Etv5* ekspressioon kõrvavesiikulis hiireembrüotel vanuses E9.5. *In situ* hübridisatsioon *Etv5 antisense* prooviga normaalsetele (A, B) ja *Gata3*^{-/-} embrüotele (C, D). Piltidel B ja D kujutatud vibratoomilõigud on tehtud eelnevalt hübridiseeritud embrüotest (vastavalt A ja C). Vibratoomilõikude tegemise skeem on toodud joonisel 3A. Mõõtskaala 50 µm. Lühendid: v, kõrvavesiikul; g, arenev VIII kraniaalganglion.

Fgf10 ekspressiooni puudumine *Gata3* mutandi kõrvaepiteelis võib olla põhjustatud vastava domääni puudumisest, kus *Fgf10* avaldub. Kuna *Fgf3* ja *Fgf10* ekspressioonid on kõrvavesiikulis peamiselt kattuvad ning *Fgf3* ekspressioon ei ole muutunud *Gata3* mutantsetes hiirtes, viitab see kõrvavesiikuli vastava domääni säilimisele. On teada, et *Fgf10*-puudulikel hiirtel on häiritud poolringkanalite arenemine (Pauley *et al.*, 2003) ning *Gata3* mutantidel ei arene ükski poolringkanal (Karis *et al.*, 2001). Võib oletada,

et *Gata3* mutantide sisekõrva vestibulaaraparaadi arenguhäired on osaliselt põhjustatud *Fgf10* signalisatsiooni puudumisest sisekõrvas.

Fgf10 ekspressiooni spetsiifiline puudumine *Gata3* mutantses kõrvaregioonis viitab nimetatud geenide omavahelisele seotusele. Selgitamaks, kas *Gata3* reguleerib *Fgf10* ekspressiooni sisekõrvas, analüüsisin inimese ja hiire genoomset järjestust transkriptsiooni startkoha ümber 3.5-4 kb ulatuses. Kasutasin Consite programmi (Lenhard *et al.*, 2003), mis identifitseeris mitmeid konserveerunud *Gata3* seondumiskohti *Fgf10* geenis. Sama analüüs *Fgf3* promootorregioonis ei leidnud ühtki konserveerunud *Gata3* seondumiskohta .

2.4 Arutelu

Sisekõrva keeruline struktuur areneb lihtsast epiteliaalsest plakoodist, mis annab aluse terve membraanse labürindi ja kõrvaganglioni väljakujunemisele. Kuigi sisekõrva arenemise etapid on üksikasjaliselt kirjeldatud, on siiani protsessi molekulaarsete mehhanismide kohta vähe infot. Transkriptsioonifaktor *Gata3* osaleb sisekõrva morfogeneesis, on vajalik meele- ja tugirakkude säilimiseks ning sisekõrva innerveerivate närvijätmete navigatsioonil (van der Wees *et al.*, 2004; Karis *et al.*, 2001). *Gata3*^{-/-} mutantidel puuduvad kõik kolm poolringkanalit, utriikul ja sakkul ning teo väljakasv on pidurdunud (Karis *et al.*, 2001). Vaatmata tõsisele fenotüübile on *Gata3* mutantsetes vesiikulites säilinud dorsoventraalne teljepolaarsus (Lilleväli *et al.*, 2004). Siiani pole täpselt iseloomustatud *Gata3*^{-/-} hiireembrüote sisekõrva varajast fenotüüpi ning ei olnud teada ka ühtki *Gata3* sihtmärkgeeni kõrvaepiteelis.

