

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND

ARSTITEADUSKOND

BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT

FÜSIOLOOGIA OSAKOND

JANE NARVIK

IgLONite ekspressioon ja kompensatoorsed mehhanismid

Magistritöö (30 EAP)

Juhendajad: PhD Jürgen Innos

MSc Taavi Vanaveski

PhD Tambet Tõnissoo

Tartu 2015

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS.....	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1.1. Frontaalkoor.....	6
1.2. IgLON valkude perekond.....	8
1.2.1. IgLON valkude interaktsioonid	9
1.3. LSAMP	10
1.4. NTM	11
2. EKSPERIMENTAALOSA	13
2.1 Töö eesmärgid	13
2.2. Materjalid ja meetodid	14
2.2.1. Katseloomad	14
2.2.2. Käitumiskatsed	14
2.2.3. Tõstetud plusspuur.....	15
2.2.4. Liikumisaktiivsuse test	15
2.2.5. Hele-tume puur	15
2.2.6. Morrise vesilabürindi katse	16
2.2.7. RNA eraldamine.....	16
2.2.8. cDNA süntees	17

2.2.9. Kvantitatiivne reaalaaja PCR (qRT-PCR)	17
2.2.10. Andmete statistiline analüüs	19
2.3. Tulemused	20
2.3.1. Liikumisaktiivsuse katse	20
2.3.2. Tõstetud plusspuur	21
2.3.3. Hele-tume puur	22
2.3.4. Morrise vesilabürint	22
2.3.5. IgLONite ekspressioonitase	23
2.3.6. <i>Lsamp</i> promootorite aktiivsus	24
2.3.7. <i>Ntm</i> promootorite aktiivsus	25
2.4. Arutelu	27
KOKKUVÕTE	31
SUMMARY	33
TÄNUSÕNAD	34
KASUTATUD KIRJANDUS	35
LIHTLITSENTS	43

KASUTATUD LÜHENDID

CEPU1 – kana neurotrimiini valgu ortoloog

GPI – glükosüül-fosfatidüül-inositol (*glycosyl-phosphatidyl-inositol*)

Hprt – hüpoksantiin-guaaniin fosforibosüültransferaasi kodeeriv geen (*hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*)

IgLON – immunoglobuliin LON (*immunoglobulin LON*)

IgSF – immunoglobuliini superperekond/ülemperikond (*immunoglobulin superfamily*)

Lsamp – hiire limbilise süsteemiga seotud membraanvalku kodeeriv geen

LSAMP – inimese limbilise süsteemiga seotud membraanvalku kodeeriv geen

LSAMP – limbilise süsteemiga seotud membraanvalk (*limbic system-associated membrane protein*)

Negr1/Kilon – hiire neuronaalset kasvufaktor 1 kodeeriv geen (*neuronal growth factor-1*)

NEGR1/KILON – neuronaalne kasvuregulaator 1 (*neuronal growth factor-1*)

Ntm – hiire neurotrimiini valku kodeeriv geen

NTM – neurotrimiini valk

Opcml – hiire opioide siduvat raku adhesioonimolekuli kodeeriv geen

OPCML – opioide siduv raku adhesioonimolekul (*opioid-binding cell adhesion molecule*)

SEM – keskväärtuse standardviga (*standard error of the mean*)

Syp – sünaptofüsiini geen (*synaptophysin*)

SISSEJUHATUS

Inimese närvisüsteemi kujuneb välja aastakümnete jooksul erinevate kemotaktiliste ja adhesiivsete kontaktide tulemusel. Viimane etapp närvisüsteemi arengus on frontaalkoore kujunemine. Frontaalkoorel on keskne roll intelligentsuse ja kognitiivsete võimete kujunemises ning käitumise kontrollis. Aju toimimisel on oluline neuronitevaheliste ühenduste moodustumine ehk sünaptoogenees. Sünaptilisi ühendusi aitavad muuhulgas moodustada ja stabiliseerida neuraalsed adhesioonimolekulid.

IgLON on neuraalsete adhesioonimolekulide perekond, mis osaleb neuriitide väljakasvust ja sünaptoogeneesis. Perekonna kahte liiget, LSAMP ja NTM, on varem seostatud nii ärevuse, intelligentsuse kui ka neuropsühhiaatriliste häiretega. Eelnevalt on leitud kõrgeenenud LSAMP valgu tase skisofreeniapatsientide frontaalkoores (Behan jt, 2009). Lisaks kuuluvad IgLON perekonda OPCML, NEGR1 ja IGLON5. IgLON perekonna liikmed moodustavad nii homokui ka heterofiilseid dimeere ehk digloneid. *Opcml*, *Lsamp* ja *Ntm* geenidel esineb kaks alternatiivset promootorit – 1a ja 1b. Alternatiivsete promootorite olemasolu võimaldab vastavalt organismi vajadusele paindlikku geeniekspressiooni regulatsiooni.

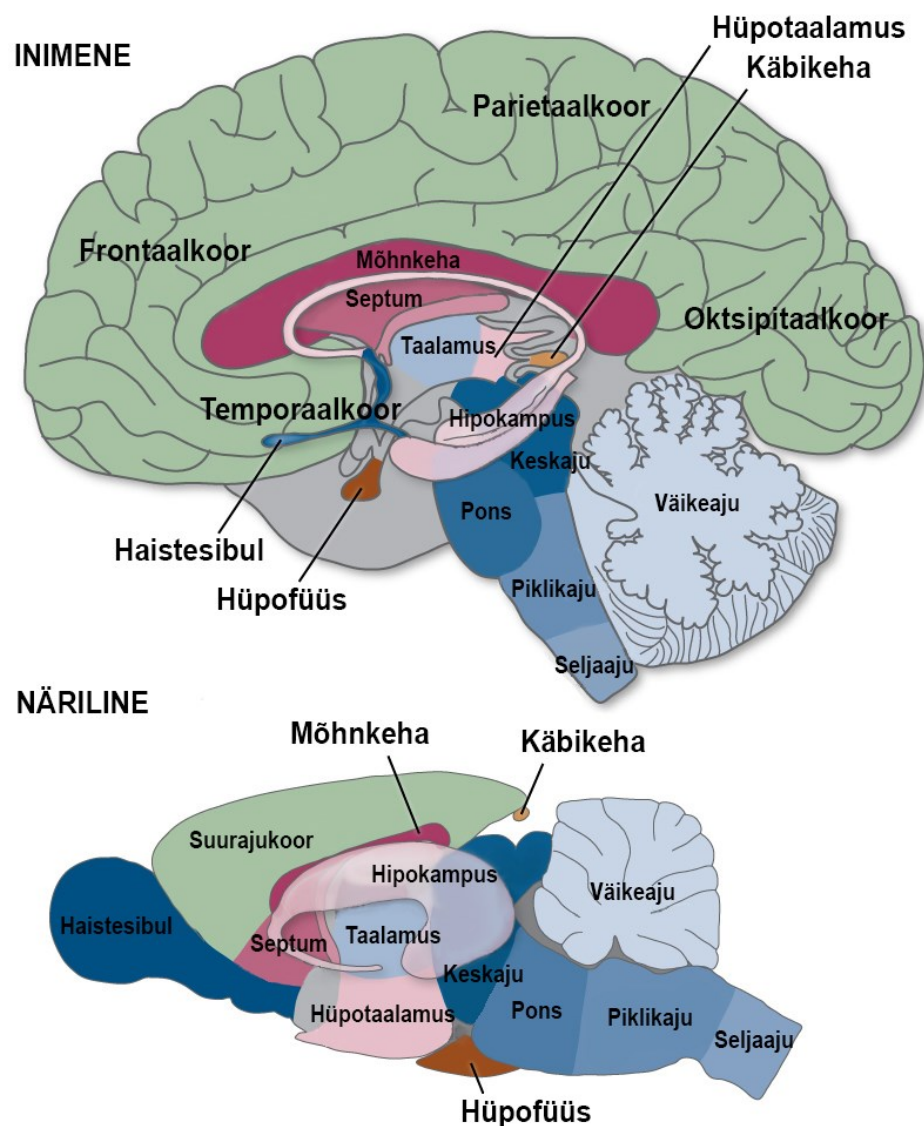
Käesoleva magistritöö eesmärk oli võrrelda metsiktüüpi, *Ntm*^(-/-), *Lsamp*^(-/-) ja *Lsamp/Ntm*^(-/-) genotüübiga hiiri, luues esmalt topeltmutante *Lsamp/Ntm*^(-/-) hiirelinn. Järgnevalt viisime hiirtega läbi käitumiskatsete patarei ning iseloomustasime IgLONite geeniekspressiooni frontaalkoores RT-PCRi vahendusel. Lisaks mõõtsime ühe sünaptoogeneesis osaleva markergeeni, sünaptofüsiini, ekspressioonitaset. Sünaptofüsiini seostatakse sarnaselt LSAMPile skisofreeniaga. Kuna kolme IgLONi – OPCML, NTM ja LSAMP – ekspressioon toimub kahelt alternatiivselt promootorilt, vaatlesime kokku 6 geeni ja 9 promootori aktiivsusi *Hprt* referentsgeeni suhtes.

Käesolev töö on koostatud Tartu Ülikooli Arstiteaduskonna Bio-ja siirdemeditiini instituudi füsioloogia osakonnas.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Frontaalkoor

Imetajate suurajukoor jaguneb frontaal-, temporaal-, parientaal- ja oksipitaalkooreks. Inimesel jaguneb frontaal- ehk otsmikukoor omakorda kolmeks piirkonnaks: prefrontaalne, premotoorne ja motoorne ala. Närilise kui inimese mudelorganismi otsmikukoor on lihtsama ehitusega ning ei ole selgelt diferentseerunud (joonis 1) (Uylings jt, 2003).



Joonis 1. Inimese ja närilise aju struktuuride võrdlus. Inimese joonis rõhutab frontaal-, parientaal-, temporaal- ja oksipitaalkoore asukohta. Näriliste frontaalkoor ei ole selgelt diferentseerunud, kuid lähima funktsiooniga struktuurid paiknevad suurajukoos kõige anteriorsemalt (kohandatud Uylings jt, 2003 järgi).

Katsed on näidanud, et närilised on frontaalkoore uurimiseks sobivad mudelorganismid (Brown ja Bowman, 2002). Nii inimese kui ka närilise frontaalkoor koosneb peamiselt hallainest, mille läbimõõt on inimesel umbes 3 mm ja hiirel ligikaudu 0,8 mm (Hofman, 1988; Schnack jt, 2015). Hallaines asuvad peamiselt püramidaalneuronite kehad ja dendriidid ning nende vahel interneuronid (Connors ja Cruikshank, 2007). Püramidaalneuronid on glutamaatergilised ja eksitatoorsed. Interneuronid on GABAergilised ja peamiselt inhibitoorsed. Püramidaal- ja interneuronid moodustavad koos närvivõrke, mis vastutavad kõrgemate kognitiivsete funktsioonide eest (Puig ja Gullledge 2011). Frontaalkoores esinevad püramidaalneuronid innerveerivad aksonite kaudu teisi ajuosi (Aertsen jt, 1991). Frontaalkoore enda aktiivsus põhineb keskaju dopaminergiliste neuronite eksitatorsetel impulssidel (Goldman-Rakic jt, 1992; Williams ja Goldman-Rakic, 1998).

Otsmikukoore piirkonnas toimub sissetuleva teabe organiseerimine, analüüsimine, integreerimine ja organismi eesmärkidest lähtuva otsuse vastu võtmine. Otsustusprotsessis hinnatakse varasemate kogemuste põhjal riske (Ridderinkhof jt, 2004) ning otsusest lähtuvalt saadavad frontaalkoore neuronid ülejäänud ajju signaale, kontrollides sel viisil käitumist, emotsioone, ihasid ja rahulduse edasilükkamist. Otsustusprotsesside käigus genereerib otsmikukoor stiimuli, mis vältab soovitud tulemuse saavutamiseni (Miller ja Cohen, 2001; Kable ja Glimcher, 2007) ning frontaalkoore vigastuse tagajärjel kahjustuvad õppimisvõime, mälu ja enesekontroll ning teised kognitiivsed funktsioonid (Godefroy, 2003; Kehagia jt, 2010). Kognitiivse taju häired on iseloomulikud psühhiaatrilistele häiretele nagu ärevushäired ja skisofreenia (Park ja Holzman, 1992; Elvevåg ja Goldberg, 2000).

Ärevushäired on rühm komplekshaigusi, mis erinevad ärevuse taseme ja sellega kaasneva hirmu poolest. Ühiseks põhisümptomiks on pidev muretsemine tuleviku pärast, mis vallandab põhjendamatu hirmutunde. Ärevushäirete progresseerumine viitab frontaalkoores tekkivatele talitlushäiretele (Milad jt, 2006). Otsmikukoores asub vähemalt kaks eraldiseisvat piirkonda, mis reageerivad vastavalt positiivsele või negatiivsele stiimulile. Ületalitlushäired nendes piirkondades võivad põhjustada regiooni kestvaid stimulatsiooni, mis vallandab pideva haigusliku emotsionaalse vastuse (Myers-Schulz ja Koenigs, 2012). Frontaalkoor innerveerib amügdalat ja tekitab põhjendamatu hirmutunde (LeDoux, 2000).

