

TARTU ÜLIKOOL
BIOLOOGIA-GEOGRAAFIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
BIOTEHNOLOOGIA ÕPPETOOL

Mari-Anne Philips

**Geeniekspressiooni analüüs agressiivsete (SAL) ja
mitteagressiivsete (LAL) hiirte hippokampuses subtraktiivse
hübriidisatsiooni meetodil**

Magistritöö

Juhendajad: Sulev Kõks, M.D., Ph.D.
Prof. Andres Metspalu, M.D., Ph.D.

TARTU
2004

SISUKORD

| | |
|--|-----------|
| SISUKORD..... | 2 |
| ABSTRACT..... | 3 |
| KOKKUVÕTE..... | 4 |
| LÜHENDID JA MÕISTED..... | 5 |
| SISSEJUHATUS..... | 6 |
| 1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE..... | 7 |
| 1.1 AGRESSIIVSUS..... | 7 |
| 1.2 SAL ja LAL HIIRELIINID..... | 12 |
| 1.3 SUBTRAKTIIVNE HÜBRIDISATSIOON (SH)..... | 17 |
| 1.4 TÖÖ EESMÄRK..... | 19 |
| 2 MEETOD..... | 20 |
| 2.1 KATSELOOMAD..... | 20 |
| 2.2 RNA ERALDAMINE..... | 20 |
| 2.3 SUBTRAKTIIVNE HÜBRIDISATSIOON..... | 20 |
| 2.4 SEKUNDAARSETE PCR PRODUKTIDE KLONEERIMINE..... | 25 |
| 2.5 TRANSFORMEERIMINE JA MINIPREPARATSIOON..... | 26 |
| 2.6 DOT BLOT ANALÜÜS..... | 26 |
| 2.7 SONDIDE HÜBRIDISEERIMINE MEMBRAANILE JA SIGNAALIDE VISUALISEERIMINE..... | 27 |
| 2.8 POSITIIVSETE KLOONIDE VALIKUKRITEERIUMID..... | 27 |
| 2.9 BLOTTIDE KVANTITEERIMINE..... | 27 |
| 2.10 SEKVENEERIMINE..... | 27 |
| 2.11 POSITIIVSETE KLOONIDE IDENTIFITSEERIMINE..... | 28 |
| 3 TULEMUSED..... | 29 |
| 4 ARUTELU..... | 32 |
| 4.1 GABA- ja GLUTAMAADI NÄRVIÜLEKANDESÜSTEEMID..... | 32 |
| 4.2 RAKU ENERGEETIKA ja METABOLISMIGA SEOTUD GEENID..... | 32 |
| 4.3 LIPIIDIDE METABOLISMIGA SEOTUD GEENID..... | 33 |
| 4.4 RAKUTSÜKLIGA SEOTUD GEENID..... | 33 |
| 4.5 LAL HIIRTE HIPPOKAMPUSTES EKSPRESSEERUB PALJU RAKKU STRESSI JA APOPTOOSI EEST KAITSVÄID VALKE..... | 34 |
| 4.6 TSÜTOSKELETIGA SEOTUD GEENID..... | 35 |
| 4.7 AKSONITEGA SEOTUD GEENID..... | 36 |
| 4.8 mRNA ja rRNA SÜNTEESI JA PROTSESSIMISEGA SEOTUD GEENID..... | 36 |
| 4.9 VALKUDE PROTSESSIMISEGA SEOTUD GEENID..... | 37 |
| 4.10 VALKUDE TRANSPORDIGA SEOTUD GEENID..... | 37 |
| 4.11 SAL HIIRTE HIPPOKAMPUSTE GEENIEKSPRESSIOONI PROFIIL..... | 38 |
| 4.12 LAL HIIRTE HIPPOKAMPUSTE GEENIEKSPRESSIOONI PROFIIL..... | 39 |
| 4.13 SUBTRAKTIIVSE HÜBRIDISATSIOONI TULEMUSED VÕRRELDES TEISTE SAL ja LAL HIPPOKAMPUSTE GEENIEKSPRESSIOONI VÕRDLUSEKS KASUTATUD MEETODITEGA..... | 40 |
| JÄRELDUSED..... | 41 |
| TÄNUAVALDUSED..... | 42 |
| VIITED..... | 43 |

ABSTRACT

Aggressiveness is an important social problem worldwide. Studies in aggressiveness are abundant, however, very little progress has been made in the treatment of pathological aggressiveness. We know very little about the interaction of genes and physiological endophenotypes underlying aggressiveness. In this study, to identify candidate genes associated with aggressiveness two selectively inbred mouse lines were used – aggressive (SAL; short attack latency) and nonaggressive (LAL; long attack latency). To analyse gene expression profiles in the hippocampus of these mouse lines, subtractive hybridization (SH) was used. As a control for SH, dot blot analysis was used. The present study demonstrated that different signal pathways were upregulated in the hippocampus of SAL and LAL mice. In the hippocampus of SAL mice the following genes were overexpressed: GABA-A receptor alpha2 subunit, two transporter proteins for small lipid ligands (Lrp11 and apolipoprotein D), and also glycosyltransferase Ugg1 and an activating protein for many neuropeptides carboxypeptidase E. In the hippocampus of LAL mice the following genes were overexpressed: glutamate receptor AMPA2, many different genes associated with the metabolism and energetics of the cell, and also several proteins that protect cells against apoptosis and oxidative stress. The present study confirms that SH is an effective method for comparing two cDNA populations; the results of the SH experiment complement the results of earlier studies with SAGE and *GeneChip* in several ways.

KOKKUVÕTE

Agressiivsus on oluline sotsiaalne probleem üle maailma. Rohketest uurimustest hoolimata on patoloogilise agressiivsuse ravis tehtud väga vähe edusamme. Vähe on teada agressiivsust mõjutavate geenide omavaheliste interaktsioonide ning füsioloogiliste endofenotüüpide kohta. Käesolevas uurimuses kasutati agressiivsusega seotud kandidaatgeenide leidmiseks kahte selektiivselt aretatud hiireliini – agressiivset (SAL; *short attack latency*) ja mitteagressiivset (LAL; *long attack latency*). Geeniekspressiooni võrdlemiseks nende hiireliinide hippokampuses kasutati subtraktiivse hübriidisatsiooni (SH) meetodit. SH tulemusi kinnitati *dot blot* analüüsiga. Käesolevas töös näidati, et SAL ja LAL hiirte hippokampuses on ülesreguleeritud erinevad signaalirajad. Leiti, et SAL hiirte hippokampuses ekspresseerusid intensiivsemalt GABA-A retseptori alfa2 subühik, samuti väikeseid lipiidseid ligandeid transportivad valgud Lrp11 ja apolipoproteiin D; samuti glükosüültransferaas Ugg1 ning mitmeid neuropeptiide aktiveeriv karboksüpeptidaas E. LAL hiirte hippokampuses ekspresseerusid intensiivsemalt glutamaadireseptor AMPA2, erinevad raku metabolismi ja energiaenergeetikaga seotud geenid ning samuti mitmed rakku apoptoosi ning oksüdatiivse stressi eest kaitsvad valgud. Käesolev töö kinnitab, et SH on efektiivne meetod kahe cDNA populatsiooni võrdluseks ning SH tulemused täiendavad igati andmeid, mis on varasemates uuringutes saadud SAGE't ning geeniikiipi kasutades.