Gata3 ekspressioon initsieeritakse juba kõrvaplakoodis ning *Gata3* mutantidel on sisekõrva fenotüüp täheldatav juba mõne tunni möödudes. Mõnel juhul võib plakoodistaadiumis *Gata3* mutantidel kõrvaepiteel jaguneda kaheks domääniks, ventraalseks paksemaks ja dorsaalseks kitsamaks regiooniks, kuid *otic cup*-staadiumiks on areneva kõrva kuju muutunud kõigis mutantsetes embrüotes, olles väiksem ja kitsam võrreldes kontrollembrüotega. Mutantidel võib *otic cup* epiteelis esineda kitsendus, mis jaotab struktuuri kaheks: dorsaalseks ja ventraalseks domääniks. Huvitava asjaoluna ilmnes, et *Gata3*^{-/-} embrüotel toimub osaline kontakt kõrvaepiteeli ja neuraaltoru vahel hiljem kui tavapäraselt ning see on nii ajalisel kui ruumiliselt vähenenud. Normaalsel juhul on plakoodi sissesopistumisel kõrvaepiteel tihedas kontaktis neuraaltoriga. Uuringud on näidanud, et kõrvaplakoodi ja neuraaltoru kokkupuutumine on kõrvaplakoodi invaginatsioonis olulise tähtsusega (Moro-Balbàs *et al.*, 2000; Visconti ja Hilfer, 2002). Antud protsessis võib vajalik olla ekstratsellulaarse matriksi adhesioonimolekulide vahendusel toimuv signaliseerimine, kuna kõrvaplakoodi ja neuraaltoru vahelise adhesiooni blokeerimine põhjustab kõrvaepiteeli invaginatsiooni häireid (Brown *et al.*, 1998). Vaatamata tõsisele invaginatsioonihäiretele suudab *Gata3* puudumisel kõrvaepiteel sulguda ja moodustada vesiikuli samal ajal kontrollembrüotega. *Gata3* puudumisel on vesiikulid alati väiksemad ja/või dorsoventraalselt väljaveninud ovaalse kujuga. Ent ligi pooltel *Gata3* mutantsetel hiirtel võib kõrvaepiteel jaguneda kaheks iseseisvaks vesiikuliks.

Neil eraldiseisvatel vesiikulitel on erinev identiteet: dorsaalselt asetsev vesiikul ekspresseerib dorsaalseid kõrvamarkereid ja ventraalne vesiikul ventraalseid kõrvamarkereid. Ühel küljel paiknevate vesiikulite erinev identiteet võib tuleneda nii ühe kõrvaepiteeli jagunemisest kaheks, mil erinevad domäänid on juba määratletud kui ka kahe vesiikuli tekkimisest, mis määratletakse vastavalt ümbritsevale keskkonnale. *Gata3* mutantidel on tõenäoline esimene variant, kuna neil ei tekkinud kunagi kahte kõrvaplakoodi ning *otic cup*-staadiumis oli näha kõrvaepiteeli jagunemine ventraalseks ja dorsaalseks domääniks. *Gata3* mutantidel täheldatav kõrvaala eraldumine kaheks on unikaalne sündmus. Esmakordselt kirjeldatakse erineva identiteediga kahe vesiikuli moodustumisest embrüo pea ühele või mõlemale küljele. Tundub, et *Gata3* on spetsiifiliselt vajalik kõrvaplakoodi morfogeneesis, sest *Gata3*^{-/-} embrüotel ei esine häireid läätseplakoodi invaginatsioonil, kuigi *Gata3* on ka seal ekspresseerunud (andmed esitamata).

Kõrvaplakoodi ja *otic cup*’i morfoloogia täiendavaks uurimiseks ning identiteedi määramiseks analüüsisin *Pax8* ekspressiooni *Gata3* mutantides. *Pax8* on varaseim kõrvas ekspresseeruv geen, mis avaldub kõrva eellasrakkudes ning hiljem otsüsti dorsomediaalses domäänis. Normaalsetel embrüotel hakkab *Pax8* tase vähenema sisekõrva epiteelist alates vanusest E10.5. Huvitavad protsessid toimuvad aga arenevas sisekõrvas *Gata3* puudumisel: *Pax8* initsieeritakse *Gata3* mutantides küll õigeaegselt, kuid juba kõrvaepiteeli sissesopistumisel reguleeritakse *Pax8* tase kiiresti alla ning kõrvavesiikulist puudub see täielikult. Seega reguleeritakse *Gata3* puudumisel *Pax8* ekspressioon kõrvaepiteelis maha enneaegselt. Kirjeldatud olukord annab alust oletusteks, et homosügootsetel *Gata3* mutantidel toimuvad teatud protsessid arenevas sisekõrvas varem kui normaalsetel embrüotel.