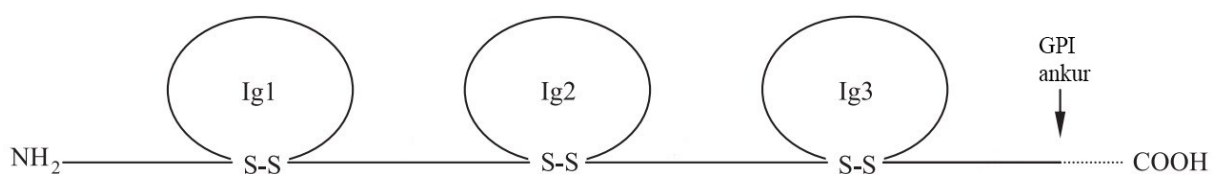
Skisofreeniale on iseloomulikud tõsised mõtlemis- ja tajuhäired, millega võib kaasneda tuimenenud või ebanormaalne tundeelu. Skisofreeniale omaste füsioloogiliste sümptomite puudumine muudab haiguse diagnoosimise keerukaks. Skisofreenia avaldumise üheks

põhjuseks võib olla glutamaadi NMDA (N-metüül-D-aspartaat) retseptorite alatalitus, mille tagajärjel GABA-ergiliste interneuronite inhibitoorne aktiivsus väheneb. Interneuronite funktsioneerimise languse tagajärjel neuronite aktsioonipotentsiaalide jada desünkroniseerub, vallandades keskajus suurenenud dopamiini produktsiooni (Schwartz jt, 2012). Dopamiini liigne kontsentratsioon võib viia rakusiseste signaaliradade häirumisele, mille tulemusel aktiveeruvad põletikulised protsessid ja langeb kognitiivne võimekus (Kahn ja Sommer, 2015).

Ärevuse ja skisofreenia all kannatavate inimeste kognitiivne käitumine on seotud frontaalkoore hallaine paksusega. Kliiniliste sümptomitega indiviididel on frontaalkoore hallaine õhem (Syal jt, 2012; Haijma jt, 2013) ning samasugune seos esineb ka ruumilise orienteerumise ja õppimisvõime häirumise korral (Brown jt, 2014; Ceccarelli jt, 2009). Paksem hallaine kiht seostub kõrgema intelligentsuse ja suurema kognitiivse võimekusega (Schnack jt, 2015).

1.2. IgLON valkude perekond

IgLON valgud on raku pinnal asetsevad adhesioonimolekulid, mis kinnituvad rakumembraanile glükosüül-fosfatitüül-inositol ankruka (GPI-ankur) (Struyk jt, 1995; Funatsu jt, 1999). IgLONitel esineb kolm Ig (immunoglobuliin) domeeni ja nad kuuluvad immunoglobuliinide superperekonda (IgSF – *immunoglobulin superfamily*) (joonis 2) (Pimenta jt, 1996).



Joonis 2. IgLON valkude konserveerunud struktuur. Joonisel on kolme immunoglobuliini domeeni ja GPI ankru asukoht IgLON valkude struktuuris (kohandatud Pimenta ja Levitt, 2004 järgi).

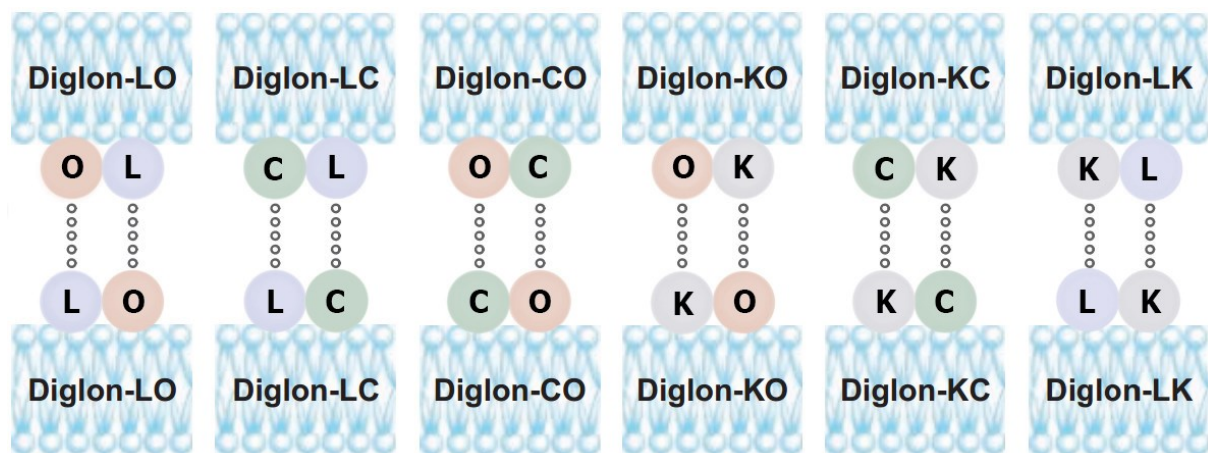
IgLON perekond sisaldab viit erinevat valku kodeerivat geeni. *Opcml* geen kodeerib opioide siduvat raku adhesioonimolekuli OPCML (OBCAM, IGLON1; *opioid binding protein/cell adhesion molecule*) (Schofield jt, 1989). *Ntm* geen kodeerib neurotrimiini nimelist valku (NTM, IGLON2; *neurotrimin*) (Struyk jt, 1995; Funatsu jt, 1999). LSAMP on limbilise süsteemiga assotsieeruv membraanvalk (LSAMP, IGLON3; *limbic system-associated*

membrane protein) (Pimenta jt, 1996). *Negr1* geen kodeerib NEGR1 valku (KILON, IGLON4; *neuronal growth regulator 1*) (Funatsu jt, 1999). IGLON5 on hiljuti avastatud perekonnaliige ja tema võimalik funktsioon on veel teadmata (Sabater jt, 2014).

IgLON perekonnaliikmed OPCML, NTM, LSAMP and NEGR1 reguleerivad neuriitide väljakasvu, osalevad sünaptogeneesis ja toimivad kui tuumor-supressorid (Struyk jt, 1995; Gil jt, 2002; Miyata jt, 2003; Sellar jt, 2003; Hashimoto jt, 2009; Barøy jt, 2014). Vähenenud OPCMLi geeniekspressiooni on seostatud munasarja vähi ning ajukasvajatega (Sellar jt, 2003; Reed jt, 2007). OPCML ja NTM valgujärjestused kattuvad umbes 70% ulatuses. NTM reguleerib aksonite fastsikulatsiooni ja assotsieerub intelligentsusega (Chen jt, 2001; Pan jt, 2011). *Post mortem* uuringud skisofreeniahaigete frontaalkoores näitasid LSAMP valgu ligikaudu 20% tõusu (Behan jt, 2009). *NEGR1* geeni ekspressioon seostub ülekaalulisusega (Elks jt, 2012). IgLON5 on seostatud autoimmuunsete antikehade tekke ja neurodegeneratiivse häire kujunemisega (Sabater jt, 2014; Leypold jt, 2015).

1.2.1. IgLON valkude interaktsioonid

Paljud raku adhesioonimolekulid moodustavad rakumembraanil funktsionaalseid komplekse (Castellani jt, 2000). Ka GPI-ankruga IgLONid moodustavad raku lipiidparvedel homo- ja heterofiilseid dimeere (Simons ja Toomre, 2000; Reed jt, 2004).



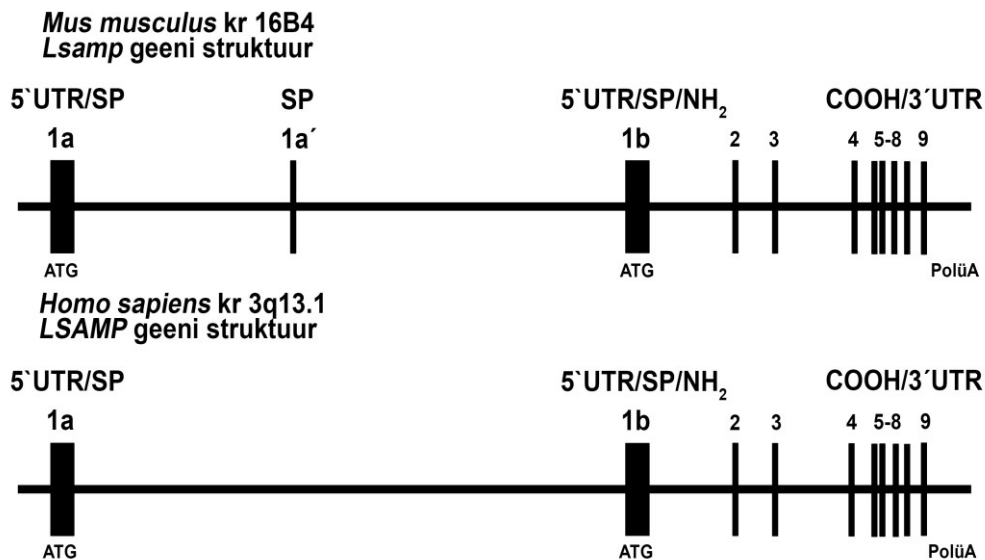
Joonis 3. Võimalikud IgLONite dimeerid ehk diglonid. O-OPCML, L-LSAMP, C-CEPU1/NTM, K-KILON/NEGR1. Kaks IgLONit moodustavad homo- või heterofiilse digloni. Näiteks moodustub diglon-KO NEGR1 ja OPCML dimeriseerumisel (Reed jt, 2004).

Kõik IgLON perekonna valgud interakteeruvad omavahel ja moodustavad dimeere. Kaks homo- või heterofiilset IgLONit moodustavad dimeerse molekulaarse struktuuri – digloni (Lodge jt, 2000). Dimeeride moodustumine on hierarhiline ja sõltub vastavate IgLONite afiinsusest teineteise suhtes. Üldiselt on homofiilsed interaktsioonid nõrgemad kui heterofiilsed. Reed ja kolleegid vaatlesid lähemalt kolme IgLON-perekonna valgu (OPCML, CEPU1 ja LSAMP) homo- ja heterofiilseid interaktsioone kana mudelis. Uuringus selgus, et IgLONite homofiilsete dimeeride moodustamisel sama raku membraanil on suurim afiinsus kana NTM ortoloogil CEPU1-l, keskmine OPCMLil ja madalaim LSAMPil. Hierarhiliselt moodustab LSAMP alati eelistatult heterodimeeri kas OPCMLi või CEPU1ga. Lisaks LSAMPile moodustavad ka OPCML ja CEPU1 omavahel stabiilseid heterodimeere, kuid hierarhiliselt on nende afiinsus madalam kui LSAMP heterodimeeridel (joonis 3) (Reed jt, 2004).

1.3. LSAMP

LSAMP on limbilise süsteemiga seotud adhesioonimolekul, mille kodeerimine toimub *Lsamp* geenilt. *LSAMP* geeni järjestus on tugevalt konserveerunud, inimese ja roti geenijärjestuse sarnasus on ligikaudu 94% (Pimenta jt, 1996). *Lsamp* geen sisaldab hiirel 11 eksonit, kuid katab genoomis tavapäratult suure ala – 2,2 Mbp. Hiire *Lsamp* geenis esineb kaks esimest intronit, mis katavad 1,6 Mbp. Nende vahele jääb lühike ekson 1a', mis osaleb signaalpeptiidi kodeerimisel. Mõlemale esimesele eksonile 1a ja 1b eelnevad aktiivsed promootorid (joonis 4) (Pimenta ja Levitt, 2004). Promootorite aktiivsused on piirkonniti erinevad, nimelt on temporaalkoores, hipokampuses ja amügdalas aktiivsem 1a promootor. *Lsamp* geeni 1b promootor on aktiivne kesknärvisüsteemi sensoorsetes radades. Sensoorsed rajad koosnevad visuaalsest, auditoorsest ning somatosensoorsest juhteteest, mida mööda liigub teave taalamusse ja edasi ajukoorde (Gutman jt, 2013; Philips jt, 2015).

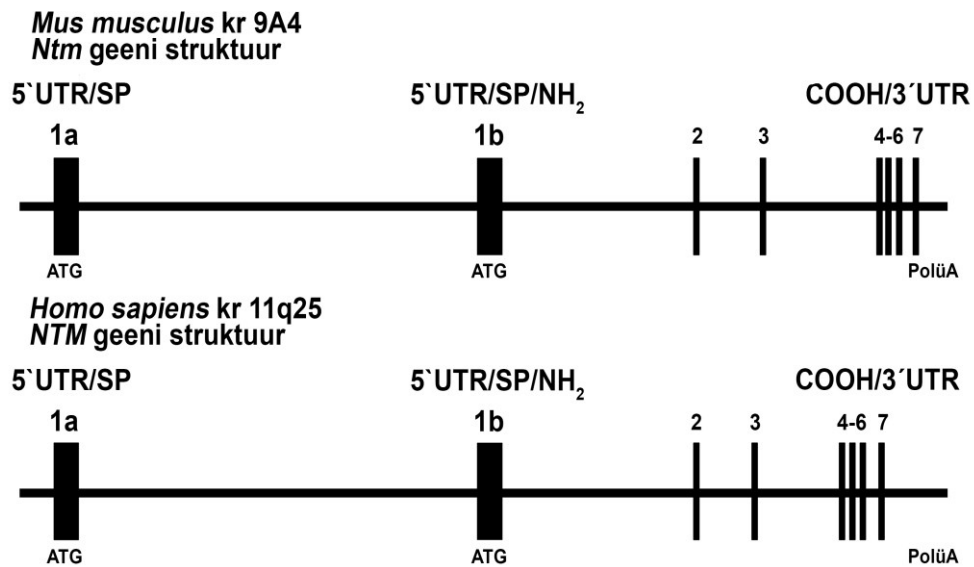
Hiire mudelis tehtud katsed viitavad *Lsamp* geeni tähtsusele emotsionaalse ja sotsiaalse käitumise kujunemisel (Philips jt, 2015). *Lsamp*^(-/-) hiirtel esineb kerge hüperaktiivsus uudes keskkonnas, alanenud ärevus, madalam agressiivsus, vähenenud dominantsus ja vähenenud ujumiskiirus (Innos jt, 2011). Inimesel on seostatud LSAMP valgu ülekspressiooni prefrontaalkoores skisofreeniaga (Behan jt, 2009). Ka polümorfisme *LSAMP* geenis on seostatud meeste enesetapu, depressiooni, bipolaarse häire ja skisofreeniaga (Must jt, 2008; Koido jt, 2012; Koido jt, 2014).