LÜHENDID JA MÕISTED

| | |
|-----------|--|
| AKTH | (<i>adrenocorticotropic hormone</i>) - adrenokortikotroopne hormoon |
| AMPA | (<i>alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid</i>) - alfa-amino-3-hüdroksü-5-metüül-iso-oksasool-4-propioonhape |
| DSI | düssotsiaalne isiksushäire – diagnostiline kategooria (F60.2) rahvusvahelises haiguste klassifikatsioonis (RHK-10) |
| DIG-dUTP | (<i>digoxigenin-dUTP</i>) modifitseeritud nukleotiid, mis võib PCR-i reaktsiooni käigus asendada dTTP nukleotiidi |
| Draiver | (<i>driver</i>) – referents cDNA populatsioon, millega subtraktiivse hübridisatsiooni puhul huvialust (tester) populatsiooni võrreldakse |
| GABA | (<i>gamma aminobutyric acid</i>) gamma-amino-võihape |
| GD | (<i>gyrus dentatus</i>) – hammaskäär; hippokampuse anatoomiliselt eristuv osa |
| 5-HT | (<i>5-hydroxytryptamine</i>) – 5- hüdroksütrüptamiin; serotoniin |
| HPA- telg | (<i>hypothalamic-pituitary-adrenal axis</i>) - hüpotaalamo-hüpofüsaar-adrenokortikaal-telg |
| LAL | (<i>long attack latency</i>) – pikk ründelatents; parameeter, mille alusel selekteeritakse mitteagressiivset LAL hiireliini |
| NBT/BCIP | (<i>nitro blue tetrazolium / 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate</i>) – substraat, mis ensümaatilises reaktsioonis aluselise fosfaasiga annab visuaalselt detekteeritava värvussignaali |
| SAGE | <i>Serial analysis of gene expression</i> |
| SAL | (<i>short attack latency</i>) – lühike ründelatents; parameeter, mille alusel selekteeritakse agressiivset SAL hiireliini |
| SH | (<i>subtractive hybridization</i>) – subtraktiivne hübridisatsioon |
| SSH | (<i>supression subtractive hybridization</i>) – supressiooni efektil põhinevat PCR`i reaktsiooni sisaldav subtraktiivne hübridisatsioon |
| Tester | (<i>tester</i>) – huvialune cDNA populatsioon, milles esinevaid erinevusi võrreldes referents cDNA populatsiooniga (draiveriga) soovitakse subtraktiivse hübridisatsiooni käigus tuvastada |

SISSEJUHATUS

Agressiivsus on oluliseks sotsiaalseks probleemiks üle maailma. Maailma tervishoiuorganisatsiooni (WHO; *World Health Organization*) 2002. aasta raporti alusel sureb maailmas igal aastal otseselt vägivallategude tagajärjel 1,6 miljonit inimest. 15-44-aastaste inimeste puhul on vägivallateod üheks sagedasemaks surmapõhjuseks; agressiivsusest on tingitud 14% kõikidest selle vanusegrupi meeste ning 7% kõikidest sama vanade naiste surmajuhtumitest (Krug *et al*, 2002). Epidemioloogiliste uurimuste alusel on düssotsiaalse isiksushäire esinemismäär kogu populatsioonis 2-3% ringis ning ulatub 60%-ni meesvangide seas. Rohketest uurimustest hoolimata on patoloogilise agressiivsuse ravis tehtud äärmiselt vähe edusamme; siiani pole selgust agressiivsuse ja tema alatüüpide (sh düssotsiaalse isiksushäire) valiidsuse osas (Moran, 1999).

Agressiivsuse patofüsioloogiat puudutavates uuringutes on sihikul kindlad ajupiirkonnad; kõige selgemad patoanatomilised leiud on seotud mediaalse temporaalsagara ning frontaalkoorega. Samuti on juba praegu saadud olulist informatsiooni agressiivsuse patofüsioloogia taga oleva molekulaargeneetilise baasi kohta. Agressiivsuse kandidaatgeenid on seni läbi viidud uuringutes eelkõige klassikaliste neurotransmitter-süsteemidega seotud geenid. Praegu seostatakse agressiivsust valdavalt serotoniinergilise süsteemiga, aga ka dopamiinergilise ja noradrenergilise süsteemiga. Paljulubavad on leiud, mis seostavad kõrgeenenud agressiivsust monoamiinide lammutavate valkudega. Kõrgeenenud agressioon on seotud nii MAO-A (monoamiinide oksüdaas A) kui KOMET'i (katehhool-O-metüültransferaas) madalama aktiivsusega. Siiski on vähe teada agressiivsust mõjutavate geenide omavaheliste interaktsioonide ning füsioloogiliste endofenotüüpide kohta.

Agressiivsusega seotud võimalikke geeniekspressiooni mustreid ning endofenotüüpe võimaldavad leida loomudelid, mis valiidselt modelleerivad inimese patoloogilise agressiivsuse avaldumisvormi. Käesolevas uurimuses kasutati agressiivsusega seotud kandidaatgeenide leidmiseks kahte selektiivselt aretatud hiireliini – agressiivset (SAL; *short attack latency*) ja mitteagressiivset (LAL; *long attack latency*). Eesmärgiks oli võrrelda geeniekspressiooni mustrit nende hiirte hippokampuses subtraktiivse hübriidsatsiooni meetodil. Subtraktiivne hübriidsatsioon on meetod, mis võimaldab võrrelda madalaläviseid erinevusi kahes cDNA populatsioonis. Geeniekspressiooni mustrite võrdlus võib anda olulisi andmeid kõrge ja madala agressiivsusega seotud geeniekspressiooni profiilide kohta ning teha oletusi nendega seotud endofenotüüpide kohta.

1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 AGRESSIIVSUS

1.1.1 AGRESSIIVSUSE DEFINITSIOON JA KLASSIFIKATSIOONID

Agressiivsusega seotud kirjanduses viidatakse enamasti Moyeri (1968) klassikalisele agressiivsuse definitsioonile: agressiivsus on käitumine, mis põhjustab teisele organismile valu ja vigastusi. Seda definitsiooni on ka palju kritiseeritud (Weinshenker ja Siegel, 2002), ent ühtse agressiivsuse definitsiooni puudumine on mõistetav, kuna uurijad ei ole üksmeelel ka agressiivsuse erinevate alatüüpide ja klassifikatsiooni osas.

Enamik agressiivsuse teoreetikuid on üksmeelel, et agressiivsus pole ühtne fenomen, vaid jaguneb mitmeteks fundamentaalselt erinevateks alatüüpideks. Agressiivsuse klassifikatsioone leidub mitmeid ning on eristatud kuni seitse agressiivsuse avaldumisvormi.