Gata3 mutantide kõrvaepiteeli invaginatsioonihäired ja potentsiaalsed enneaegsed protsessid võivad olla nii esmased kui teisesed arengudefektid. Ühe variandina on võimalik, et kõrvaplakoodi sissesopistumise häired põhjustavad sisekõrvas enneaegseid protsesse, kuna signaalid neuraalorust ei ole piisavad kõrvaepiteeli invaginatsiooniks. Samas ei saa välistada, et enneaegsed protsessid sisekõrvas kutsuvad esile muutused kõrvaepiteeli invaginatsioonis.

Fgf-perekonna faktorid on olulised mitmete organite arengus (ülevaade Ornitz ja Itoh, 2001). Erinevate Fgf faktorite vajalikkust on kirjeldatud ka sisekõrva arengus, nii kõrva induktsioonis kui morfogeneesis (Mansour *et al.*, 1993; Alvarez *et al.*, 2003;

Pauley *et al.*, 2003; Wright ja Mansour, 2003). Seega on Fgf-signaliseerimine olnud pikka aega kõrvateadlaste huviorbiidis, kuid siiani polnud kirjeldatud ühtki geeni, mis reguleerib Fgf-perekonna liikmete avaldumist kõrvas. Uurides Fgf-signaliseerimist *Gata3* mutantsetel embrüotel, leidsin et *Gata3*^{-/-} hiirtes ei initsieerita *Fgf10* ekspressiooni kõrvaalas. Analüüsid *Fgf10* promootorjärjestuse piirkonda leidsin, et selles esineb mitmeid erinevates organismides (hiir, inimene ja kana) konserveerunud *Gata3* seondumiskohti. Nimetatud geenide ekspressioonimustrid kattuvad kõrvaepiteeli sensoorsetes domäänides (Pauley *et al.*, 2003; Lilleväli *et al.*, 2004). On näidatud, et poolringkanalite sensoorsetes alades avalduv *Fgf10* initsieerib *Bmp2* ekspressiooni mittesensoorses epiteelis, mis omakorda reguleerib poolringkanalite väljakasvamise (Chang *et al.*, 2004). Asjaolud viitavad, et *Fgf10* võiks olla *Gata3* otsene sihtmärkgeen. *Fgf10*^{-/-} ja *Gata3*^{-/-} embrüote sisekõrva vestibulaarsüsteemi arenguhäired on väga sarnased: kõigi kolme poolringkanali areng on vastavalt häiritud või täielikult puudulik. Kontrollides Fgf-signaaliraja sihtmärkgeeni *Etv5* ekspressiooni *Gata3* mutantides täheldasin, et see on kõrvaepiteelis ja –ganglionis alla reguleeritud. *Fgf3* avaldumine ei ole *Gata3* mutantides muutunud ning kuna *Fgf3* ja *Fgf10* ekspressioonid on kõrvaalas osaliselt kattuvad, näitab see kõrvavesiikuli vastavate ekspressioonidomäänide säilimist.

Võib järeldada, et *Gata3* mutantsetel embrüotel ei arene poolringkanalid *Fgf10* puudumise tõttu vestibulaarses sensoorses epiteelis. Siiski peab *Gata3* mutantidel poolringkanalite väljakasvamisel esinema teisigi faktoreid, kuna *Fgf10*^{-/-} embrüotel ei ole sisekõrva fenotüüp nii tõsine kui *Gata3*^{-/-} hiirtel.