Joonis 4. Hiire ja inimese *Lsamp* geeni struktuur. Rõhutatud on esimest eksonit (1a) ja alternatiivset esimest eksonit (1b). Hiirel esineb ka 1a' ekson, mis osaleb signaalpeptiidi (SP) kodeerimisel (kohandatud Pimenta ja Levitt, 2004 järgi).

1.4. NTM

Ntm geen kodeerib samanimelist valku, mis osaleb sünaptoogeneesis. *Ntm* on liikidevaheliselt konserveerunud, inimese ja hiire DNA järjestus kattub 97% ulatuses. Ekspressioonimuster sarnaneb LSAMP valgule, mille süntees toimub enamjaolt ajukoore ja limbilise süsteemi neuronitel (Pimenta jt, 1995; Zhukareva ja Levitt, 1995). Neurotrimiini geenis esineb kaheksa eksonit ja kaks alternatiivset promootorit – 1a ja 1b – sarnaselt *Opcml* geenile (Joonis 5). NTM ja OPCML on valgujärjestuselt kõige sarnasemad, kattudes umbes 70% ulatuses, ja paiknevad genoomis lähestikku. Mõlema geeni pikkus on ligikaudu 1 Mbp. Lisaks esineb sarnane ekson-intron struktuur (Pimenta jt, 1996; Funatsu jt, 1999). Mõlemad IgLONid moodustavad teineteisega heterofiilseid dimeere, kuid eelistavad dimeeri partnerina LSAMPi. NTM moodustab heterofiilsetele kontaktidele lisaks ka keskmise afiinsusega homodimeere (Reed jt, 2004). *Ntm* geeni on seostatud aksonite fastsikulatsiooni ja sünaptoogeneesiga (Chen jt, 2001).



Joonis 5. Hiire ja inimese *Ntm* geeni struktuur. Rõhutatud on esimest eksonit (1a) ja alternatiivset esimest eksonit (1b). Välja on toodud signaalpeptiidi (SP) erinevad kodeerimise võimalused (kohandatud Struyk jt, 1995 järgi).

Inimesel on leitud seos ka *Ntm* geeni ja intelligentsuse vahel (Pan jt, 2011). Inimese 11. kromosoomi q25 piirkonda, kus asuvad nii *Ntm* kui ka *Opcml* geen, on seostatud kognitiivsete häirete, näiteks depressiooni, ärevushäire, skisofreenia, hüperaktiivsuse ja autismi, kujunemisega. Samas ei ole siiani teada, kui suur roll on *Ntm* ja *Opcml* geeniekspressiooni häirumisel nende haiguste kujunemises (Blacker jt, 2003; Ogdie jt, 2003; Vorstman jt, 2006; Schol-Gelok jt, 2010). Võrreldes *Lsamp*^(-/-) hiirtega esineb *Ntm*^(-/-) hiirte fenotüübis vähem kõrvalekaldeid. *Ntm*^(-/-) hiired on normaalse kehakaalu, välimuse, liikumisaktiivsuse ja ärevusega; ainsa fenotüübilise muutusena oleme tuvastanud õppimisvõime languse aktiivse vältimise katses (meie labori avaldamata andmed).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

1. *Lsamp/Ntm*^(-/-) topeltnutantse hiiremudeli loomine
2. Kirjeldada metsiktüüpi, *Lsamp*^(-/-), *Ntm*^(-/-) ja *Lsamp/Ntm*^(-/-) hiirte käitumuslikku fenotüüpi käitumiskatsetes
3. Kirjeldada metsiktüüpi, *Lsamp*^(-/-), *Ntm*^(-/-) ja *Lsamp/Ntm*^(-/-) promootorite ekspressiooni aktiivsust frontaalkoores
4. Hinnata võimalikke kompensatoorseid efekte *Lsamp*^(-/-), *Ntm*^(-/-) ja *Lsamp/Ntm*^(-/-) hiirtes käitumise ja geeniekspressiooni tasandil

2.2. Materjalid ja meetodid

2.2.1. Katseloomad

Käesolevas töös kasutatud topeltmutant katseloomad saadi Tartu Ülikooli Bio- ja siirdemeditiini instituudi füsioloogia osakonnas loodud *Lsmp*^(-/-) hiireliini (Innos jt, 2011) ja sisseostetud *Ntm*^(-/-) hiireliini (Lexicon Pharmaceuticals, USA) ristamisel. Mõlemad hiireliinid loodi homoloogilise rekombinatsiooni teel. Esmalt ristati omavahel *Lsmp*^(-/-) ja *Ntm*^(-/-) mutandid. Sünninud F1 põlvkonnas olid kõik hiired topelt-heterosügootid. Teises etapis paaritati topelt-heterosügootide üksteisega, mille tulemusel sündisid kõikvõimalike genotüübikombinatsioonidega järglased (nt *Lsmp*^(+/-)/*Ntm*^(-/-) jne), kellest valiti edasiseks paaritamiseks välja metsiktüüpi, *Lsmp*^(-/-), *Ntm*^(-/-) ja *Lsmp/Ntm*^(-/-) emased ja isased hiired. Katsetes kasutatud F3 põlvkonna saamisel ristati iga saadud sama genotüübiga F2 hiiri omavahel (nt IINN×IINN). Käitumiskatsetes ja qRT-PCR analüüsis kasutati samu isaseid hiiri, kes olid katsete ajal vanuses 2,5–4 kuud. Hiire aju prepareerimine toimus hiire aju atlase alusel (Franklin ja Paxinos, 1997). Katseloomad surmati tservikaalse dislokatsiooni läbi vastava koolituse läbinud spetsialisti poolt. Järgnevalt eemaldati pea keha küljest ning aju koljust. Eemaldatud aju prepareeriti jääl treenitud eksperdi poolt. Eraldatud frontaalkoore struktuur ja organid külmutati koheselt vedelas lämmastikus ning säilitati temperatuuril -80 °C.

Loomad elasid standardsetes loomapuurides (42,5 × 26,6 × 15,5 cm), 8±1 looma puuris, temperatuuril 22±1 °C 12 h/12 h valguse-pimeduse režiimil (tuled kustusid kl 19:00). Vesi ning toit olid hiirtele vabalt kättesaadavad. Puurides kasutati haavapuidust allapanu (2 cm kiht) ja haavapuidust pesamaterjali (0,5 l), mille vahetus toimus iganädalaselt. Kõikide eksperimentide korraldamiseks oli Eesti Vabariigi põllumajandusministeeriumi Loomkatseprojekti loakomisjoni luba (28. aprill 2014, nr 29).

2.2.2. Käitumiskatsed

Käitumiskatsed teostati kl 10.00 kuni 19.00. Temperatuur loomaruumis oli vahemikus 20±2 °C. Hiired viidi katseruumi üks tund enne katset, et nad kohaneksid katseruumi oludega.

2.2.3. Tõstetud plusspuur

Plusspuur on laialt levinud ning lihtne meetod, mida kasutatakse näriliste ärevuskäitumise hindamiseks. Katse põhineb sisemise hirmu ja avastamisudishimu konfliktil (Walf ja Frye, 2007). Tõstetud plusspuur on plussikujuline platvorm, mis koosnes kahest avatud (ilma külge- ja lõpuseinteta) 17,5 x 5 cm õlast ja kahest eelmistega ristuvast samade mõõtmetega suletud õlast (14 cm kõrgused külge- ja lõpuseinad). Plusspuuri keskel oli 5 x 5 cm platvorm. Plusspuur oli maast tõstetud 30 cm kõrgusele. Valgustugevus ruumis oli eksperimendi ajal 15 luksit. Katse alustamiseks asetati loom platvormile, näoga suletud õla poole. Hiir loeti õlga sisenenuks vaid siis, kui kõik neli käppa olid vastaval õlal. Testi kestvuseks oli standardne viis minutit (Pellow jt 1985; Lister, 1987). Iga looma järel puhastati katseaparatuur 5% etanoolilahusega ja kuivatati. Mõõdeti järgnevaid parameetreid: (1) suletud õlgadele sisenemiste arv, (2) avatud õlgadele sisenemiste arv, (3) suletud õlalt üle ääre allavaatamiste arv, (4) avatud õlale sisenemise latents, (5) avatud õlal viibitud aeg, (6) püstumiste arv. Katsed filmiti ja tulemused skooriti video põhjal.

2.2.4. Liikumisaktiivsuse test

See katse on standardne meetod, mida kasutatakse motoorse käitumusliku fenotüübi hindamiseks (Paulus jt, 1999). Liikumisaktiivsuse hindamiseks kasutati spetsiaalset fotoelektrilist jälgimise süsteemi, mis oli ühendatud arvutiga (TSE, Technical & Scientific Equipment GmbH, Saksamaa). Hiired asetati läbipaistvatesse pleksiklaasist kastidesse (44 x 44 x 45 cm), milles infrapunased kiired moodustasid kahetasapinnalise võrgustiku. Kiirte katkemise järgi toimus katselooma asukoha määramine ajas ja ruumis. Liikumisaktiivsuse parameetrid registreeriti automaatselt spetsiaalse arvutiprogrammi abil. Kastide sisemuses oli valguse tugevuseks 400 luksit. Pärast iga testi, kui katseloom võeti kastist välja, puhastati kast hoolikalt 5% etanooli lahusega ning seejärel kuivatati. 30-minutilise jälgimisperioodi jooksul mõõdeti järgmised liikumisaktiivsust iseloomustavad parameetrid: 1) läbitud distants, (2) püstumised, (3) keskväljal viibitud aeg, (4) nurkade külastused.

2.2.5. Hele-tume puur

Testis kasutatakse ära hiirte loomulikku sisemist konflikti uudse keskkonna uudistamissoovi ja heledast valgusest tekkiva ebameeldivuse vahel (Crawley ja Goodwin, 1980). Hele-tume puur (TSE, Technical & Scientific Equipment GmbH, Saksamaa) on arvutiga ühendatud

pleksiklaasist kast, mis koosneb valgest ja pimedast kambrist, mis on eraldatud vaheseinaga. Vaheseinas on väike 5 x 5 cm avaus. Katse algul asetati loom pimedasse ossa ja mõõdeti arvutiprogrammiga 15 min vältel järgmisi parameetreid: (1) latents valgesse kambrisse sisenemisel, (2) valges kambris veedetud koguaeg, (3) kambritevahelise avause läbimiste arv. Pärast iga looma pesti kambrid 5% etanoolilahusega ja seejärel kuivatati.

2.2.6. Morrise vesilabürindi katse

Katse võimaldab hinnata näriliste mälu ja õppimisvõimekust (Morris, 1981). Seade koosneb hämaras toas (20 luksit) olevast ringikujulisest vesivannist (Ø 150 cm, sügavus 50 cm), puhkeplatvormist (Ø 16) ja videokaamerast koos vastava programmiga (TSE, Technical & Scientific Equipment GmbH, Saksamaa). Vann oli jaotatud neljaks sektoriks (kirre, kagu, edel, loe). Vesi (22 °C) muudeti läbipaistmatuks, lisades väheses koguses mittetoksilist kaltsiumkarbonaati. Puhkeplatvorm, mis paiknes 1 cm veepiirist allpool, asetati vanni edelasektorisse, 20 cm seinast. Iga hiirt treeniti platvormi leidma nelja päeva jooksul, iga päev neli korda (ujumistevaheline intervall umbes 1 h). Igal korral asetati loom juhuslikku sektorisse, näoga seina poole, ning lubati alust otsida maksimaalselt 60 s. Juhul kui loom platvormi 60 s jooksul ei leidnud, suunati ta sinna õrnalt metallsõelaga. Loomal lasti platvormil iga kord viibida umbes 10–15 s. Viimastel päevadel platvorm eemaldati ning igal hiirel lasti vannis 60 s vabalt ujuda (algus kirdest). Visuaalseteks orientiirideks olid seintele kinnitatud postid. Arvutiprogramm fikseeris: (1) platvormini jõudmise latentsi, (2) läbitud teekonna pikkuse, (3) ujumiskiiruse.

2.2.7. RNA eraldamine

Frontaalkoore rakuline RNA eraldati ajukoe homogeniseerimisel. Homogeniseerimisel kasutati Trizol® reagenti (Invitrogen) ning tootja juhiseid. Esimese etapina homogeniseeriti ajukude jääl 100 µl Trizoli® reagentis. Seejärel proovid uhmerdati ja lisati ülejäänud osa reagentist kuni soovitud 500 µl mahuni. Järgnevalt inkubeeriti toatemperatuuril 5 minutit ja lisati kloroformi 100 µl (Sigma-Aldrich) ning raputati tuube 15 sekundit. Inkubeeriti veel 2 minutit ja tsentrifuugiti eeljahutatud tsentrifuugis (Eppendorf 5810 R) 12 000 p/min 15 min 4 °C juures. RNA-d sisaldav vesifaas tõsteti ümber uude katsutisse ja lisati 250 µl isopropanooli (Naxo BioTop) RNA sadestamiseks. Proovid segati, inkubeeriti 10 minutit toatemperatuuril ja tsentrifuugiti 12 000 p/min 10 min 4 °C juures. Järgnevalt isopropanool eemaldati ning lisati 1 ml jääkülma 75% etanooli. Proovid tsentrifuugiti viimast korda 7500 p/min 10 min 4 °C

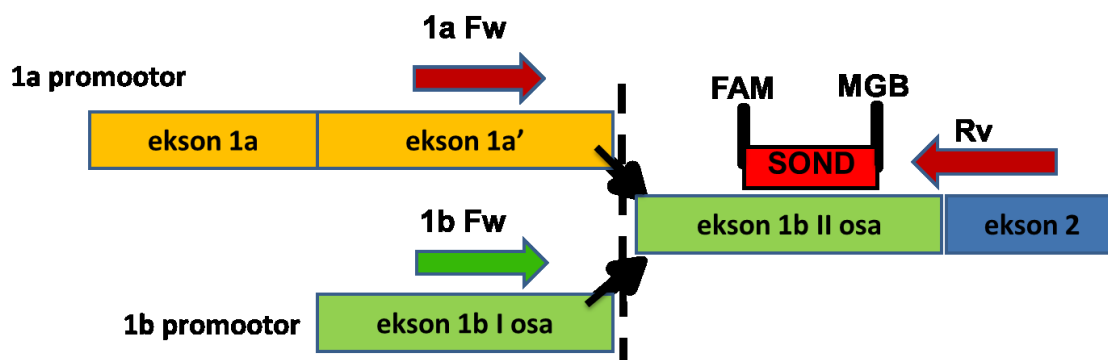
juures. Etanool eemaldati ja katsutisse lisati 30 µl vett ja suspendeeriti RNA sade ühtlaseks. Proovid segati vorteksil ning mõõdeti RNA kontsentratsioonid NanoDrop ND-1000 spektrofotomeetril (NanoDrop Technologies). Eraldatud RNA proovid säilitati -80°C juures.