Blanchard *et al* (2003) käsitluses esineb loomadel vähemalt viis erinevat agressiooniliiki: mänguline (*play fighting*), ründav (*offensive* – sama liigi isaste võitlus eluliselt oluliste ressursside pärast), kaitsev (*defensive* – rünnak oma füüsilise turvalisuse nimel), kiskjalik (mille eesmärk on murdmine) ning emalik. Kiskjalik agressiivsus on erinev ründavast agressiivsusest, sest ründavat agressiivsust vähendavad farmakonid (näiteks fluprasiin) ei vähenda kiskjalikku agressiivsust, samuti ei kaasne kiskjaliku rünnakuga enamasti sümpaatilise närvisüsteemi erutusseisundit. Blanchard *et al* (2003) leiavad, et just ründav agressiivsus sarnaneb kõige rohkem inimese patoloogilise agressiivsusega.

Moyer (1968) pakub oma agressiivsuse klassikaks kujunenud artiklis välja seitse erinevat agressiivsuse liiki, mis on seotud erinevate keskkonnatingimustega. Blanchard *et al* (2003) definitsioonidele lisanduvad Moyeril (1968) hirmust tingitud (*fear-induced*) agressiivsus; ärritusest (kuumusest, näljast, janu või valu) tingitud (*irritable*) agressiivsus; seksuaalsusega seotud (*sex-related*) ning territoriaalne agressiivsus.

Weinshenker ja Siegel (2002) pakuvad omakorda välja bimodaalse teooria, kus eristuvad ainult kaks peamist agressiooni liiki: afektiivne kaitseagressiivsus (*affective defense*) ning kiskjalik ründaagressiivsus (*predatory attack*). Afektiivne kaitseagressiivsus on alati seotud hirmureaktsiooniga, olenemata sellest, kas oht on reaalne või näiline. Kaitseagressiivsuse eesmärgiks on hirmutava elusolendi või objekti kõrvaldamine, et vähendada ebameeldivat ärevusreaktsiooni. Afektiivne kaitseagressiivsus sisaldab alati intensiivset sümpaatilise närvisüsteemi erutust ning impulsiivset reaktsiooni hirmutavale stiimulile. Inimeste puhul esindavad afektiivset kaitseagressiivsust impulsiivsed isiksused (*explosive personality*), keda iseloomustab madal ärrituse talumise ja agressiooni vallandumise lävi.

Kiskjalik ründaagressiivsus seevastu ei sisalda ei ärevust ega ka sümpaatilise närvisüsteemi erutust. Ründaagressiivsus on eesmärgipärane ning sihtmärki otsitakse teadlikult. Loomariigis on eesmärgiks söögi hankimine; inimeste puhul on sarrustavad mõjud ilmselt teistsugused, tõenäoliselt sadistlik mõnu, enesehinnangu tõus ning reipus (Weinshenker ja Siegel, 2002). Inimeste puhul esindavad kiskjalikku ründaagressiivsust düssotsiaalse isiksushäirega (DSI; Rahvusvahelise haiguste klassifikatsiooni RHK-10 alusel F60.2) inividid, keda iseloomustab madal emotsionaalsus, sotsiaalsete normide eiramine,

süütunde puudumine ning kalk tegutsemine vahendeid valimata oma eesmärkide saavutamiseks.

On selge, et agressiivsusel on vähemalt kaks fundamentaalselt erinevat avaldumisvormi – ründav ja kaitsev. Võimalik, et edasiste uuringute valiidsuse huvides tuleks alatüüpe veelgi spetsiifilisemalt eristada. Weinshenkeri ja Siegeli (2002) arvates on valiidsuse agressiivsuse klassifikatsiooni puudumine üks põhilisi põhjuseid, miks agressiivsuse ravis on tehtud siiani väga vähe edusamme.

1.1.2 AGRESSIIVSUSE REGULATSIOONIGA SEOTUD PIIRKONNAD NÄRVISÜSTEEMIS

1.1.2.1 Frontaalsagar ja agressiivsus

Enimuuritud ajupiirkond agressiivsuse, vägivaldsuse ja impulsiivsusega seoses on kahtlemata frontaalkoor, eriti orbitofrontaalne piirkond (Brower ja Price, 2001). On teada hulgaliselt juhtumeid, kus indiviidide agressiivsus kasvab just frontaalsagara kahjustuse järgselt (Anderson *et al*, 1999); samuti on võimalik, et agressioon frontaalkoore kahjustuse tagajärjel kaob (Panksepp, 1998). Just frontaalkoor on seotud infotöötuse, otsuste langetamise ja käitumuslike reaktsioonide kontrolliga. Märkimisväärne on see, et agressioon, mis tekib frontaalsagara teatud piirkondade lokaalsete kahjustustega, on sõltumatu üldisest intellektuaalse funktsioneerimise tasemest.

1.1.2.2 Mediaalne temporaalsagar ja agressiivsus

Teiseks agressiivsusega seoses üha enam tähelepanu pälvivaks ajupiirkonnaks on mediaalne temporaalsagar, täpsemalt hippokampuse ning amügdala piirkonnad. Ka mediaalse temporaalsagara lokaalsed kahjustused võivad agressiivsust nii tõsta kui vähendada; näiteks Becker ja Grecksch (2003) näitasid, et ventraalse hippokampuse kahjustamine rottidel suurendab nende agressiivsust ja vähendab sotsiaalseid interaktsioone. Hippokampus on limbilise süsteemi osa, kus toimub erinevate kognitiivsete ja emotsionaalsete funktsioonide regulatsioon. Hippokampus on seotud mälu (sh hirmu tingimise), õppimise ja emotsioonidega. Hippokampus on frontaalkoore järel teine ajupiirkond, mis pälvib agressiivsusega seoses üha enam tähelepanu (Raine *et al* 2004).

1.1.3 AGRESSIIVSUSE KANDIDAATGEENID

Seda, et agressiivsus on suures osas “geneetiline pärand” esivanematelt, kinnitab populatsioonigeneetika: agressiivsus on üks kõige tugevama päriliku komponendiga käitumuslikke avaldusi (Plomin, 2000). Agressiivsuse pärilikkuskoefitsient varieerub erinevates uurimustes 0,36 ja 0,65 vahel, olenevalt sellest, millist populatsiooni, mõõtevahendit ja valemit selle määramiseks kasutatakse (Nyberg *et al*, 2004). 1989. aastal tehtud metaanalüüsis, mis võttis kokku 9 agressiivsusega seotud kaksikuteuringut, leiti, et monosügootsete (MZ) kaksikute agressiivsuse kokkulangevus on 51% ja disügootsetel (DZ) kaksikutel 22% (Ebstein ja Kotler, 2003). Agressiivsuse tugevat geneetilist komponenti näitab ka see, et agressiivsete ja mitteagressiivsete hiireliinide selektiivsel inbriidingul ilmnevad tugevad liinidevahelised erinevused juba teises selektsioonipõlvkonnas (Nyberg *et al*, 2004).