On näidatud, et *Fgf10* reguleerib *NeuroD* ekspressiooni arenevas kana kõrvaganglionis (Alsina *et al.*, 2004). Varasemast on teada, et *Gata3*^{-/-} embrüotel puudub VIII kraniaalganglioni auditoorne regioon (Karis *et al.*, 2001) ning on kirjeldatud *Gata3* vajalikkust *NeuroD* ekspressiooni alalhoidmiseks auditoorsetes neuroblastides (Lawoko-Kerali *et al.*, 2004). Käesoleva töö põhjal võib oletada, et *Gata3* reguleerib *NeuroD* ekspressiooni auditoorsetes neuroblastides üle *Fgf10*-signaaliraja.

KOKKUVÕTE

Käesolev magistritöö seisneb *Gata3* rolli selgitamises hiire sisekõrva varajases morfogeneesis ning Fgf-signaliseerimise hindamises *Gata3* mutantsete embrüote sisekõrvas.

Tehtud töö tulemusena selgus, et :

- *Gata3* on vajalik sisekõrva arengu varajastes staadiumides kõrvaepiteeli korrektseks invaginatsiooniks ning tervikliku kõrvaepiteeli säilimiseks. *Gata3* mutantsetel hiireembrüotel võivad pea ühele või mõlemale küljele areneda kaks eraldiseisvat kõrvavesiikulit, mille epiteelide identiteet erineb. Esmakordselt kirjeldatakse ühtse algupäraga kahe iseseisva kõrvavesiikuli tekkimist pea ühel küljel.
- *Gata3* puudumisel reguleeritakse *Pax8* ekspressioon kõrvaepiteelis maha enneaegselt, juba plakoodi sissesopistumise staadiumis.
- *Gata3* reguleerib Fgf-signalisatsiooni sisekõrvas. *Fgf10* ekspressiooni ei initsieerita *Gata3*-puudulikus kõrvaepiteelis ja –ganglionis. Samuti on *Fgf10* sihtmärkgeeni *Etv5* ekspressioon *Gata3* mutantide ototsüstis alla reguleeritud. Genoomse järjestuse analüüs *Fgf10* promootorpiirkonnas näitas, et vastavas alas on mitmeid konserveerunud *Gata3* seondumiskohti. *Gata3* ja *Fgf10* ekspressioonimustrid on kattuvad kõrvaepiteeli sensorsetes domäänides. Kirjeldati esimene faktor, mis reguleerib *Fgf10* ekspressiooni kõrvakoes.

SUMMARY

The inner ear is one of the most complex structures that form in vertebrates. The mammalian inner ear includes specialized vestibular sensory organs for balance and a coiled cochlea for hearing. Inner ear develops from the otic placode which first invaginates and then closes to form the epithelial otic vesicle. The subsequent patterning and morphogenesis result in a complex three-dimensional structure, the membranous labyrinth harbouring specialized dorsal vestibular sensory organs, three semicircular ducts, utricle and saccule, and a ventral cochlea. The sensory functions of the ear are carried out by the mechanosensory hair cells that differentiate at specific areas. The complex events through which the otic vesicle is transformed into the membranous labyrinth have been described in detail, but the underlying molecular mechanisms are still largely unknown.

Transcription factor *Gata3* belongs to the *Gata* family (*Gata1-6*) in vertebrates. From this family, only *Gata2* and *Gata3* are expressed in inner ear in a partially overlapping manner (Lilleväli *et al.*, 2004). Targeted mutation of *Gata3* leads to a severe arrest in inner ear morphogenesis; no semicircular ducts form and the cochlear duct remains very short (Karis *et al.*, 2001).

The current Master of Sciences thesis are concerned on elucidation of *Gata3* roles in inner ear early developmental stages and valuation the *Fgf*-signalling in *Gata3* mutants. The following main results can be outlined:

- *Gata3* has a unique role during the initial morphogenetic event, invagination of the otic placode, and it is required to maintain the integrity of the otic vesicle.
- The lack of *Gata3* leads to premature downregulation of *Pax8* expression already in otic cups. This change may point towards precocious processes in otic epithelium.