2.2.8. cDNA süntees

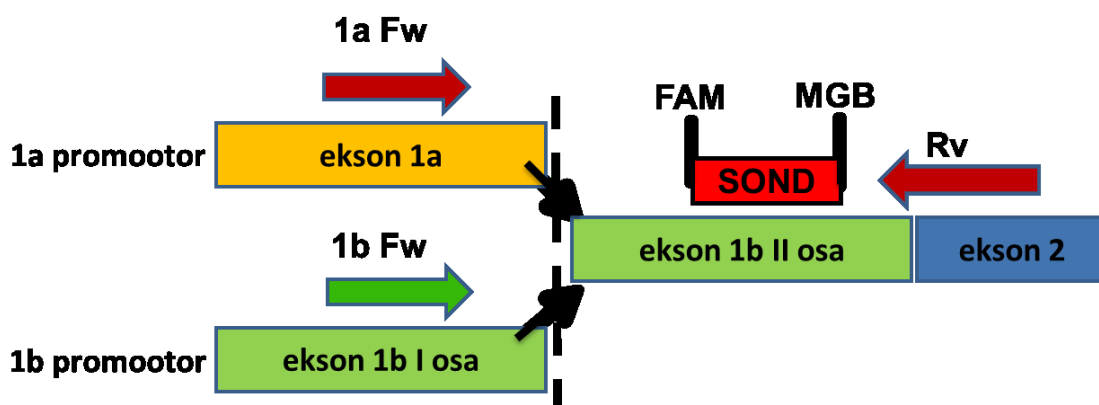
Eelnevalt saadud frontaalkoore RNast sünteesiti komplementaarne DNA. cDNA sünteesil kasutati SuperScriptTM III pöördtranskriptaasi (Invitrogen) ja heksameerseid oligonukleotiide vastavalt tootja juhendile. 20 µl reaktsiooni kohta võeti 2 µl (50 µg/ml) heksameerset praimerit (Applied Biosystems) ja 1 µl 10 mM dNTP segu (Fermentas). Praimerite seondumiseks inkubeeriti proove 5 min 70 °C juures. Järgnevalt tõsteti tuubid reaktsiooni peatamiseks vähemalt 1 minutiks jääle. cDNA sünteesiks lisati proovidele 4 µl 5X First-Strand Buffer [250 mM Tris-HCl (pH 8,3 toatemperatuuril), 375 mM KCl, 15 mM MgCl], 1 µl 0,1 M DTT, 1,5 µl H₂O ja 0,5 µl SuperScriptTM III pöördtranskriptaasi (200 U/µl). Sünteesi toimumiseks inkubeeriti proove 60 min 50 °C juures. Seejärel peatati reaktsioon, hoides katsuteid 15 min 70 °C juures. Saadud cDNA proovid säilitati -80 °C juures.

2.2.9. Kvantitatiivne reaalaaja PCR (qRT-PCR)

Praimerid selekteeriti Primer3Plus vabavaralise tarkvara vahendusel. Sobivad praimerid valiti välja amplikonide spetsiifilisuse alusel geelelektroforeesi vahendusel. Järgnevalt testiti valitud praimereid qRT-PCR reaktsioonis. Referentsgeenina kasutati *Hprt*, mille efektiivsus ja stabiilsus on eelnevalt tõestatud (Raud jt, 2009). *Hprt* koduhoidja praimerid valiti eelnevalt läbiviidud katsete põhjal. *Opcml*, *Lsamp* ning *Ntm* eksonite 1a ja 1b korral kasutati universaalset sondi ja universaalset *reverse* praimerit. Hiire *Lsamp* 1a *forward* praimer asub 1a eksoni asemel 1a' eksonil (joonis 6). *Opcml* ja *Ntm* geeni korral asuvad 1a *forward* praimerid 1a eksonil ja 1b *forward* praimerid 1b eksoni tagumisel osal (joonis 7). *Negr1*, *Iglon5* ja *Syp* korral asetsevad 1a *forward* praimerid ainsal esimesel eksonil ja *reverse* praimer samalaadselt *Opcml*, *Lsamp* ning *Ntmi* geenile teisel eksonil.



Joonis 6. Hiire *Lsamp* forward ja reverse praimerite asetus cDNA kvantitatiivse reaallaja-PCRi reaktsiooni jaoks. Hiire 1a forward ja 1b forward ning universaalse reverse praimerite asetus tagab vastavalt 124 ja 125 aluspaarise amplokoni tekke.



Joonis 7. Hiire *Opcml*, *Ntm* forward ja reverse praimerite asetus cDNA kvantitatiivse reaallaja-PCRi reaktsiooni jaoks. Hiire 1a forward ja 1b forward ning universaalse reverse praimerite asetus tagab vastavalt 135 ja 140 aluspaarise amplokoni tekke.

Transkriptide tase kvantiteeriti qRT-PCR-i reaktsioonis. Kõik reaktsioonid sooritati eraldi nelja üksiku kordusena (*singleplex*). Vaadeldi metsiktüüpi, *Lsamp*^(-/-), *Ntm*^(-/-) ja *Lsamp/Ntm*^(-/-) genotüüpide mõju teiste IgLON perekonna geenide ekspressioonimustrile ja *Syp* ekspressioonile. Geeniekspressiooni läbiviimisel kasutati järgnevat segu: 10X PCR Buffer [200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl] ja TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA) reagenti. Kvantitatiivne reaallaja-PCR viidi läbi ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, USA) ja ABI Prism 7900 SDS 2.4.2 tarkvara vahendusel. Reaktsiooni maht oli 10 µl ja igast proovist villiti neli kordust, arvestades *Opcml*, *Ntm* ja *Lsamp* puhul ka kahe (1a ja 1b) promootori esinemist. Nii *Opcml*, *Ntm*, *Lsamp*, *Negr1*, *Igln5* ja *Syp* transkriptide ekspressioonitase mõõdeti FAM-märgistatud MGB-sondiga ja standardiseeriti koduhoidja geeni *Hprt* VIC-TAMRA sondi

suhtes. Andmed analüüsiti ja teisendati $2^{-\Delta CT}$ kujule (Livak ja Schmittgen, 2001).

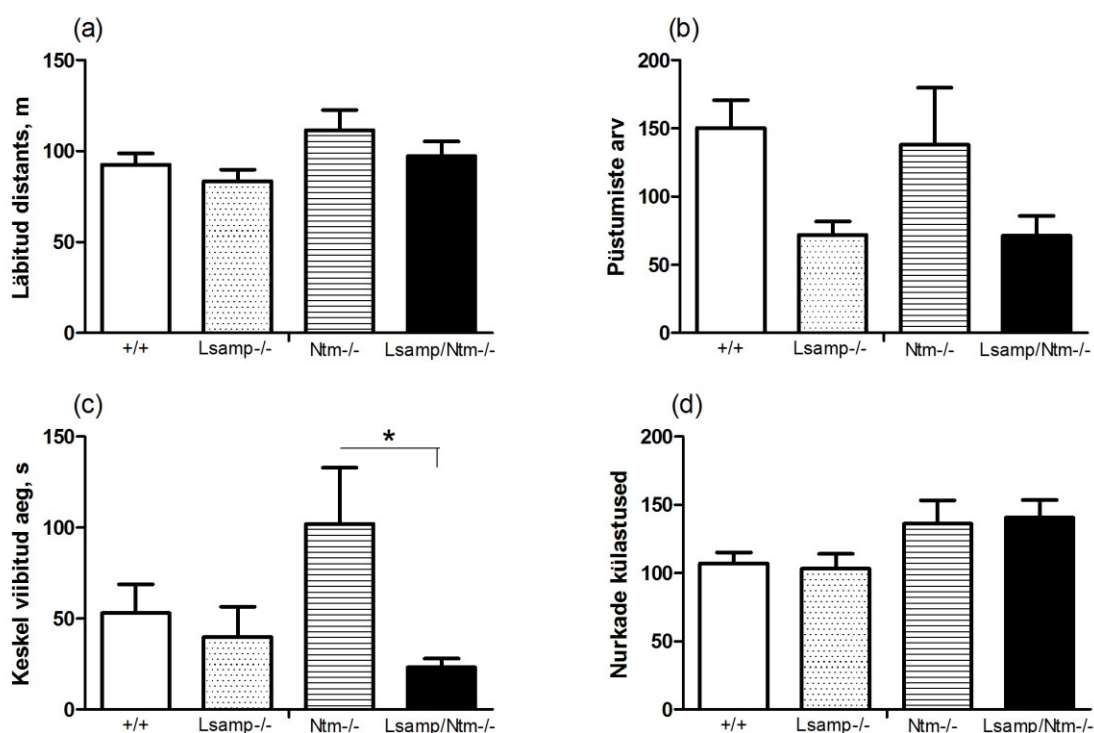
2.2.10. Andmete statistiline analüüs

Reaalaja-PCRi andmete ning käitumiskatsete (välja arvatud Morrise vesilabürint) statistiline analüüs viidi läbi ühefaktorilise dispersioonanalüüsi (*one-way ANOVA*) abil Statistica 12 programmiga (Statsoft, USA). Morrise vesilabürinti katses kasutati korduvmõõtmistega dispersioonanalüüsi (*repeated measures ANOVA*). Reaalaja-PCRi korral kasutati Tukey *post hoc* testi ja käitumiskatsetes Tukey *unequal N HSD post hoc* testi. Tulemused väljendati keskmiste väärtustena koos keskvaertuse standardveaga (*standard error of the mean*, SEM). Oluliseks loeti p-väärtus alla 0,05. Graafikud loodi GraphPad Prism 5 tarkvara vahendusel (GraphPad Software Inc, USA). Pilte töödeldi Adobe Photoshop CS6 vahendusel (Adobe Systems Software Ireland Ltd, USA).

2.3. Tulemused

2.3.1. Liikumisaktiivsuse katse

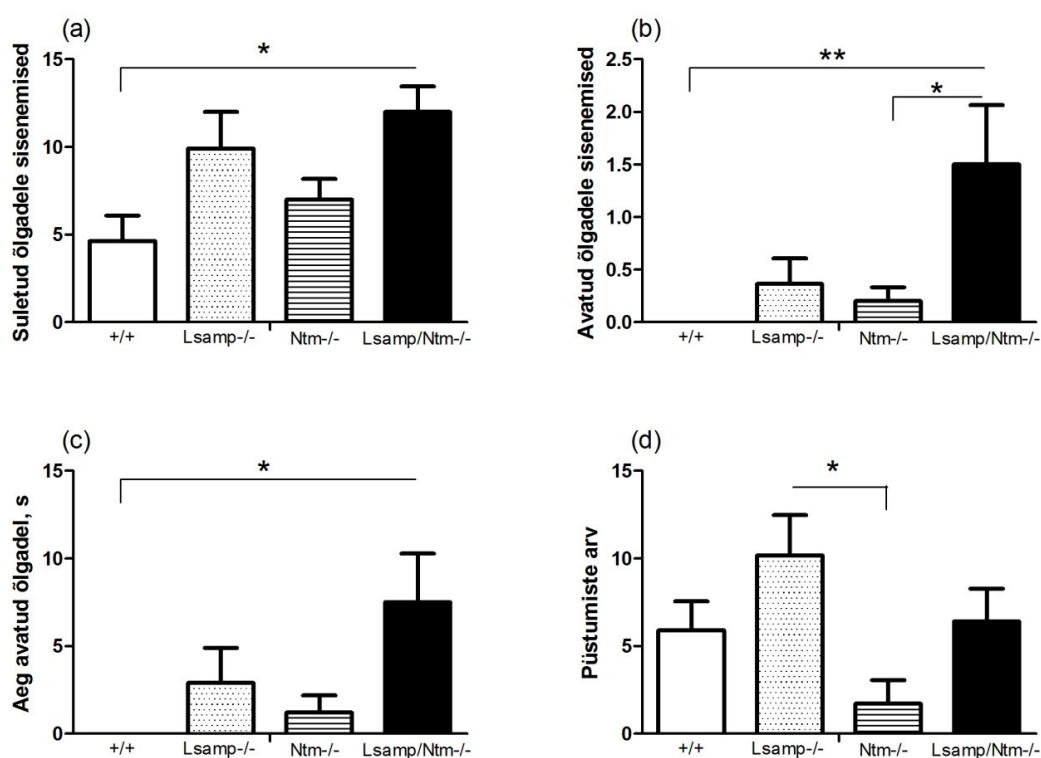
Läbitud distantssi osas genotüübiekti ei ilmnenud ($F_{(3, 41)}=2,1$, $p=0,12$) (joonis 8a). Püstumiste osas ilmnes genotüübiekt ($F_{(3, 41)}=3,2$, $p=0,032$), kuid *post hoc* test gruppide vahel olulisi erinevusi ei tuvastanud (joonis 8b). Ärevuskäitumist peegeldava keskel viibitud aja osas ilmnes genotüübiekt ($F_{(3, 41)}=2,88$, $p=0,047$) ning *post hoc* test näitas, et $Ntm^{(-/-)}$ ja $Lsamp/Ntm^{(-/-)}$ grupid erinevad statistiliselt oluliselt ($p=0,039$) (joonis 8c). Nurkade külastuste osas genotüübiekti ei ilmnenud ($F_{(3, 41)}=2,52$, $p=0,071$) (joonis 8d).