1.1.3.1 Monoamiinergilised süsteemid ja agressiivsus

Serotoniini (5-HT) seosed sotsiaalse käitumise ja agressiivsusega on tõenäoliselt psühhofüsioloogia uurituim teema. Erinevad SSRI (selektiivsed 5-HT tagasihaarde pärssijad) tüüpi antidepressandid, mis tõstavad 5-HT taset sünaptilises pilus, näiteks fluoksetiin või sertraliin, on osutunud efektiivseks psühhiaatriliste patsientide patoloogilise agressiooni ravis (Coccaro *et al*, 1997; Kavoussi *et al*, 1994). Seevastu trüptofaani taseme alandamine (mille tagajärjel väheneb serotoniini süntees ajus) suurendab inimestel katsetingimustes agressiivsust (Moeller *et al*, 1996; Bjork *et al*, 2000). 5-HT 1A alatüüpi retseptori selektiivne aktivatsioon vähendab agressiivsust nii inimestel kui ka närilistel (Panksepp, 1998) ning 5-HT 1B retseptori puudulikkusega hiired on tunduvalt agressiivsemad kui nende metsiktüüpi pesakonnakaaslased (Sadou *et al*, 1994). Inimestega läbi viidud assotsiatsiooniuuringutes on korduvalt agressiivsusega seostatud vaid üks 5-HT-ergilises süsteemis osalevat valku kodeeriv geen – trüptofaani hüdroksülaasi 1 (TPH1) geen. TPH1 geen kodeerib valku, mis sünteesib trüptofaanist 5-HTP-d (5-hüdroksü-trüptofaan), mis on 5-HT eellasmolekuliks. Kahes uurimuses (kokku 405 katseisiku andmetel) on näidatud, et TPH1 geeni seitsmendas intronis asuva bialleelse RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) markeri (A218C) variandid jaotuvad agressiivsete ja mitteagressiivsete isikute vahel erinevalt (Manuck *et al*, 1999; Rujescu *et al*, 2002). On märkimisväärne, et alles 2003. aastal avastati teine trüptofaani hüdroksülaasi geen TPH2, mis tegelikult kesknärvisüsteemi serotoniinisünteesis osaleb (va käbinäärmes, kus ekspresseerub ka TPH1). Psüühiliste nähtustega seoses paljuuritud TPH1 geen ekspresseerub valdavalt ainult perifeerses närvisüsteemis ning tema otsene osalus peaaegu biokeemilises regulatsioonis on väike (Walther *et al*, 2003). Niisiis on praegu agressiivsusega seostatud perifeerses närvisüsteemis 5-HT sünteesiva geeni polümorfism.

Kuigi ka dopamiinergilist süsteemi peetakse üheks olulisemaks osalejaks sotsiaalse käitumise ja agressiivsuse regulatsioonis (Miczek *et al*, 2002), on dopamiinergilise närviülekandega seotud geenide ja agressiivsuse vahel seoseid leitud vaid üksikutel juhtudel, näiteks Persson *et al* (2000). Türosiini hüdroksülaasi (TH) geen kodeerib valku, mis sünteesib türosiinist L-DOPA-t, mis on dopamiini eellasmolekul. Persson *et al* (2000) leidsid 205 katseisikut testides, et TH geeni kaheksakorduselist TCAT-järjestust sisaldava alleelivariandi kandjad on teiste variantide omanikest haavatavamad ja vaenulikumad.

Noradrenaliin ja adrenaliin on seotud ärkveloleku, tähelepanu, valmisoleku ja üldise erksuse tasemega. Agressiivsusega seostatakse nii kõrgeenenud noradrenaliini taset, mis on seotud madalama stressi vallandumise lävega, kui ka ebanormaalselt madalat sümpaatilise närvisüsteemi aktivatsiooni läve, mis iseloomustab düssotsiaalse isiksushäirega patsiente. On leitud, et noradrenaliini metaboliidi MHPG (3-metoksü-4-hüdroksü-fenüül-glükool) tase veres korreleerub indiviidi agressiivse minevikuga (Coccaro *et al*, 2003). Comings *et al* (2000) seostasid adrenergilise retseptori 2A geeni (ADRA2A) ühe sagedalt esineva SNP kõrge ärrituvuse, vaenulikkuse ja impulsiivsusega tervetel indiviididel. Vaatamata sellele, et adrenergilise süsteemi geenid võiksid teoreetiliselt olla olulised kandidaadid agressiivsuse geenide otsingul, ei ole seni ühtegi assotsiatsiooniuuringut agressiivsuse ja adrenergiliste geenide polümorfismide vahel korrata suudetud.

Transkriptsioonifaktor AP-2 osaleb paljudes signaaliteedes. AP-2 seondumiskohta omavad paljud 5-HT-ergilise, dopamiinergilise ja koliinergilise süsteemi regulatsiooniga seotud geenid, näiteks on AP-2 seondumissait DAT1 (dopamiini transporter) ja 5-HTT (serotoniini transporter) regulatoorses alades. See muudab AP-2 kahtlemata kandidaadiks

isiksusegeenide otsingul. Seni on seost näidanud vaid Damberg *et al* (2000), kelle uuringus polümorfism AP-2 geenis oli seotud agressiivsusega meestel (naistel seostus selles uuringus sama polümorfism ärevusega).

1.1.3.2 Monoamiine lammutavaid valke kodeerivad geenid

MAO-A geen kodeerib monoamiinide oksüdaasi ensüümi MAO-A, mis lammutab monoamiine (dopamiin, noradrenaliin, adrenaliin ja serotoniin). Hollandlane Brunner (Brunner *et al*, 1993) oli üks esimesi, kes asus uurima perekonda, kus mehed panid läbi mitmete põlvkondade toime julmi kuritegusid (õe vägistamine, mõrvakatsed, süütamised ja muud vägivaldteod). Brunner uuris perekonna 24 liikme genotüüpe ja leidis, et vägivaldsetel pereliikmetel esineb ühenukleotiidne mutatsioon MAO-A geenis, mistõttu MAO-A ensüüm on kaotanud aktiivsuse. Hiljem on selle perekonna fenomeni nimetatud Brunneri sündroomiks, ent kusagil mujal pole sellist mutatsiooni ega sellega kaasnevat käitumuslikku sündroomi leitud.

Tulemusrikkamad on olnud uuringud, kus geneetiliseks markeriks on võetud 30-nukleotiidne kordusjärjestus MAO-A geeni promotoris (MAOALPR). See VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*) marker asub 1200 bp transleeritavast piirkonnast ülesvoolu ning 30-aluspaarine järjestus esineb kolme, kolme ja poole, nelja või viie kordusena. Sabol *et al* (1998) näitasid, et kolme ja poole või nelja koopiaga alleele transkribeeritakse 2-10 korda efektiivsemalt kui neid alleele, kus esineb kolm või viis koopiat. MAOALPR'i on kahes uurimuses seostatud düssotsiaalse käitumise, impulsiivsuse ja agressiivsusega meestel (Reif ja Lesch, 2003) ning samuti on näidatud MAOALPR'i mõju düssotsiaalse isiksushäire kujunemisele interaktsioonis lapsea väärkohtlemisega (Caspi *et al*, 2002).