- *Gata3* is necessary for *Fgf10*-dependent signalling in otic epithelium and vestibulocochlear ganglion. The lack of *Fgf10* in *Gata3* deficient otic region explains many aspects of the vestibular defects.

A manuscript of these results has been submitted: Lilleväli, K., Matilainen, T., Haugas, M., Pussinen, C., Karis, A., and Salminen, M. *Gata3* controls placode morphogenesis, *Fgf10*-signalling and cochlear differentiation during otic development.

TÄNUAVALDUSED

Täna oma juhendajat Kersti Lillevälja huvitava teema ja asjaliku juhendamise eest ning juhendaja Jüri Kärnerit meeldiva koostöö eest. Suur tänu Alar Karisele toetuse eest magistriõppe läbimisel. Tulemuste analüüsimisel ja interpreteerimisel on suureks abiks olnud Marjo Salminen.

Meeldejäävate aastate eest täna toredat laboriseltskonda.

KIRJANDUSE LOETELU

Alsina, B., Abelló, G., Ulloa, E., Henrique, D., Pujades, C., and Giraldez, F. 2004. Fgf signaling is required for determination of otic neuroblasts in the chick embryo. *Dev. Biol*; vol. 267 no. 1, lk. 119-34.

Alvarez Y, Alonso MT, Vendrell V, Zelarayan LC, Chamero P, Theil T, Bosl MR, Kato S, Maconochie M, Riethmacher D, Schimmang T. 2003. Requirements for FGF3 and FGF10 during inner ear formation. *Development*; vol. 130 no. 25, lk. 6329-38.

Baker CV, Bronner-Fraser M. 2001. Vertebrate cranial placodes I. Embryonic induction. *Dev Biol*; vol. 232 no. 1, lk. 1-61.

Bok J, Bronner-Fraser M, Wu DK. 2005. Role of the hindbrain in dorsoventral but not anteroposterior axial specification of the inner ear. *Development*; vol. 132 no. 9, lk. 2115-24.

Brigande JV, Kiernan AE, Gao X, Iten LE, Fekete DM. 2000. Molecular genetics of pattern formation in the inner ear: do compartment boundaries play a role? *Proc Natl Acad Sci U S A*; vol. 97 no. 22, lk. 11700-6.

Brown JW, Beck-Jefferson E, Hilfer SR. 1998. A role for neural cell adhesion molecule in the formation of the avian inner ear. *Dev Dyn*; vol. 213 no. 4, lk. 359-69.

Chang W, Brigande JV, Fekete DM, Wu DK. 2004. The development of semicircular canals in the inner ear: role of FGFs in sensory cristae. *Development*; vol. 131 no. 17, lk. 4201-11.

Depew MJ, Liu JK, Long JE, Presley R, Meneses JJ, Pedersen RA, Rubenstein JL. 1999. Dlx5 regulates regional development of the branchial arches and sensory capsules. *Development*; vol. 126 no 17, lk. 3831-46.

Fekete DM, Wu DK. 2002. Revisiting cell fate specification in the inner ear. *Curr Opin Neurobiol*; vol.12 no. 1, lk. 35-42.

Hendriks RW, Nawijn MC, Engel JD, van Doorninck H, Grosveld F, Karis A. 1999. Expression of the transcription factor GATA-3 is required for the development of the earliest T cell progenitors and correlates with stages of cellular proliferation in the thymus. *Eur J Immunol*; vol. 29 no. 6, lk. 1912-8.

Karis A, Pata I, van Doorninck JH, Grosveld F, de Zeeuw CI, de Caprona D, Fritsch B. 2001. Transcription factor GATA-3 alters pathway selection of

olivocochlear neurons and affects morphogenesis of the ear. *J Comp Neurol*; vol. 429 no. 4, lk. 615-30.