Joonis 8. 30 min liikumisaktiivsuse katse. a) läbitud distantss, b) püstumiste arv, c) areeni keskosas viibitud aeg, d) nurkade külastused. N=10–14 igas genotüübigrupis.

2.3.2. Tõstetud plusspuur

Suletud õlgadele sisenemiste arvu osas ilmnes genotüübiefekt ($F_{(3, 38)}=4,05$, $p=0,014$) ning *post hoc* test näitas, et metsiktüüpi hiired erinevad topeltmutantidest oluliselt ($p=0,016$) (joonis 9a). Avatud õlgadele sisenemiste osas ilmnes tugev genotüübiefekt ($F_{(3, 38)}=4,79$, $p=0,006$) ning *post hoc* test näitas, et topeltmutandid erinevad statistiliselt oluliselt nii metsiktüüpi hiirtest ($p=0,008$) kui ka *Ntm* geeni mutantidest ($p=0,026$) ning peaaegu oluliselt ka *Lsamp* geeni mutantidest ($p=0,06$) (joonis 9b). Suletud õlalt üle ääre allavaatamiste osas ilmnes genotüübiefekt ($F_{(3, 38)}=2,9$, $p=0,047$), kuid *post hoc* võrdlused ei olnud statistiliselt olulised (wt $5,6\pm0,9$; *Lsamp*^(-/-) $5,5\pm1,1$; *Ntm*^(-/-) $6,6\pm1,4$; *Lsamp/Ntm*^(-/-) $10,6\pm2$). Avatud õlal viibitud aja osas erinesid genotüübid oluliselt ($F_{(3, 38)}=3,45$, $p=0,026$) ning *post hoc* test näitas olulist erinevust metsiktüüpi hiirte ja topeltmutantide vahel ($p=0,026$) (joonis 9c). Avatud õlale sisenemise latentsi osas jäi genotüübiefekt napilt ebaoluliseks ($F_{(3, 38)}=2,83$, $p=0,051$) (wt 300 ± 0 s; *Lsamp*^(-/-) $268,1\pm23,6$ s; *Ntm*^(-/-) $262,2\pm28,1$ s; *Lsamp/Ntm*^(-/-) $188,2\pm44,4$ s). Püstumiste osas ilmnes genotüübiefekt ($F_{(3, 38)}=3,5$, $p=0,024$) ning *post hoc* test näitas, et *Lsamp*^(-/-) hiired erinevad *Ntm*^(-/-) grupist oluliselt ($p=0,026$) (joonis 9d).



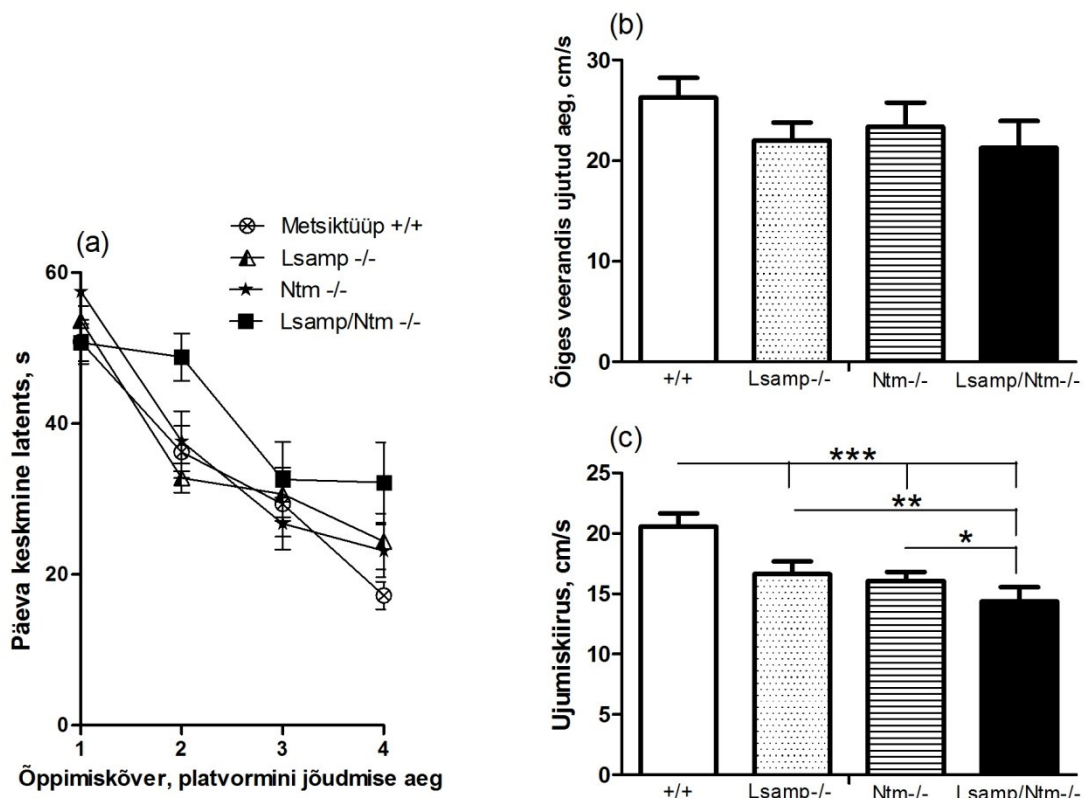
Joonis 9. Tõstetud plusspuuri katse. a) suletud õlgadele sisenemiste arv, b) avatud õlgadele sisenemiste arv, c) aeg avatud õlgadel, d) püstumiste arv. N=10–14 igas genotüübigrupis. ** $p<0,01$; * $p<0,05$.

2.3.3. Hele-tume puur

Genotüübiefekti ei ilmnenud ei valgesse kambrisse sisenemiste arvu ($F_{(3, 38)}=0,92$, $p=0,45$; wt $11\pm1,3$; $Lsamp^{(-/-)}$ $15,2\pm6,6$; $Ntm^{(-/-)}$ $14,3\pm7,2$; $Lsamp/Ntm^{(-/-)}$ $19,6\pm3,7$) ega valges kambris viibitud aja osas ($F_{(3, 38)}=0,31$, $p=0,82$; wt $152,8\pm23,9$ s; $Lsamp^{(-/-)}$ $133,5\pm57,5$ s; $Ntm^{(-/-)}$ $203,3\pm102,7$ s; $Lsamp/Ntm^{(-/-)}$ $147,3\pm27,1$ s).

2.3.4. Morrise vesilabürint

Õppimiskõvera osas ilmnes peaaegu oluline genotüübiefekt ($F_{(3, 38)}=2,67$, $p=0,061$), väga oluline päevaefekt ($F_{(3,114)}=62,6$, $p=0,0000$) ja peaaegu oluline genotüüp $\times$ päeva efekt ($F_{(9, 114)}=1,91$, $p=0,058$) (joonis 10a). Kui aga võtta õppimiskõvera aluseks distantis platvormini, mis ujumiskiiruste erinevuse tõttu on käesolevas katses objektiivsem õppimisvõime näitaja, muutuvad kõigi genotüüpide õppimisgraafikud sarnasteks ja erinevused genotüüpide vahel statistiliselt ebaolulisteks (esitamata andmed). Erinevuste puudumine õppimisvõimes näitas 5. päeval läbi viidud ilma platvormita kontrollkatses, et genotüübiefekti ei ilmnenud ($F_{(3, 38)}=0,87$, $p=0,47$; joonis 10b). Väga tugev genotüübiefekt ilmnes ujumiskiiruse osas (1. ja 5. päeva keskmine) ($F_{(3, 38)}=24,2$, $p=0,00000$). *Post hoc* test kinnitas, et kõik genotüübigrupid, välja arvatud $Ntm^{(-/-)}$ vs $Lsamp^{(-/-)}$, erinevad üksteisest statistiliselt oluliselt (joonis 10c).

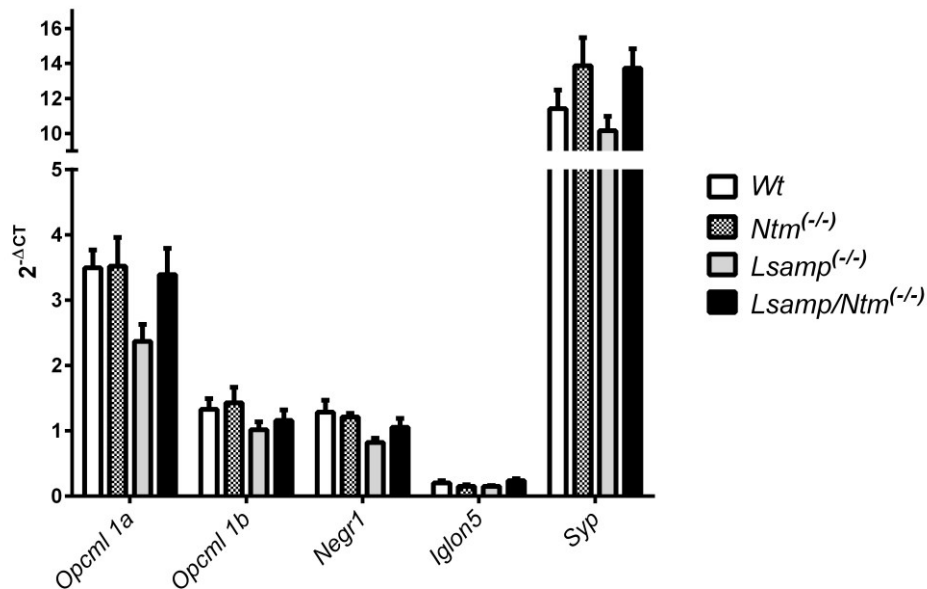


Joonis 10. Morris vesilabüridi katse. a) õppimisköver, b) õiges veerandis ujutud aeg 5. päeval, c) ujumiskiirus. N=10–14 igas genotüübigrupis. *** p<0,001; ** p<0,01; * p<0,05.

2.3.5. IgLONite ekspressioonitase

Reaalaja-PCRi vahendusel analüüsiti IgLONite ekspressiooni isaste hiirte frontaalkoores. Tulemused on välja toodud joonistel 11, 12 ja 13 $2^{-\Delta CT}$ kujul koos keskvärtuse standardveaga. Joonisel 11 on IgLONite *Opcml* 1a ja 1b, *Negr1*, *Iglon5* ning sünaptoogeneesi markergeeni *Syp* vastavate genotüüpide ekspressioonitase. *Opcml* 1a promootori ekspressiooniaktiivsus on metsiktüübi grupis $3,497 \pm 0,272$; *Ntm*^(-/-) grupis $3,519 \pm 0,440$; *Lsamp*^(-/-) grupis $2,371 \pm 0,261$; *Ntm/Lsamp*^(-/-) grupis $3,392 \pm 0,402$. *Opcml* 1b promootori ekspressiooniaktiivsus on metsiktüübi grupis $1,330 \pm 0,162$; *Ntm*^(-/-) grupis $1,430 \pm 0,238$; *Lsamp*^(-/-) grupis $1,016 \pm 0,121$; *Ntm/Lsamp*^(-/-) grupis $1,159 \pm 0,160$. *Negr1* promootori ekspressiooniaktiivsus on metsiktüübi grupis $1,285 \pm 0,187$; *Ntm*^(-/-) grupis $1,213 \pm 0,055$; *Lsamp*^(-/-) grupis $0,822 \pm 0,065$; *Ntm/Lsamp*^(-/-) grupis $1,056 \pm 0,132$. *Iglon5* promootori ekspressiooniaktiivsus on metsiktüübi grupis $0,201 \pm 0,035$; *Ntm*^(-/-) grupis $0,148 \pm 0,027$; *Lsamp*^(-/-) grupis $0,148 \pm 0,015$; *Ntm/Lsamp*^(-/-) grupis $0,238 \pm 0,030$. Sünaptofüsiini promootori

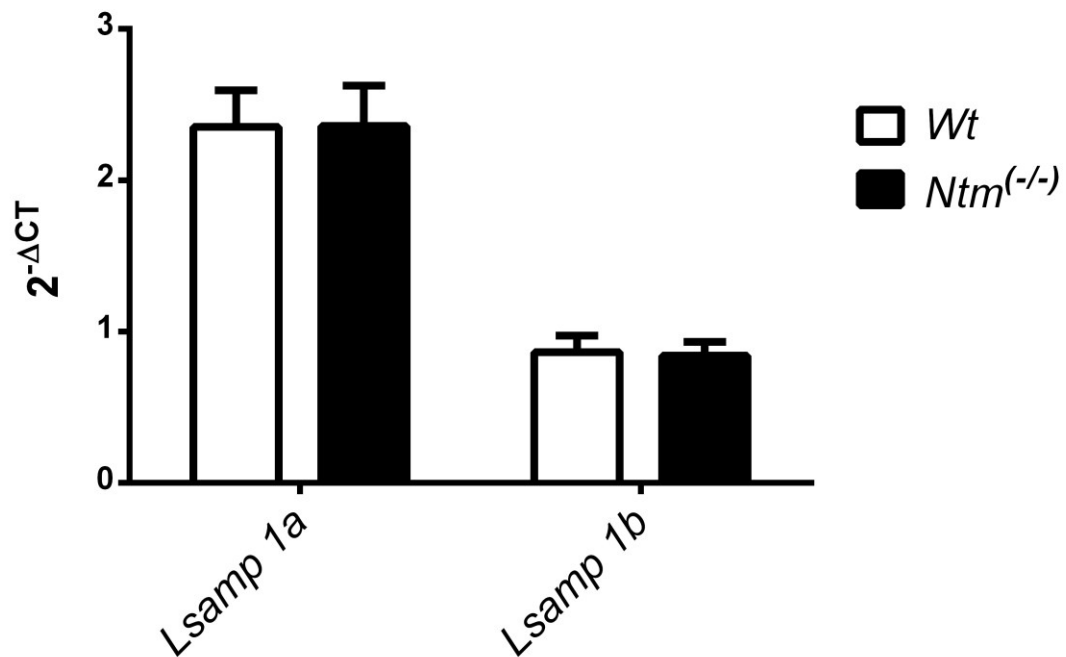
ekspressiooniaktiivsus on metsiktüübi grupis $11,424 \pm 1,057$; *Ntm*^(-/-) grupis $13,874 \pm 1,591$; *Lsamp*^(-/-) grupis $10,162 \pm 0,813$; *Ntm/Lsamp*^(-/-) grupis $13,735 \pm 1,098$. *Opcml* 1a ($F_{(3, 20)}=2,445$; $p=0,094$), *Opcml* 1b ($F_{(3, 20)}=1,084$; $p=0,378$), *Negr1* ($F_{(3, 20)}=2,8088$; $p=0,066$), *Iglon5* ($F_{(3, 20)}=2,5021$; $p=0,088$) ja *Syp* ($F_{(3, 20)}=2,3859$; $p=0,099$) korral ei ilmnenud statistiliselt olulist genotüübi efekti.