On tõenäoline, et madala aktiivsusega MAO-A avaldab mõju varases arengujärgus, sest kõrgeenenud agressiivsust põhjustab ka MAO-A inhibiitorite manustamine vastsündinud hiirtele (Mejia *et al*, 2002); samuti on MAO-A *knockout* hiired agressiivsemad kui metsiktüüpi hiired (Cases *et al*, 1995).

Katehhool-O-metüültransferaas KOMT lammutab dopamiini, noradrenaliini ja adrenaliini; 5-HT KOMT'i substraat ei ole. Sagedalt esinev ühe aminohappe (Val-108-Met) polümorfism KOMT geeni neljandas eksonis põhjustab termolabiilset madala aktiivsusega ensüümivarianti. Val/Val homosügootidel on kõrge KOMT'i aktiivsus, Val/Met heterosügootidel keskmine ja Met/Met homosügootidel 4-5 korda madalam KOMT'i aktiivsus kui Val/Val genotüübi puhul. Kõrgeenenud agressiivsusega on kolmes erinevas uurimuses seostatud just madala aktiivsusega ensüümivarianti (Ebstein ja Kotler, 2003; Rujescu *et al*, 2003).

1.1.3.3 Gamma-amino-võihape: GABA

GABA-ergiline süsteem on samuti üheks olulisemaks kandidaadiks agressiivsuse närviregulatsiooni uurimisel (Miczek *et al*, 2002). GABA on pidurdav neurotransmitter ning enamasti seostatakse kõrgeenenud GABA taset madalama agressiivsusega. Sellegipoolest on hulgaliselt andmeid, et teatud tingimustel ja doosist sõltuvalt võivad GABA-A retseptori agonistid agressiivsust tõsta (Miczek *et al*, 2003). Oluline viide selle

kohta, et GABA hulga vähendamine võib agressiivsust hoopis alandada, on ka see, et GABA't sünteesiva glutamaathappe dekarboksülaasi (GAD-65) *knockout* hiired, kelle GABA tase on püsivalt madal, on vähem agressiivsed kui metsiktüüpi hiired (Stork *et al*, 2000). GABA-ergilisel süsteemil on ilmselge osa agressiivsuse regulatsioonis, ent mil viisil see täpselt toimib, pole veel teada. Polümorfisme GABA retseptorite või GAD geenides seni agressiivsusega seostatud ei ole.

1.1.3.4 Opioidergiline süsteem

Arvatakse, et ka opioidergiline süsteem osaleb agressiivse käitumise regulatsioonis, ning ka opioidide käitumusliku efekti kohta on saadud vastuolulisi andmeid. Enamikes uurimustes on siiski näidatud opioidide agressiivsust vähendavat mõju. Ka ühes kõige värskemal ning põhjalikumal uurimuses, kus katseloomadeks olid 11 erineva liini hiired (Tordjman *et al*, 2003), seostati madalam agressiivsus kõrgema endogeensete opioidide tasemega. Miller *et al* (2004) uurimisgrupp on seni ainus, kes on välja toonud seose opioidireseptori polümorfismi ja agressiivsuse vahel. Nii inimese kui reesusahvi μ -opioidi retseptori ekstratsellulaarses N-terminaalses osas asub ühenukleotiidne polümorfism, mis muudab arginiini proliiniks (inimesel A118G; reesusahvil C77G). G-alleelilt kodeeritaval retseptoril on nii inimese kui ahvi puhul suurem afiinsus β -endorfiinile ning seda seostatakse madalama kortisooli tasemega veres ja võimendunud hüpotaalamo-hüpofüsaar-adrenokortikaal- (HPA-) telje regulatsiooniga. Miller *et al* (2004) uurimuses seostati C-alleel reesusahvidel kõrgema agressiivsusega ning autorite sõnul on polümorfismide analoogia piisavalt selge, et üldistada tulemusi inimestele.

1.1.3.5 Agressiivsus ja ülegenoomsed uuringud

Selle aasta alguses on ilmunud kaks ülegenoomset uuringut, kus on otsitud spetsiifiliselt agressiivsuse ja vaenulikkusega seotud lookuseid. Knox *et al* (2004) testisid 2662 indiviidi agressiivsust ja vaenulikkust ning genotüpeerisid samad isikud 387 autosomaalse mikrosatelliitse polümorfismi alusel. Selles uurimuses leiti ainult 18 *lod* skoori, mis olid kõrgemad kui 1, ning ükski neist polnud kõrgem kui 2. Dick *et al* (2004) viisid läbi ülegenoomse uuringu, et leida lapsea käitumishäirega seotud lookuseid. Läbi sõeluti 336 mikrosatelliitset markerit üle genoomi keskmiselt iga 10,5 cM järel. Olulisemateks *lod* skoorideks jäid 2,5 teises kromosoomis ning kolmelähedane *lod* skoor kromosoomis 19. Ülegenoomsetes uuringutes pole seni õnnestunud tabada ühtki uut märkimisväärset agressiivsusega seotud lookust.

Kokkuvõttes kuuluvad senistes uuringutes agressiivsuse kandidaatgeenide hulka klassikaliste neurotransmittersüsteemidega seotud geenid. Agressiivsusega seotud geenide otsingul on juba praegu tehtud märkimisväärseid leide, ent süstemaatilistest teadmistest on asi hetkel veel kaugel. Üheks olulisemaks põhjuseks võib olla see, et agressiivsus ei ole üks ja üldine fenotüüp. Eksisteerib vähemalt kaks fundamentaalselt erinevat agressiivsuse liiki, mille taga on suure tõenäosusega ka erinev patofüsioloogia (Weinshenker ja Siegel, 2002). Senistes uurimustes ei ole agressiivsuse alatüüpe süstemaatiliselt eristatud. Teine põhjus, miks andmed agressiivsuse geneetika osas on suhteliselt kaootilised, on kindlasti see, et vähe on vaadatud geeniekspressiooni mustreid ning agressiivsust mõjutavate geenide omavahelisi interaktsioone.

1.1.4 AGRESSIIVSUSE MODELLEERIMINE KATSELOOMADEL

Inimühiskonnas kujundavad agressiivsuse avaldumisvorme paljud kultuurilised ning sotsiaalsed mõjud. Sellegipoolest viitavad paljud andmed sellele, et inimeste ja loomade agressiivse käitumise neuraalne baas on äärmiselt sarnane ning inimeste ja loomade agressiooni avaldumisvormides on märkimisväärsed kokkulangevusi (Weinshenker ja Siegel, 2002).

Enamik katseloomi kasutavaid agressiooniuuringuid on läbi viidud hiirte, rottide ja hamstritega (Blanchard *et al*, 2003), aga palju on kasutatud ka erinevaid ahviliike (näiteks: Miller *et al*, 2004). Inimese ja hiire füsioloogia (sh närvisüsteemi füsioloogia) vahel on märkimisväärne sarnasus (Coleman, 2003), seetõttu peetakse hiiri valiidses loomudeliks paljude inimseisundite modelleerimisel.