Kiernan AE, Nunes F, Wu DK, Fekete DM. 1997. The expression domain of two related homeobox genes defines a compartment in the chicken inner ear that may be involved in semicircular canal formation. *Dev Biol*; vol. 191 no. 2, lk. 215-29.

Kiernan AE, Steen KP, Fekete DM. 2002. Development of the mouse inner ear. Rmt: Rossant J, Tam PPL (toimetajad), Mouse Development, Patterning Morphogenesis and Organogenesis. *Academic Press*, lk. 539-66.

Ladher RK, Anakwe KU, Gurney AL, Schoenwolf GC, Francis-West PH. 2000. Identification of synergistic signals initiating inner ear development. *Science*; vol. 29 no 5498, lk. 1965-7.

Ladher RK, Wright TJ, Moon AM, Mansour SL, Schoenwolf GC. 2005. FGF8 initiates inner ear induction in chick and mouse. *Genes Dev*; vol. 19 no. 5, lk. 603-13.

Lang H, Bever MM, Fekete DM. 2000. Cell proliferation and cell death in the developing chick inner ear: spatial and temporal patterns. *J Comp Neurol*; vol. 417 no. 2, lk. 205-20.

Lawoko-Kerali G, Rivolta MN, Holley M. 2002. Expression of the transcription factors GATA3 and Pax2 during development of the mammalian inner ear. *J Comp Neurol*; vol. 442 no. 4, lk. 378-91.

Lawoko-Kerali G, Rivolta MN, Lawlor P, Cacciabue-Rivolta DI, Langton-Hewer C, van Doorninck JH, Holley MC. 2004. GATA3 and NeuroD distinguish auditory and vestibular neurons during development of the mammalian inner ear. *Mech Dev*; vol. 121 no. 3, lk. 287-99.

Legan PK, Richardson GP. 1997. Extracellular matrix and cell adhesion molecules in the developing inner ear. *Semin Cell Dev Biol*; vol. 8 no. 3, lk. 217-224.

Leger S, Brand M. 2002. Fgf8 and Fgf3 are required for zebrafish ear placode induction, maintenance and inner ear patterning. *Mech Dev*; vol. 119 no. 1, lk 91-108.

Lenhard B, Sandelin A, Mendoza L, Engstrom P, Jareborg N, Wasserman WW. 2003. Identification of conserved regulatory elements by comparative genome analysis. *J Biol*; vol. 2 no. 2, lk. 13.

Lilleväli K, Matilainen T, Karis A, Salminen M. 2004. Partially overlapping expression of Gata2 and Gata3 during inner ear development. *Dev Dyn*; vol. 231 no. 4, lk. 775-81.