Joonis 11. IgLONite ja *Syp* ekspressioonitase isaste hiirte frontaalkoores. IgLONite *Opcml* 1a ja 1b, *Negr1*, *Iglon5* ning *Syp* võrdlev ekspressioonitase on välja toodud vaadeldud genotüüpide ja vastavate promootorite järgi (N=6 igas genotüübigrupis). Ekspressioonitasemed on esitatud $2^{-\Delta CT}$ kujul koos keskvärtuse standardveaga.

2.3.6. *Lsamp* promootorite aktiivsus

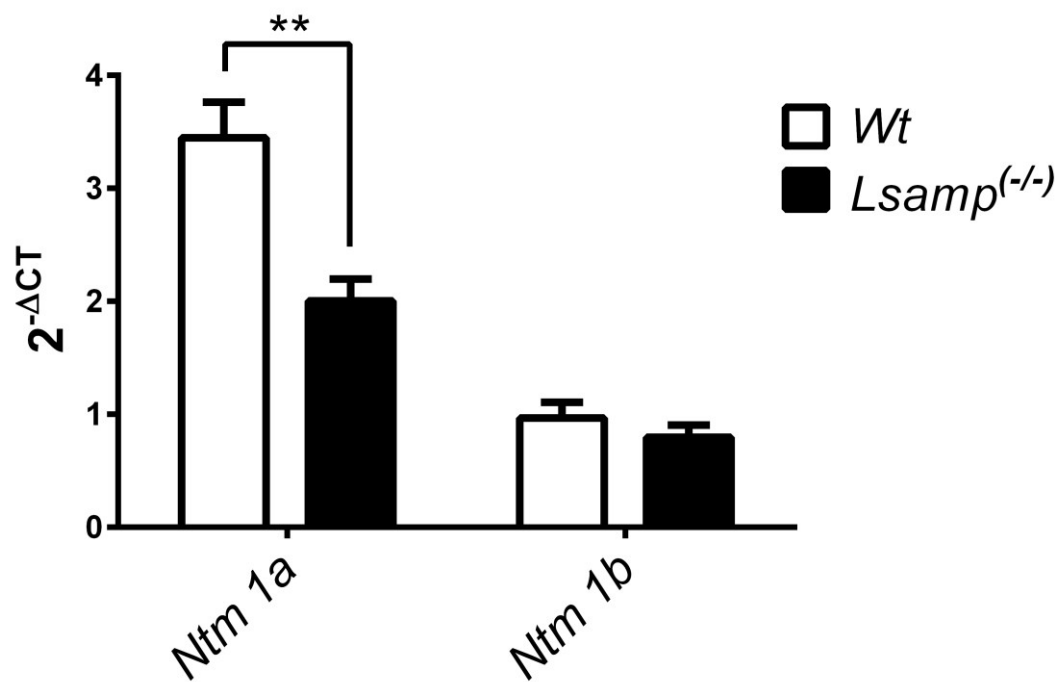
Joonisel 12 on *Lsamp* promootorite 1a ja 1b ekspressioonitasemete võrdlus metsiktüübi ning *Ntm*^(-/-) genotüübi grupis. *Lsamp* 1a promootori ekspressiooniaktiivsus on metsiktüübi grupis $2,352 \pm 0,242$ ja *Ntm*^(-/-) grupis $2,357 \pm 0,267$. *Lsamp* 1b promootori ekspressiooniaktiivsus on metsiktüübi grupis $0,865 \pm 0,108$ ja *Ntm*^(-/-) grupis $0,841 \pm 0,091$. *Lsamp* promootorite 1a ($F_{(1, 10)}=0,0002$; $p=0,989$) ja 1b ($F_{(1, 10)}=0,029$; $p=0,869$) ekspressiooniaktiivsus ei omanud statistiliselt olulist erinevust metsiktüübi ja *Ntm*^(-/-) grupi võrdluses.



Joonis 12. *Lsamp* promootorite 1a ja 1b ekspressiooniaktiivsus metsiktüüpi ja $Ntm^{(-/-)}$ genotüüpi grupis. Ekspressioonitase on esitatud $2^{-\Delta CT}$ kujul koos keskväärtuse standardveaga (N=6 igas genotüübigrupis).

2.3.7. *Ntm* promootorite aktiivsus

Joonisel 13 on *Ntm* promootorite 1a ja 1b ekspressioonitasemete võrdlus metsiktüüpi ning $Lsamp^{(-/-)}$ genotüüpi grupis. *Ntm* 1a promootori ekspressiooniaktiivsus on metsiktüüpi grupis $3,448 \pm 0,314$ ja $Lsamp^{(-/-)}$ grupis $2,006 \pm 0,193$. *Ntm* 1b promootori ekspressiooniaktiivsus on metsiktüüpi grupis $0,967 \pm 0,138$ ja $Lsamp^{(-/-)}$ grupis $0,796 \pm 0,108$. *Lsamp* 1b ($F_{(1, 10)}=0,949$; $p=0,353$) promootori aktiivsuse erinevus ei ole statistiliselt oluline metsiktüüpi ja $Lsamp^{(-/-)}$ genotüüpi võrdluses. *Lsamp* 1b promootori korral ilmnes statistiliselt oluline erinevus ($F_{(1, 10)}=15,348$; $p=0,003$). *Post hoc* test kinnitab statistiliselt olulise erinevuse esinemist metsiktüüpi ja $Lsamp^{(-/-)}$ genotüüpi 1a promootori ekspressiooniaktiivsuses ($p=0,003$).



Joonis 13. *Ntm* promootorite 1a ja 1b ekspressiooniaktiivsus metsiktüübi ja *Lsamp*^(-/-) genotüübi grupis. Ekspressioonitase on esitatud 2^{-ΔCT} kujul koos keskväärtuse standardveaga (N=6 igas genotüübigrupis). ** p=0,003.

2.4. Arutelu

Käesoleva magistritöö eesmärk oli luua olemasolevate *Lsamp*^(-/-) ja *Ntm*^(-/-) hiireliinide ristamise teel *Lsamp/Ntm*^(-/-) topeltmutantne hiireliin. Töö käigus iseloomustati *Lsamp/Ntm*^(-/-), *Lsamp*^(-/-) ja *Ntm*^(-/-) hiirte ning nende metsiktüüpi pesakonnakaaslaste fenotüüpi, viies läbi käitumiskatsed ja mõõtes kõigi IgLON perekonna geenide ekspressioonitaset. Geeniekspressiooni andmete võrdluses vaadeldi, kuidas ühe (*Lsamp* või *Ntm*) või kahe (*Lsamp* ja *Ntm*) IgLONi geeni puudulikkus mõjutab ülejäänud IgLONite ekspressioonitaset.

Lsamp ja *Ntm* geeni samaaegne väljalülitamine ei mõjunud hiirtele letaalselt, ei mõjutanud oluliselt nende kehakaalu ja ei kutsunud esile silmnähtavaid fenotüübilisi muutusi. Käitumusliku fenotüübi täpsemaks iseloomustamiseks testiti hiiri neljas erinevas käitumiskatses. Kuna eesmärk oli karakteriseerida IgLONite ekspressiooni frontaalkoores, otsustati hiirte aju biokeemia mõjutamise vältimiseks piirduda nelja üldiseloomustava käitumiskatsega ja mitte kasutada farmakoloogilist sekkumist.

Käitumiskatsed näitasid, et ühe (*Lsamp* või *Ntm*) või mõlema geeni samaaegne väljalülitamine ei muuda üldiselt hiirte käitumist liikumisaktiivsuse ja hele-tume puuri katses. Erines ainult ärevuse tase, mida peegeldab liikumisaktiivsuse katses keskel viibitud aeg, kus *Lsamp/Ntm*^(-/-) hiired olid *Ntm*^(-/-) hiirtega võrreldes vähem ärevad. Seda leidu toetab ka plusspuuri katse, kus *Lsamp/Ntm*^(-/-) hiired oli metsiktüüpi ja *Ntm*^(-/-) hiirtest oluliselt vähem ärevad. Nendest katsetest võib järeldada, et *Lsamp* ja *Ntm* geeni samaaegne väljalülitamine võimendab tunduvalt üksikmutantide anksiolüütilist fenotüüpi.

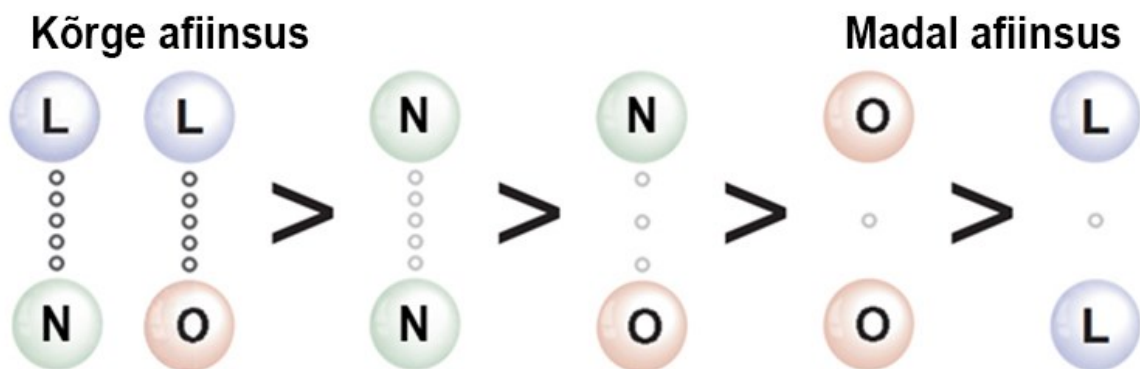
Tähelepanu väärib ka püstumiste arv liikumisaktiivsuse katses, mis peegeldab uudistamisaktiivsust valges (stressirohkes keskkonnas). *Lsamp*^(-/-) hiirte ja *Lsamp/Ntm*^(-/-) hiirte uudistamisaktiivsus oli metsiktüüpi hiirte ja *Ntm*^(-/-) hiirte uudistamisaktiivsusest poole väiksem. Suurtest arvulistest erinevustest hoolimata käesolevas katses statistilisi erinevusi ei ilmnenud, kuid et varasemates katsetes oleme tuvastanud metsiktüüpi ja *Lsamp*^(-/-) hiirte vahel uudistamisaktiivsust peegeldava püstumiste arvu osas samasuunalise statistiliselt olulise erinevuse (Innos jt, 2011), tuleks katset korrata suuremate gruppidega. Tulemused viitavad võimalusele, et uudistamisaktiivsuse vähenemine tuleneb ainult *Lsamp* geeni väljalülitamisest ja *Ntm* täiendav väljalülitamine seda efekti ei võimenda. Metsiktüüpi ja *Lsamp*^(-/-) hiired said püstumiste arvu osas liikumisaktiivsuse katses ja plusspuuri katses vastupidise tulemuse, kuid

tuleb arvestada, et liikumisaktiivsuse katse viiakse läbi valguses (400 lx) ehk näriliste jaoks stressirohkes ja plusspuuri katse hämaras (15 lx) ehk stressivaeses keskkonnas.

Morrise vesilabürindi katse näitas, et ei *Lsamp* geeni, *Ntm* geeni ega ka mõlema geeni üheaegne väljalülitamine ei halvenda hiirte õppimisvõimet, kuid vähendab väga oluliselt nende ujumiskiirust. *Lsamp*^(-/-) ja *Ntm*^(-/-) hiirte ujumiskiirus oli metsiktüüpi hiirte omast oluliselt väiksem ning mõlema geeni väljalülitamine võimendas seda fenotüüpi veelgi. Tulemus langeb hästi kokku meie varasemate leidudega (Innos jt, 2011; avaldamata andmed). Nimelt oleme näidanud, et *Lsamp*^(-/-) ja *Ntm*^(-/-) hiired õpivad Morrise katses normaalselt, kuid ujuvad aeglasemalt. Vähenenud ujumiskiiruse põhjuseks võib olla vähenenud lihastoonus, vähenenud motivatsioon ümbrust uurida või nende mõlema kombinatsioon. Ühes varasemas katses *Lsamp*^(-/-) hiirtega leidsime, et motivatsiooni peegeldavad käitumise parameetrid (toidu leidmise motivatsioon, uudistamismotivatsioon) ei korreleeru ujumiskiirusega (meie labori avaldamata andmed). Seega, tuleks edaspidi põhjalikumalt uurida IgLON perekonna valkude suhtes mutantsete hiirte lihastoonust.