Agressiivsus on hiirtel, nagu ka inimestel, äärmiselt püsiv omadus. Nyberg *et al* (2004) näitasid, et on väga raske luua keskkonnatingimusi, mis vähendaksid geneetiliselt agressiivsusele kalduvate hiirte agressiivsust. Nende uurimuses ründasid agressiivse liini hiired võõrast isast liigikaaslast lühikese aja jooksul olenemata sellest, kas nad olid üles kasvanud isolatsioonis või emase hiire seltskonnas, ning sõltumatult sellest, kas nad olid territooriumil sissetungija või püsielaniku rollis.

Loomade agressiivsuse testimiseks levinuim test on püsielaniku-sissetungija (*resident-intruder*) test (de Boer *et al*, 2003). Sellel testil on mitmeid erinevaid variante; testitav loom võib olla nii püsielaniku kui sissetungija rollis, samuti võib kaks võõrast looma panna uude keskkonda kokku üheaegselt. On vähemalt 28 käitumuslikku tegevust ning kehaasendit, mida on võimalik looma puhul püsielaniku-sissetungija testis mõõta. Märkimisväärne on aga see, et aeg, mille jooksul loom oma võõrast kaaslast ründab (ründelatents) korreleerub üldise agressiivsusskooriga -0,71 kuni -0,92 (de Boer *et al*, 2003).

1.2 SAL ja LAL HIIRELIINID

1.2.1 SAL ja LAL LIINIDE SELEKTEERIMINE ja SÄILITAMINE

1970-tel aretati Hollandis Groningeni ülikoolis välja kaks erinevat hiireliini – agressiivne ja mitteagressiivne. Hiired pärinevad metsiku koduhiire (*Mus musculus domesticus*) kolooniast ning neid on selekteeritud “püsielaniku-sissetungija” testi alusel, millest ka hiireliinide nimed – SAL (*short attack latency*, lühike ründelatents) ja LAL (*long attack latency*, pikk ründelatents). 92-100 päeva vanuselt testitakse isaste hiirte ründelatentsi ning määratakse, kas nad on sobilikud liini edasiseks selektsiooniks. SAL ja LAL isastel hiirtel lastakse üks päev uue neutraalse puuriga harjuda. Teisel päeval pannakse spetsiaalsesse “vastase kambri” (*opponent chamber*) võõras mitteagressiivne isane hiir, ning avatakse luuk testitava looma kodupuuri ning vastase kambri vahel. Kolmel järjestikusel päeval mõõdetakse aega, mille jooksul hiir võõrast ründab. Iga hiire ründelatentsi skoor arvutatakse kolme päeva keskmise latentsiaja põhjal. Eksperimentideks ja liini edasiseks selektsiooniks kasutatakse ainult SAL loomi, kes ründavad vähem kui 50 sekundi jooksul ning LAL loomi, kes võõrast kordagi ei ründa. Detailsem protseduuri ja katseparaadi kirjeldus leidub Sluyter *et al* (2003) artiklis.

Weinshenkeri ja Siegeli (2002) teooria kontekstis on SAL hiired selekteeritud afektiivse kaitseagressiivsuse alusel; seega on SAL hiired impulsiivse agressiivsuse loomudeliks. Seda agressiivsuse liiki esindavad inimeste puhul impulsiivsed isiksused (*explosive personality*), keda iseloomustab ärev vaenlase tajumine, madal ärrituse talumise lävi ning vähene impulsikontroll.

1.2.2 SENISED UURIMUSED SAL ja LAL HIIRTEGA

1.2.2.1 LAL hiired on stressitundlikumad ja passiivsemad kui SAL hiired.

Mitmetes erinevates uurimustes on näidatud, et SAL ja LAL hiireliinid erinevad mitte üksnes ründelatentsi poolest. Agressiivsed SAL hiired reageerivad keskkonna stressoritele aktiivselt; LAL hiirtele on aga omane passiivne toimetulekustiil, stressoritele reageerivad nad valdavalt liikumatuks jäämisega (*freezing*).

Sluyter *et al* (1996) kasutasid katseskeemi, kus hiirel oli võimalik elektrilööke aktiivse tegutsemisega vältida. Selles katseskeemis antakse hiirele puuri põhjast elektrilööke ning hiirel on võimalik stressorist vabanemiseks kasutada kahte strateegiat: kuhjata elektrisondile pesamaterjali või jääda liikumatuks. SAL loomad kasutavad rohkem aktiivset strateegiat (*defensive burying*); LAL hiired seevastu jäävad enamasti passiivseks.

Teises uurimuses kasutasid Veenema *et al* (2003b) kroonilise sensoorse stressori mudelit. Sensoriseks stressoriks oli selles uurimuses väga agressiivne hiir, kellega testitav hiir pidi 25 päeva jooksul kõrvuti puurides elama. Katseloom nägi ja haistis oma agressiivset naabrit, ent füüsilist ohtu võõras ei kujutanud. Sellise pikaajalise sensoorse stressori tingimustes kujunesid kroonilise stressi sümptomid ainult LAL liini hiirtele. Sel juhul, kui hiired pandi väga agressiivse hiirega ühte puuri elama (*defeat stress*), tekkisid kroonilise stressi sümptomid ühtviisi mõlema liini hiirtele.

Veenema *et al* (2003a) Porsolt`i sundujumiskatses püsisid LAL hiired olulisel määral rohkem liikumatutena. Sellist käitumist Porsolt`i testis peetakse stressi, lootusetuse ja depressiivsuse tunnuseks; SAL hiired aga ujusid aktiivselt, üritades stressisituatsioonist vabaneda. Peab märkima, et kuigi agressiooni tõus on suureks ühiskondlikuks probleemiks, on teatav agressiivsus ja aktiivne reageerimine enesekaitseks vägagi kohane käitumisviis nii loomariigis kui ka teatud inimühiskonna korralduste ning spetsiifiliste situatsioonide puhul. Kuna LAL hiired on “püsielaniku sissetungija” testis tunduvalt vähemagressiivsed kui see on iseloomulik sama liini keskmisele hiirele, modelleeritakse LAL hiirtega patoloogiliselt madalat agressiivsust. Seni pole täpset selgust, millistele inimestele iseloomulikele diagnostilistele seisunditele LAL hiirte käitumuslik profiil täpsemalt vastab, kuid näiteks Veenema *et al* (2003b) oletavad, et LAL loomad võiksid olla potentsiaalne depressioonimudel. Seni pole aga LAL hiiri depressioonimudelina valideeritud, sest pole teada, kuidas LAL hiired reageerivad antidepressantidele. On aga selge, et peale erineva agressiivsuse taseme esindavad need kaks hiireliini kahte vastandlikku toimetulekustiili.