- Lim KC, Lakshmanan G, Crawford SE, Gu Y, Grosveld F, Engel JD.** 2000. Gata3 loss leads to embryonic lethality due to noradrenaline deficiency of the sympathetic nervous system. *Nat Genet*; vol. 25 no. 2, lk. 209-12.
- Mansour SL.** 1994. Targeted disruption of int-2 (fgf-3) causes developmental defects in the tail and inner ear. *Mol Reprod Dev*; vol. 39 no. 1, lk. 62-7; discussion lk. 67-8.
- Mansour, S.L., Goddard, J.M., and Capecchi, M.R.** 1993. Mice homozygous for a targeted disruption of the proto-oncogene int-2 have developmental defects in the tail and inner ear. *Development*; vol. 117 no. 1, lk. 13-28.
- Mansouri A, Hallonet M, Gruss P.** 1996. Pax genes and their roles in cell differentiation and development. *Curr Opin Cell Biol*; vol. 8 no. 6, lk. 851-7.
- Mark M, Lufkin T, Vonesch JL, Ruberte E, Olivo JC, Dolle P, Gorry P, Lumsden A, Chambon P.** 1993. Two rhombomeres are altered in Hoxa-1 mutant mice. *Development*; vol. 119 no. 2, lk. 319-38.
- Maroon H, Walshe J, Mahmood R, Kiefer P, Dickson C, Mason I.** 2002. Fgf3 and Fgf8 are required together for formation of the otic placode and vesicle. *Development*; vol. 129 no. 9, lk. 2099-108.
- Martin P, Swanson GJ.** 1993. Descriptive and experimental analysis of the epithelial remodellings that control semicircular canal formation in the developing mouse inner ear. *Dev Biol*; vol. 159 no. 2, lk. 549-58.
- McKay IJ, Muchamore I, Krumlauf R, Maden M, Lumsden A, Lewis J.** 1994. The kreisler mouse: a hindbrain segmentation mutant that lacks two rhombomeres. *Development*; vol. 120 no. 8, lk. 2199-211.
- Merlo GR, Paleari L, Mantero S, Zerega B, Adamska M, Rinkwitz S, Bober E, Levi G.** 2002. The Dlx5 homeobox gene is essential for vestibular morphogenesis in the mouse embryo through a BMP4-mediated pathway. *Dev Biol*; vol. 248 no. 1, lk. 157-69.
- Moro-Balbas JA, Gato A, Alonso MI, Martin P, de la Mano A.** 2000. Basal lamina heparan sulphate proteoglycan is involved in otic placode invagination in chick embryos. *Anat Embryol (Berl)*; vol. 202 no. 4, lk. 333-43.
- Morsli H, Choo D, Ryan A, Johnson R, Wu DK.** 1998. Development of the mouse inner ear and origin of its sensory organs. *J Neurosci*; vol. 18 no. 9, lk. 3327-35.

Nardelli J, Thiesson D, Fujiwara Y, Tsai FY, Orkin SH. 1999. Expression and genetic interaction of transcription factors GATA-2 and GATA-3 during development of the mouse central nervous system. *Dev Biol*; vol. 210 no. 2, lk. 305-21.

Niederreither K, Vermot J, Schuhbaur B, Chambon P, Dolle P. 2000. Retinoic acid synthesis and hindbrain patterning in the mouse embryo. *Development*; vol. 127 no. 1, lk. 75-85.

Noramly S, Grainger RM. 2002. Determination of the embryonic inner ear. *J Neurobiol*; vol. 53 no. 2, lk. 100-28.

Ornitz DM, Itoh N. 2001. Fibroblast growth factors. *Genome Biol.*; vol. 2 no. 3

Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, McEwen DG, MacArthur CA, Coulier F, Gao G, Goldfarb M. 1996. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem*; vol. 271 no. 25, lk. 15292-7.

Ozaki H, Nakamura K, Funahashi J, Ikeda K, Yamada G, Tokano H, Okamura HO, Kitamura K, Muto S, Kotaki H, Sudo K, Horai R, Iwakura Y, Kawakami K. 2004. Six1 controls patterning of the mouse otic vesicle. *Development*; vol. 131 no. 3, lk. 551-62.

Pandolfi PP, Roth ME, Karis A, Leonard MW, Dzierzak E, Grosveld FG, Engel JD, Lindenbaum MH. 1995. Targeted disruption of the GATA3 gene causes severe abnormalities in the nervous system and in fetal liver haematopoiesis. *Nat Genet*; vol. 11 no. 1, lk. 40-4.

Pata I, Studer M, van Doorninck JH, Briscoe J, Kuuse S, Engel JD, Grosveld F, Karis A. 1999. The transcription factor GATA3 is a downstream effector of Hoxb1 specification in rhombomere 4. *Development*; vol. 126 no. 23, lk. 5523-31.

Patient RK, McGhee JD. 2002. The GATA family (vertebrates and invertebrates). *Curr Opin Genet Dev*; vol.12 no. 4, lk. 416-22.

Pauley S, Wright TJ, Pirvola U, Ornitz D, Beisel K, Fritsch B. 2003. Expression and function of FGF10 in mammalian inner ear development. *Dev Dyn*; vol. 227 no. 2, lk. 203-15.