IgLON perekonna geenide ekspressioonitaset mõõdeti frontaalkoores kõigi viie geeni ja kaheksa promootori korral. Lisaks vaadeldi ühe sünaptoogeneesiga seotud geeni – sünaptofüsiini – ekspressioonitaset. Kokku iseloomustati üheksa promootori aktiivsust metsiktüüpi, *Lsamp*^(-/-), *Ntm*^(-/-) ja *Lsamp/Ntm*^(-/-) hiirtes *Hprt* referentsgeeni suhtes.

IgLON perekonna ekspressioonimustris domineerib selgelt *Opcml1*, *Ntmi* ja *Lsami* 1a promootorite aktiivsus. Järgneb *Negr1* ja *Opcml1*, *Ntmi* ja *Lsami* 1b promootorite aktiivsus. Samas on IgLONite ekspressioon kordades madalam kui sünaptofüsiini geenil. *Syp* on geen, mis osaleb sünapsite moodustamisel ja stabiliseerimisel (Tarsa ja Goda, 2002). Skisofreeniahaigetel patsientidel on täheldatud langenud SYP ekspressiooni taset (Vawter jt, 1999). LSAMP valgu korral on näidatud skisofreeniahaigete frontaalkoores 20% kõrgemat ekspressioonitaset (Behan jt, 2009). Töö käigus soovisime detekteerida ka IgLONite ekspressiooni võimalikku mõju sünaptofüsiini geeni tasemele. Me ei tuvastanud statistiliselt olulist efekti sünaptofüsiini ekspressioonile üheski geenipuudulikus genotüübis.



Joonis 14. IgLONite dimeriseerumine afiinsuse alusel. LSAMP moodustab kõige afiinsemaid heterodimeere NTMi ja OPCMLiga. Neile järgneb NTM homodimeer. Nõrgim interaktsioon ilmneb NTMi ja OPCMLi vahel. OPCML ja LSAMP homodimeeride moodustumine on vähetõenäoline (kohandatud Reed jt, 2004 järgi).

Töö käigus tuvastasime *Lsamp*^(-/-) ja *Ntm*^(-/-) ja *Lsamp/Ntm*^(-/-) geeniekspressiooni andmetes ühe statistiliselt väga olulise erinevuse. *Lsamp*^(-/-) hiirte ekspressioonimustris alaneb *Ntm* 1a promootori aktiivsus 42% (joonis 13). *Ntm*^(-/-) hiires ei näinud me *Lsamp*i ega ka teiste IgLONite geeniekspressiooni muutusi. *Ntm* geenipuudulikus põhjustab kergeid kõrvalekaldeid käitumises, kuid need efektid ei kandu geeniekspressiooni tasandil üle ülejäänud IgLONitele.

IgLONid moodustavad eri afiinsusega homo- ja heterofiilseid dimeere, mis jaotuvad hierarhiliselt. Hierarhia eesotsas paiknevad OPCMLi, NTMi ja LSAMPi heterodimeerid. LSAMP moodustab peamiselt heterodimeere. LSAMP homodimeerid asuvad afiinselt hierarhia tagumises osas. Ka OPCML ja NTM moodustavad suurema afiinsusega heterodimeere, kuid vähemalt NTM korral on näidatud kõrge afiinsusega homodimeeride moodustumist (joonis 14). *Ntm*^(-/-) hiireliini käitumusliku fenotüübi eripära võib tuleneda NTM homodimeeride puudumisest.

Lsamp geeni puudulikkusel avaldub tugev efekt *Ntm* 1a promootori ekspressioonile. Huvitav on, et efekt avaldub peamiselt 1a, kuid mitte 1b promootori korral. *Lsamp* puudulikkusel võib välja tuua võimaliku trendi ka *Negr1* geeniekspressiooni vähenemise suunas. Käesolevas töös ei osutunud siiski *Lsamp* geenipuudulikkuse mõju *Negr1* või teiste 1a promootorite ekspressioonile statistiliselt oluliseks. *Lsamp* geenipuuduliku hiireliini selgem fenotüüp *Ntm* geenipuuduliku fenotüübi suhtes võib tuleneda heterofiilsete interaktsioonide puudumisest.

Käesolev töö näitas, et IgLON perekonna kahe liikme (Lsamp ja Ntm) samaaegne väljalülitamine ei ole hiirtele letaalne ega põhjusta käitumuslikus fenotüübis drastilisi muutusi. Kaks fenotüübilist muutust – ujumiskiiruse ja ärevuse vähenemine – olid topeltmutandi genotüübis üksikmutantide suhtes võimendunud. Lsamp moodustab kõrge afiinsusega heterofiilseid dimeere, mis domineerivad teiste homo- ja heterofiilsete perekonnasiseste interaktsioonide üle. Töös leidis kinnitust Lsamp keskne roll IgLON perekonna geenide avaldumises. Järgnevad uuringud peaksid valgustama, kuidas Lsamp mõjutab ülejäänud perekonnakaaslaste ekspressiooni. Kavas on uurida IgLONite geeniekspressiooni ka ülejäänud ajus.

KOKKUVÕTE

Käesoleva magistritöö eesmärk oli jätkata IgLON geeniperekonna uurimist. IgLON perekonda kuulub viis geeni, mis kõik kodeerivad neuriitide väljakasvu reguleerivaid adhesioonimolekule. Kahe liikme – *Lsamp* ja *Ntm* geeni – suhtes mutantsete hiireliinide põhjal loodi ristamise teel topeltmutantne *Lsamp/Ntm*^(-/-) hiiremudel. Topeltmutantseid *Lsamp/Ntm*^(-/-) hiiri ja nende metsik-tüüpi, *Ntm*^(-/-) ja *Lsamp*^(-/-) pesakonnakaaslasid testiti esmalt neljas erinevas käitumiskatses. Järgnevalt mõõdeti nende frontaalkoores kõigi IgLONite ekspressioonitaset. Eesmärk oli hinnata, kuidas mõjutab kahe geeni puudulikkus käitumist üksikmutantide suhtes ja tuvastada ühe või mitme IgLON perekonna liikme puudumisega kaasnevaid võimalikke kompensatoorseid mehhanisme (nt teiste liikmete ekspressioonitaseme tõus). Kuna eelnevalt avaldatud andmete põhjal oli teada *Lsamp* ja *Ntm* geeni võimalik osalus sünaptogeneesis, uurisime ka *Syp* geeni ekspressiooni. Inimesel on LSAMP valgu kõrgemat taset frontaalkoores seostatud skisofreeniaga ja seetõttu otsustasime esmalt keskenduda frontaalkoores uurimisele.

Liikumisaktiivsuse ja õppimisvõime osas genotüübid ei erinenud. Kahe geeni samaaegne väljalülitamine võimendas anksiolüütilist fenotüüpi ja vähendas veelgi ujumiskiirust üksikmutantide suhtes. Järgmisena hinnati IgLONite ekspressioonitaset käitumiskatses osalenud hiirte ajus. Frontaalkoores mõõdeti kõigi viie IgLONi ja sünaptofüsiini ekspressioonitaset ja üheksa promootori aktiivsust *Hprt* referentsgeeni suhtes. IgLON perekonnas olid kõige aktiivsemad *Opcml*, *Ntm* ja *Lsamp* 1a promootorid. Aktiivsusest järgnesid *Negr1* ja *Opcml*, *Ntm* ja *Lsamp* 1b promootorid. Geeniekspressiooni andmetest lähtuvalt võivad frontaalkoores moodustuda kõik võimalikud IgLONite dimeerid. Samuti selgus, et *Lsampi* ja *Ntmi* ekspressiooni puudumine ei mõjuta *Syp* geeni avaldumist.

Vaatlesime ka ülejäänud IgLONite ekspressiooni kolmes mutantses genotüübis: *Ntm*^(-/-), *Lsamp*^(-/-) ja *Lsamp/Ntm*^(-/-). *Lsamp*^(-/-) genotüübi korral esines statistiliselt oluline efekt – *Ntm* 1a promootori aktiivsus vähenes 42%. Teiste IgLONite korral kompensatoorseid efekte ei täheldatud.

Töö tulemustel selgus, et *Lsamp* ja *Ntm* geeni samaaegne puudulikkus ei ole letaalne, ega põhjusta drastilisi fenotüübi muutusi. Ilmnes kaks statistiliselt olulist fenotüübilist muutust – ujumiskiiruse ja ärevuse vähenemine, mis võimendusid topeltmutandi genotüübis.

Frontaalkoores langetas *Lsamp* geeni puudumine IgLONite geeniekspressiooni taset. IgLONite seas näib *Lsamp* etendavat perekonnakeskset rolli.

SUMMARY

IgLON family gene expression and compensatory mechanisms

The aim of this thesis was to continue the study of IgLON gene family. IgLON family consists of five genes that code cell adhesion molecules. IgLONs regulate the outgrowth of neurites. On the basis of two existent mutant mouse lines – *Lsamp*^(-/-) and *Ntm*^(-/-) – a double mutant *Lsamp/Ntm*^(-/-) mouse model was created by crossing single mutant lines. *Lsamp/Ntm*^(-/-) mice and their wild-type, *Ntm*^(-/-) and *Lsamp*^(-/-) littermates were tested first in four different behavioural experiments. Subsequently expression levels of all IgLONs were measured in the frontal cortex of the same mice. The aim was to evaluate how the simultaneous deletion of two IgLON family members influences behaviour compared to single gene deletion, and to identify possible compensatory effects after these deletions (for example, whether the expression level of the other members increases). Previously, *Lsamp* and *Ntm* have been implicated in synaptogenesis, therefore we also measured the expression level of *Syp*. Frontal cortex was chosen based on previously published data, where an increase in the level of LSAMP protein has been found in the frontal cortex of schizophrenia patients.

There were no differences between the genotypes in motor activity and learning. Double mutant genotype amplified the anxiolytic phenotype and induced a further decrease in swimming speed compared to single mutants. Next, the expression levels of IgLONs and the activity of eight promoters were measured in the frontal cortex of the same mice. *Opcml*, *Ntm* and *Lsamp* 1a promoters were the most active, followed by *Negr1* and *Opcml*, *Ntm* and *Lsamp* 1b promoters. Gene expression data indicate that all possible dimers of IgLONs are possible in the frontal cortex. No differences in *Syp* expression levels were observed between the genotypes.

We also measured the expression of other IgLONs in three mutant genotypes: *Ntm*^(-/-), *Lsamp*^(-/-) and *Lsamp/Ntm*^(-/-). No compensatory effects were observed, but in the *Lsamp*^(-/-) group a significant decrease in *Ntm* 1a promoter was evident.

In conclusion, simultaneous deletion of *Lsamp* and *Ntm* is not lethal and induces no drastic changes in mice, but amplifies some changes in behavioural phenotype. The deletion of *Ntm* or *Lsamp* or both causes no compensatory effects in the levels of other IgLONs in the frontal cortex. *Lsamp* seems to be the key player in the IgLON family.

TÄNUSÕNAD

Esmalt tänan oma juhendajaid Jürgen Innost, Taavi Vanaveskit ja Tambet Tõnissood, kes avardasid minu arusaama akadeemilisest maailmast. Aitäh Jürgenile, kes tutvustas mulle käitumiskatsete tagamaid ja andis häid näpunäiteid magistritöö koostamisel. Tānukummardus Taavile, kes suutis mind nakatada endas pakatuva teadushuviga ning õpetas leidma seoseid molekulaarsete mehhanismide ja fenotüübi vahel. Ka ei puudunud silmaringi avardavad diskussioonid ja praktilised laboratoorsed nõuanded. Aitäh Tambetile, kes õpetas ja inspireeris mind oma teadmistega arengubioloogias.

Lisaks soovin tänada Kersti Lillevälja lahke nõu ja toetuse eest, Mari-Anne Philipsit abivalmiduse eest ning Aleksandr Breginit juhiste eest hiirte käitumiskatsete läbiviimisel. Olen äärmiselt tänulik kõigile, kes panustasid käesoleva lõputöö valmimisse oma mõtteid ja aega.

Minu soojad tänuavaldused lähevad perele ja lähedastele, kes on andnud kirjeldamatult suure panuse minu isiksuse arengusse ja avaldanud suurt toetust eluteel.

KASUTATUD KIRJANDUS

Aertsen, A., Vaadia, E., Abeles, M., Ahissar, E., Bergman, H., Karmon, B., jt (1991). Neural interactions in the frontal cortex of behaving monkey: signs of dependence on stimulus context and behavioral state. *Journal für Hirnforschung*, 32(6), 735-743.

Barøy, T., Kresse, S., Skårn, M., Stabell, M., Castro, R., Lauvrak, S., jt (2014). Reexpression of LSAMP inhibits tumor growth in a preclinical osteosarcoma model. *Molecular Cancer*, 13, 93.

Behan, A.T., Byrne, C., Dunn, M.J., Cagnay, G., Cotter, D.R. (2009). Proteomic analysis of membrane microdomain-associated proteins in the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia and bipolar disorder reveals alterations in LAMP, STXBP1 and BASP1 protein expression. *Molecular Psychiatry*, 14(6), 601-613.

Blacker, D., Bertram, I., Saunders, A.J., Moscarillo, T.J., Alberts, M.S., Wiener, H. (2003). Results of a high-resolution genome screen of 437 Alzheimer's disease families. *Human Molecular Genetics*, 12(1), 23-32.

Brown, T.I., Whiteman, A.S., Aselcioglu, I., Stern, C.E. (2014). Structural differences in hippocampal and prefrontal gray matter volume support flexible context-dependent navigation ability. *The Journal of Neuroscience*, 34(6), 2314-2320.

Brown, V. ja Bowman, E. (2002). Rodent models of prefrontal cortical function. *Trends in Neuroscience*, 25(7), 340-343.

Castellani, V., Chedotal, A., Schachner, M., Faivre-Sarrailh, C., Rougon, G. 2000. Analysis of the L1-deficient mouse phenotype reveals cross-talk between Sema3A and L1 signaling pathways in axonal guidance. *Neuron*, 27(2), 237-249.

Ceccarelli, A., Rocca, M.A., Pagani, E., Falini, A., Comi, G., Filippi, M. (2009). Cognitive learning is associated with gray matter changes in healthy human individuals: a tensor-based morphometry study. *Neuroimage*, 48(3), 585-589.