1.2.2.2 SAL ja LAL hiireliinid erinevad hüpotaalamo-hüpofüüsaar-adrenokortikaal- (HPA-) telje regulatsiooni poolest

Veenema *et al* (2003a) näitasid, et sundujumise stressisituatsioonis vallandub LAL hiirtel tunduvalt kõrgem ning pikaajalisem kortikosterooni sekretsioon kui SAL loomadel. Lisaks leiti, et LAL hiirte mineraalkortikoidi retseptori (MR) mRNA ekspressioon hippokampuses ning kortikotropiini vabastava hormooni mRNA hüpotaalamuses püsis veel ka 24 tundi pärast sundujumise stressorit statistiliselt oluliselt kõrgem kui SAL loomadel; normaaltingimustes nende mRNA-de ekspressioonis liinidevalemisi erinevusi ei leitud. LAL hiirte basaalne AKTH (adrenokortikotroopne hormoon) tase on märkimisväärselt madalam kui SAL hiirtel, mis viitab, et LAL hiired on AKTH suhtes tundlikumad (*adrenocortical hyperresponsiveness*). Veenema *et al* (2003a) tulemused viitavad kokkuvõttes sellele, et LAL hiirte füsioloogiline reaktsioon stressile on intensiivsem ja pikaajalisem kui SAL hiirtel.

1.2.2.3 SAL ja LAL liini hiirtel on erinev 5-HT-süsteemi regulatsioon

Korte *et al* (1996) olid esimesed, kes näitasid, et 5-HT 1A retseptori sidumisvõime ning ekspressioon LAL loomade dorsaalses hippokampuses hammaskääru (GD, *gyrus dentatus*) ja CA1 piirkonnas on märkimisväärselt madalam kui SAL loomadel. Feldker *et al* (2003a) kinnitasid sama tendentsi *Northern blot* analüüsiga, näidates, et LAL hiirtel on hippokampuses 5HT 1A retseptori ekspressioon 1,9 korda madalam. Van Riel *et al* (2002) kasutasid *in situ* hübriidatsiooni hippokampuse koelõigul ning leidsid, et 5-HT retseptori 1A mRNA ekspressioon on madalam üksnes LAL hiirte hippokampuse CA1 piirkonnas. Samas uurimuses näidati, et lisaks 5HT 1A retseptori alanenud ekspressioonile on LAL hippokampustes vähenenud 5-HT poolt esilekutsutav membraani hüperpolarisatsioon. Van Riel *et al* (2002) järeldasid, et LAL hiirtel on hippokampuse 5-HT-ergilises süsteemis vähenenud ka funktsionaalsed reaktsioonid. Samas uurimuses leiti, et LAL loomadel tõusis stressisituatsioonis vereplasma kortikosterooni tase ning see oli pöördvõrdelises seoses 5-HT poolt indutseeritud reaktsioonidega. Seetõttu võib 5-HT-ergilise süsteemi ebafunktsionaalsus olla tingitud kroonilisest hormonaalsüsteemi häirumisest. Samas võib stressitundlikkus olla tingitud ka madalamast 5HT 1A retseptori tasemest ja aktiivsusest, sest ka 5HT 1A retseptori puudulikkusega hiired on väga stressitundlikud (Toth, 2003).

1.2.2.4 SAL ja LAL hiired erinevad testosterooni metabolismi poolest

Compaan *et al* uurimisgrupp on SAL ja LAL loomade testosterooni taset ja metabolismi võrreldnud erinevates arengufaasides ja erinevaid katseskeeme kasutades (Compaan *et al*, 1992; 1993a; 1993b; 1994). Kokkuvõttes on leitud, et isas-suguhormoon on SAL loomade agressiivsuses oluline osaline. Näiteks Compaan *et al* (1994) demonstreerisid, et isastel SAL hiirtel on plasma testosterooni tase juba embrüo- ja vastsündinuas kõrgem kui LAL hiirtel samas arengufaasis. Testosterooniga seoses on läbi viidud ka üks väheseid uurimusi, mis puudutab emaseid SAL ja LAL hiiri. SAL ja LAL liinide selektsioonil hinnatakse üksnes mõlema liini isaseid hiiri, sest normaalolekus emased SAL ega LAL hiired võõra sissetungija testis üldjuhul ei ründa. Compaan *et al* (1993b) manustasid emastele vastsündinud SAL ja LAL hiirtele testosterooni propionaati ning eemaldasid munasarjad. Sellise manipulatsiooni tagajärjel kasvas üksnes SAL emaste hiirte agressiivsus; LAL emaste hiirte agressiivsus püsis liinile omasel tasemel.

1.2.2.5 LAL ja SAL hiirte hippokampuses on leitud struktuurseid erinevusi

Sluyter *et al* (1994) näitasid histoloogiliselt, et LAL loomadel on suuremad intrapüramidaalsed sammalkiud (*intra- and infrapyramidal mossy fiber terminal fields – IIPMF*). Sammalkiud on hippokampuse hammaskääru (GD) piirkonnas asuvate neuronite granulaarrakkude aksonid, mis innerveerivad hippokampuse CA3 piirkonna püramidaalrakkude dendriite. Analoogsetele morfoloogilistele erinevustele LAL ja SAL loomade hippokampuses viitavad Feldker *et al*, (2003a ja 2003b) tulemused, kes leidsid SAGE't (*Serial analysis of gene expression*) ja *GeneChip*'i kasutades, et LAL loomadel on hippokampuses kõrgem tsütoskeletiga seotud geenide ekspressioon. Suuremaid IIPMF-e seostatakse kõrgema õppimisvõimega ning selle alusel peaks LAL loomade õppimisvõime olema suurem. Seda, et LAL hiirtel on parem mälu ja suurem õppimisvõime oletavad ka Sluyter *et al* (2003). Sellegipoolest on agressiivsete ja mitteagressiivsete hiirte kognitiivsete võimete osas vasturääkivaid tulemusi, näiteks on leitud, et agressiivsete hiirte õppimisvõime on kõrgem nendes ülesannetes, kus tuleb õppida karistust vältima (*two-way active avoidance task*); mitteagressiivsed loomad on aga osutunud nutikamateks labürintides (*Hebb-Williams type maze tasks*) (Sluyter *et al*, 1994). Moragrega *et al* (2003) aga leidsid hoopis, et nii SAL kui LAL hiirte ruumilist õppimist mõjutasid rohkem majutamisviis ja nikotiini manustamine kui genotüüp.

1.2.2.6 SAL ja LAL hiired sobivad inimese düssotsiaalse käitumise modelleerimiseks

Sluyter *et al* (2003) analüüsisid mitmeid parameetreid, et võrrelda, kuivõrd modelleerivad SAL loomad inimese düssotsiaalset käitumist ning vastupidi: kuivõrd sarnanevad LAL isashiired introvertsetele passiivse toimetulekustiiliga meestele. Sluyter *et al* (2003) töid välja mitmeid parameetreid: 1) nii SAL hiired kui düssotsiaalsed mehed käituvad agressiivselt väga erinevates situatsioonides; peale territooriumi kaitsmise esineb ka vastavalt naiste või emaste hiirte vastu suunatud agressiivsust; 2) SAL loomade pesakonnad on suuremad kui LAL hiirtel ning agressiivsetel meestel on rohkem järeltulijaid kui mitteagressiivsetel meestel; 3) düssotsiaalsete meeste intelligentsuskoefitsient (IQ) on keskmisest madalam ning SAL loomade õppimisvõime on madalam kui LAL hiirtel; 4) SAL loomad kalduvad alkoholisõltuvusele, nagu ka düssotsiaalsed mehed. Sluyter *et al* (2003) tegid järelduse, et SAL hiired sarnanevad märkimisväärselt meestega, keda iseloomustati püsiva elukestva düssotsiaalse käitumisstiili poolest (*persisters*) ning LAL hiirtel on ühisjooni meestega, kel kunagi elu jooksul pole ette tulnud agressiivseid episoodide (*abstainers*). SAL loomade sarnasus düssotsiaalsete meestega on suurem, kui LAL loomade ühisjooned mitteagressiivsete meestega. Kokkuvõttes leiavad Sluyter *et al* (2003), et SAL liini hiired on sobiv loomudel inimese düssotsiaalse käitumise modelleerimiseks.