Phillips BT, Bolding K, Riley BB. 2001. Zebrafish fgf3 and fgf8 encode redundant functions required for otic placode induction. *Dev Biol*; vol. 235 no. 2, lk. 351-65.

Phippard D, Lu L, Lee D, Saunders JC, Crenshaw EB 3rd. 1999. Targeted mutagenesis of the POU-domain gene *Brn4/Pou3f4* causes developmental defects in the inner ear. *J Neurosci*; vol. 19 no. 14, lk. 5980-9.

Pirvola U, Spencer-Dene B, Xing-Qun L, Kettunen P, Thesleff I, Fritzschn B, Dickson C, Ylikoski J. 2000. FGF/FGFR-2(IIIb) signaling is essential for inner ear morphogenesis. *J Neurosci*; vol. 20 no. 16, lk. 6125-34.

Riley BB, Phillips BT. 2003. Ringing in the new ear: resolution of cell interactions in otic development. *Dev Biol*; vol. 261 no. 2, lk. 289-312.

Rinkwitz S, Bober E, Baker R. 2001. Development of the vertebrate inner ear. *Ann N Y Acad Sci*; vol. 942, lk. 1-14.

Rivolta MN, Holley MC. 1998. GATA3 is downregulated during hair cell differentiation in the mouse cochlea. *J Neurocytol*; vol. 27 no. 9, lk. 637-47.

Roehl H, Nüsslein-Volhard C. 2001. Zebrafish *pea3* and *erm* are general targets of FGF8 signaling. *Curr Biol*; vol. 11 no. 7, lk. 503-7.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. Molecular cloning. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.

Streit A. 2004. Early development of the cranial sensory nervous system: from a common field to individual placodes. *Dev Biol*; vol. 276 no. 1, lk. 1-15.

Ting CN, Olson MC, Barton KP, Leiden JM. 1996. Transcription factor GATA-3 is required for development of the T-cell lineage. *Nature*; vol. 384 no. 6608, lk. 474-8.

Torres M, Giraldez F. 1998. The development of the vertebrate inner ear. *Mech Dev*; vol. 71 no. (1-2), lk 5-21.

Torres M, Gomez-Pardo E, Gruss P. 1996. Pax2 contributes to inner ear patterning and optic nerve trajectory. *Development*; vol. 122 no. 11, lk 3381-91.

van der Wees J, van Looij MA, de Ruiter MM, Elias H, van der Burg H, Liem SS, Kurek D, Engel JD, Karis A, van Zanten BG, de Zeeuw CI, Grosveld FG, van Doorninck JH. 2004. Hearing loss following *Gata3* haploinsufficiency is caused by cochlear disorder. *Neurobiol Dis*; vol. 16 no. 1, lk. 169-78.

Van Esch H, Groenen P, Nesbit MA, Schuffenhauer S, Lichtner P, Vanderlinden G, Harding B, Beetz R, Bilous RW, Holdaway I, Shaw NJ, Fryns JP, Van de Ven W, Thakker RV, Devriendt K. 2000. GATA3 haplo-insufficiency causes human HDR syndrome. *Nature*; vol. 406 no. 6794, lk. 419-22.

Wang W, Van De Water T, Lufkin T. 1998. Inner ear and maternal reproductive defects in mice lacking the Hmx3 homeobox gene. *Development*; vol. 125 no. 4, lk. 621-34.

Visconti RP, Hilfer SR. 2002. Perturbation of extracellular matrix prevents association of the otic primordium with the posterior rhombencephalon and inhibits subsequent invagination. *Dev Dyn*; vol. 223 no. 1, lk. 48-58.

Wright TJ, Mansour SL. 2003. Fgf3 and Fgf10 are required for mouse otic placode induction. *Development*; vol. 130 no. 15, lk 3379-90.

Wu DK, Nunes FD, Choo D. 1998. Axial specification for sensory organs versus non-sensory structures of the chicken inner ear. *Development*; vol. 125 no. 1, lk. 11-20.