Chen, S., Gil, O., Ren, Y., Zanazzi, G., Salzer, J., Hillman, D. (2001). Neurotrimin expression during cerebellar development suggests roles in axon fasciculation and synaptogenesis. *Journal of Neurocytology*, 30, 927–937.

Connors, B.W. ja Cruikshank, S.J. (2007). Bypassing interneurons: inhibition in neocortex. *Nature Neuroscience*, 10(7), 808-881.

Crawley, J., ja Goodwin, F.K. (1980). Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacology, Biochemistry and Behaviour*, 13(2), 167-170.

Elks, C., Loos, R., Hardy, R., Wills, A., Wong, A., Wareham, N., jt (2012). Adult obesity susceptibility variants are associated with greater childhood weight gain and a faster tempo of growth: the 1946 British Birth Cohort Study. *American Journal of Clinical Nutrition*, 95, 1150-1156.

Elvevåg, B., ja Goldberg, T.E. (2000). Cognitive impairment in schizophrenia is the core of the disorder. *Critical Reviews in Neurobiology*, 14(1), 1-21.

Franklin K., ja Paxinos G. (1997). The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. San Diego, Academic Press.

Funatsu, N., Miyata, S., Kumanogoh, H., Shigeta, M., Hamada, K., Endo, Y., jt (1999). Characterization of a novel rat brain glycosylphosphatidylinositol-anchored protein (Kilon), a member of the IgLON cell adhesion molecule family. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(12), 8224-8230.

Gil, O., Zhang, L., Chen, S., Ren, Y.Q., Pimenta, A., Zanazzi, G., Hillman, D., Levitt, P., Salzer, J. (2002) Complementary expression and heterophilic interactions between igLON family members neurotrimin and LAMP. *Journal of Neurobiology*, 51, 190–204.

Godefroy, O. (2003). Frontal syndrome and disorders of executive functions. *Journal of Neurology*, 250(1), 1-6.

Goldman-Rakic, P.S., Bates, J.F., Chafee, M.V. (1992). The prefrontal cortex and internally generated motor acts. *Current Opinion in Neurobiology*, 2(6), 830-835.

- Gutman, D.A., Magnuson, M., Majeed, W., Keifer, O.P Jr., Daivis, M., Ressler, K.J. jt (2013). Mapping of the mouse olfactory system with manganese-enhanced magnetic resonance imaging and diffusion tensor imaging. *Brain Structure and Function*, 218(2), 527-537.
- Haijma, S.V., Haren, Van, N., Cahn, W., Koolschijn, P.C., Hulshoff H.E., Kahn R.S. (2013). Brain volumes in schizophrenia: a meta-analysis in over 18 000 subjects. *Schizophrenia Bulletin*, 39, 1129-1138.
- Hashimoto, T., Maekawa, S., Miyata, S. (2009). IgLON cell adhesion molecules regulate synaptogenesis in hippocampal neurons. *Cell Biochemistry and Function*, 27(7), 496-498.
- Hofman, M.A. (1988). Size and shape of the cerebral cortex in mammals II. The cortical volume. *Brain, Behavior and Evolution*, 32(1), 17-26.
- Innos, J., Philips, MA., Leidmaa, E., Heinla, I., Raud, S., Reemann, P., jt (2011). Lower anxiety and a decrease in agonistic behaviour in Lsamp-deficient mice. *Behavioural Brain Research*, 217, 21-31.
- Kable, J.W. ja Glimcher, P.W. (2007). The neural correlates of subjective value during intertemporal choice. *Nature Neuroscience*, 10(12), 1625-1633.
- Kahn, R. S. ja Sommer, I. E. (2015). The neurobiology and treatment of first-episode schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, 20, 84-97.
- Kehagia, A.A., Murray, G.K., Robbins, T.W. (2010). Learning and cognitive flexibility: frontostriatal function and monoaminergic modulation. *Current Opinion in Neurobiology*, 20(2), 199-204.
- Koido, K., Janno, S., Traks, T., Parksepp, M., Ljubajev, Ü., Veiksaar, P. jt (2014). Associations between polymorphisms of LSAMP gene and schizophrenia. *Psychiatry Research*, 215, 797-798.
- Koido, K., Traks, T., Balõtshev, R., Eller, T., Must, A., Koks, S., jt (2012) Associations between LSAMP gene polymorphisms and major depressive disorder and panic disorder. *Translational Psychiatry*, 2, e152.

- LeDoux, J.E. (2000). Emotion circuits in the brain. *Neuroscience*, 23, 155-184.
- Leyboldt, F., Armangue, T., Dalmau, J. (2015). Autoimmune encephalopathies. *Annals of The New York Academy of Sciences*, 1338, 94–114.
- Lister, R.G. (1987). The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl.)*, 92(2), 180-185.
- Livak, K.J. ja Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Lodge, A.P., Howard, M.R., McNamee, C.J., Moss, D.J. (2000). Co-localisation, heterophilic interactions and regulated expression of IgLON family proteins in the chick nervous system. *Molecular Brain Research*, 82(1-2), 84-94.
- Milad, M.R., Rauch, S.L., Pitman, R.K., Quirk, G.J. (2006). Fear extinction in rats: implications for human brain imaging and anxiety disorders. *Biological Psychology*, 73, 61-71.
- Miller, E.K. ja Cohen, J.D. (2001). An integrative theory of prefrontal cortex function. *Annual Review of Neuroscience*, 24, 167-202.
- Miyata, S., Matsumoto, N., Maekawa, S. (2003). Polarized targeting of IgLON cell adhesion molecule OBCAM to dendrites in cultured neurons. *Brain Research*, 979, 129–136.
- Morris, R.G.M. (1981). Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learning and Motivation*, 12, 239-260.
- Must, A., Tasa, G., Lang, A., Vasar, E., Kõks, S., Maron, E., Väli, M. (2008). Association of limbic system-associated membrane protein (LSAMP) to male completed suicide. *BMC Medical Genetics*, 9, 34.
- Myers-Schulz, B. ja Koenigs, M. (2012). Functional anatomy of ventromedial prefrontal cortex: implications for mood and anxiety disorders. *Molecular Psychiatry*, 17, 132-141.

- Ogdie, M.N., Macphie, I.L., Minassian, S.L., Yang, M., Fisher, S.E., Francks, C., jt (2003). A genomewide scan for attention-deficit/hyperactivity disorder in an extended sample: suggestive linkage on 17p11. *The American Journal of Human Genetics*, 72(5), 1268-1279.
- Pan, Y., Wang, K.-S., Aragam, N. (2011). NTM and NR3C2 polymorphisms influencing intelligence: Family-based association studies. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 35, 154-160.
- Park, S. ja Holzman, P.S. (1992). Schizophrenics show spatial working memory deficits. *Archives of General Psychiatry*, 49(12), 975-982.
- Paulus, M.P., Dulawa, S.C., Ralph, R.J., Mark, A.G. (1999). Behavioral organization is independent of locomotor activity in 129 and C57 mouse strains. *Brain Research*, 835(1), 27-36.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S.E., Briley, M. (1985). Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 14(3), 149-167.
- Philips, M.A., Lilleväli, K., Heinla, I., Luuk, H., Hundahl, C., Kongi, K., jt (2015). Lsamp is implicated in the regulation of emotional and social behavior by use of alternative promoters in the brain. *Brain Structure and Function*, 220, 1381-1393.
- Pimenta, A.F ja Levitt, P. (2004). Characterization of the genomic structure of the mouse limbic system-associated membrane protein (Lsamp) gene. *Genomics*, 83(5), 790-801.
- Pimenta, A.F., Reinoso, B.S., Levitt, P. (1996). Expression of the mRNAs encoding the limbic system-associated membrane protein (LAMP): II. Fetal rat brain. *Journal of Comparative Neurology*, 375(2), 289-302.
- Pimenta, A.F., Zhukareva, V., Barbe, M.F., Reinoso, B.S., Grimley, C., Henzel, W., jt (1995). The limbic system-associated membrane protein is an Ig superfamily member that mediates selective neuronal growth and axon targeting. *Neuron*, 15(2), 287-297.
- Puig, M.V. ja Gullledge, A.T. (2011). Serotonin and Prefrontal Cortex Function: Neurons, Networks, and Circuits. *Molecular Neurobiology*, 44(3), 449-464

- Raud, S., Sütt, S., Luuk, H., Plaas, M., Innos, J., Kõks, S., Vasar, E. (2009). Relation between increased anxiety and reduced expression of alpha1 and alpha2 subunits of GABA(A) receptors in Wfs1-deficient mice. *Neuroscience Letters*, 460(2), 138-142.
- Reed, J., Dunn, J., Plessis, D., Shaw, E., Reeves, P., Gee, A., jt (2007). Expression of cellular adhesion molecule “OPCML” is down- regulated in gliomas and other brain tumours. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 33, 77–85.
- Reed, J., McNamee, C.J., Rackstraw, S., Jenkins, J., Moss, D.J. (2004). Diglons are heterodimeric proteins composed of IgLON subunits, and Diglon-CO inhibits neurite outgrowth from cerebellar granule cells. *Journal of Cell Science*, 117(17), 3961-3973.
- Ridderinkhof, K.R., van den Wildenberg, W.P., Segalowitz, S.J., Carter, C.S. (2004). Neurocognitive mechanisms of cognitive control: the role of prefrontal cortex in action selection, response inhibition, performance monitoring, and reward-based learning. *Brain and Cognition*, 56(2), 129-140.
- Sabater, L., Gaig, C., Gelpi, E., Bataller, L., Lewerenz, J., Torres-Vega, E., jt (2014). A novel non-rapid-eye movement and rapid-eye-movement parasomnia with sleep breathing disorder associated with antibodies to IgLON5: a case series, characterisation of the antigen, and post-mortem study. *The Lancet Neurology*, 13, 575-586.
- Schnack, H.G., van Haren, N.E., Brouwer, R.M., Evans, A., Durston, S., Boomsma, D.I., jt (2015). Changes in thickness and surface area of the human cortex and their relationship with intelligence. *Cerebral Cortex*, 25(6), 1608-1617.
- Schofield, P.R., McFarland, K.C., Hayflick, J.S., Wilcox, J.N., Cho, T.M., Roy, S., jt (1989). Molecular characterization of a new immunoglobulin superfamily protein with potential roles in opioid binding and cell contact. *The EMBO Journal*, 8, 489-495.
- Schol-Gelok, S., Janssens, A.C., Tiemeier, H., Liu, F., Lopez-Leon, S., Zorkoltseva, IV., jt (2010). A genome-wide screen for depression in two independent Dutch populations. *Biological Psychiatry*, 68(2), 187-196.

- Schwartz, T.L., Sachdeva, S., Stahl, S.M. (2012). Genetic data supporting the NMDA glutamate receptor hypothesis for schizophrenia. *Current Pharmaceutical Design*, 18, 1580-1592.
- Sellar, G. C., Watt, K. P., Rabiasz, B. K., Stronach, E. A., Li, L., Miller, E. P. jt (2003). OPCML at 11q25 is epigenetically inactivated and has tumor-suppressor function in epithelial ovarian cancer. *Nature Genetics*, 34(3), 337-343.
- Simons, K. ja Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1(1), 31-39.
- Struyk, A. F., Canoll, P. D., Wolfgang, M. J., Rosen, C. L., D'Eustachio, P., Salzer, J. L. (1995). Cloning of neurotrimin defines a new subfamily of differentially expressed neural cell adhesion molecules. *The Journal of Neuroscience*, 15, 2141–2156.
- Struyk, A., Canoll, P., Wolfgang, M., Rosen, C., D'Eustachio, P., Salzer, J. (1995). Cloning of neurotrimin defines a new subfamily of differentially expressed neural cell adhesion molecules. *The Journal of Neuroscience*, 15, 2141–2156.
- Syal, S., Hattingh, C.J., Fouché, J.P., Spottiswoode, B., Carey, P.D., Lochner, C., jt (2012). Grey matter abnormalities in social anxiety disorder: a pilot study. *Metabolic Brain Disease*, 27(3), 299-309.
- Tarsa, L. ja Goda, Y. (2002). Synaptophysin regulates activity-dependent synapse formation in cultured hippocampal neurons. *Proceeding of the National Academy of Sciences of The United States of America*, 99(2), 1012-1016.
- Uylings, H., Groenewegen, H., Kolb, B. (2003). Do rats have a prefrontal cortex? *Behavioral Brain Research*, 146(1-2), 3-17.
- Vawter, M.P., Howard, A.L., Hyde, T.M., Kleinman, J.E., Freed, W.J. (1999). Alterations of hippocampal secreted N-CAM in bipolar disorder and synaptophysin in schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, 4(5), 467-475.

Vorstman, J.A., Staal, W.G., van Daalen, E., van Engeland, H., Hochstenbach, P.F., Frankie, L. (2006). Identification of novel autism candidate regions through analysis of reported cytogenetic abnormalities associated with autism. *Molecular Psychiatry*, 11(1), 18-28.

Walf, A.A., ja Frye, C.A. (2007). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols*, 2(2), 322-328.

Williams, S.M. ja Goldman-Rakic, P.S. (1998). Widespread origin of the primate mesofrontal dopamine system. *Cerebral Cortex: Oxford Journals*, 8(4), 321-345.

Zhukareva, V. ja Levitt, P. (1995). The limbic system-associated membrane protein (LAMP) selectively mediates interactions with specific central neuron populations. *Development*, 121(4), 1161-1172.

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Jane Narvik

(sünnikuupäev: 12. 06.1990)

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

IgLONite ekspressioon ja kompensatoorsed mehhanismid,

mille juhendajad on :

PhD Jürgen Innos

MSc Taavi Vanaveski

PhD Tambet Tõnissoo

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise alates 05.06.2019 eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates 05.06.2019 kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile

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

Tartu, 20.05.2015