1.2.2.7 SAL ja LAL loomade hippokampuse geeniekspressiooni on varem võrreldud SAGE meetodil ja *GeneChip* õga.

SAL ja LAL loomade hippokampust on seni uuritud väga mitme erinevate meetoditega. Avaldatud on füsioloogilisi leide (Sluyter *et al*, 1994; Korte *et al*, 1996; Van Riel *et al*, 2002, Veenema *et al*, 2003a) ning võrreldud SAL ja LAL hiirte hippokampuse geeniekspressiooni mRNA tasemel (Feldker *et al*, 2003a; Feldker *et al*, 2003b).

Feldker *et al* on SAL ja LAL loomade hippokampuse geeniekspressiooni uurinud nii SAGE meetodil (2003a) kui geenikiipi (2003b) kasutades. SAGE analüüsil sekveneeriti 63 286 *tag* i, millest 29 727 olid unikaalsed. Leiti 191 geeni, mille ekspressioon SAL ja LAL hiireliinide vahel erines; neist 126 geeni ekspresseerusid kõrgemalt LAL hiirtel ning 65 geeni kõrgemalt SAL hiirtel. Leitud 191st erinevalt ekspresseerunud geenist identifitseeriti tuntud mRNA järjestusi esindavatena ainult 27% (51 *tag* i). Feldker *et al* (2003a) kinnitasid SAGE tulemusi, näidates viie erineva geeni (tubuliini, kofiliini, tropomüosiini, raf-iga seotud onkogeeni ja ERK2) üleekspressiooni LAL loomadel ka *in situ* hübriidsatsiooniga hippokampuse koelõigul.

Affymetrix`i *GeneChip*`iga, millel oli kokku 12 488 oligonukleotiidset järjestust, tuvastasid Feldker *et al* (2003b) 121 geeni, mille ekspressioon osutus kõrgemaks LAL hiirtel ning vaid ühe geeni – *gas5* (*growth arrest specific 5*) – mille ekspressioon osutus kõrgemaks SAL hiirtel. *GeneChip*`i alusel on LAL hiirtel kõrgemalt ekspresseerunud geenide seas tsütoskeleti valke kodeerivad geenid (tubuliini erinevad alatüübid, kofiliin, aktiin, dünaktiin); signaali ülekandega seotud geenid (GABA ja glütsiini transporter, glutamaadireseptor kainaat-5, 14-3-3 dzeeta); metabolismiga seotud geenid (laktaadi dehüdrogenaas, püruvaadi kinaas, aspartaadi süntetaas, vakuolaarse prootonpumba subühik, tsütokroom c oksüdaasi subühik jt) ning mitmed teised nagu *Dad1* (*defender against cell death 1*), *captain*, oksüdatiivse stressi poolt indutseeritav valk jt.

GeneChip`il saadud tulemusi kinnitasid Feldker *et al* (2003b) *in situ* hübriidsatsioonil hippokampuse koelõigul. Seda, et erinevate geeniekspressiooni mõõtvate meetoditega on võimalik saada erinevaid tulemusi, näitavad *in situ* hübriidsiooni ja *GeneChip*`i tulemuste võrdlus: näiteks *gas5* ekspresseerus geenikiibi andmetel SAL loomadel 7,8 korda kõrgemalt, *in situ* hübriidsatsioon näitas aga 1,8-2,3 kordset ekspressiooni tõusu SAL loomade hippokampuse erinevates piirkondades. Samuti ekspresseerus glutamaadireseptor kainaat-5 geenikiibi andmetel LAL loomade hippokampustes 1,5 korda intensiivsemalt, transkriptsioonifaktor IIIH 1,7 korda intensiivsemalt ja guaniin-nukleotiidiga seonduv valk 1,6 korda intensiivsemalt. *In situ* hübriidsatsioonil nähti kõigi kolme geeni puhul LAL hiirtel 1,1-kordset tõusu vaid ühes (GD) kolmest hippokampuse piirkonnast.

Feldker *et al* (2003a; 2003b) leidsid, et nii kiibi kui SAGE andmetel esineb LAL loomadel tsütoskeleti valke kodeerivate geenide kõrgem ekspressioon. Feldker *et al* (2003b) pakkusid oma andmete põhjal välja järgmise mudeli: *gas5* madal ekspressioon LAL hiirte hippokampuses võib olla seotud võimendunud tsütoskeleti valkude ekspressiooniga. Kuna ka varem on leitud, et LAL hiirte hippokampuses asuvad sammalkiud tihedamalt ning on pikemad, võib oletada, et LAL hiirte hippokampuses on võimendunud tsütoskelett ning aksonite väljakasv. Võimalik, et SAL ja LAL hiirte erinevad käitumuslikud reaktsioonid on vähemalt osaliselt tingitud nende loomade hippokampuse erinevast struktuurilisest ülesehitusest.

1.3 SUBTRAKTIIVNE HÜBRIDISATSIOON (SH)

Subtraktiivne hübridisatsioon (SH) on tundliku eristusläävega PCR-l põhinev hübridisatsioonitehnika, mis võimaldab tuvastada erinevusi kahe DNA populatsiooni vahel (Diachenko *et al*, 1996). Algselt arendati subtraktiivse hübridisatsiooni meetod välja kahe genoomse DNA populatsiooni võrdlemiseks (Lisitsyn *et al*, 1993) ning seda rakendati palju näiteks erinevate mikroobigenoomide võrdlemiseks. Praeguseks välja töötatud protokollid on valdavalt mõeldud cDNA populatsioonide võrdlemiseks.

SH meetodit on kasutatud mitmetes erinevates valdkondades. Väga palju avastusi on tehtud vähi- ja normaalse koe rakkude cDNA võrdlemisel (Ji *et al*, 2003; Yokota *et al*, 2004). SH meetodil on saadud uut infot närvisüsteemi funktsioneerimise ja arengu kohta (Zheng *et al*, 2000; Feng *et al*, 2004), aga ka teiste normaalset füsioloogiat ja patoloogiat puudutavate nähtuste kohta (Larose *et al*, 2001; Risoan *et al*, 2002; Fujii *et al*, 2002).

1.3.1 SUBTRAKTIIVSE HÜBRIDISATSIOONI ÜLDPÕHIMÕTE

Geeniekspressiooni erinevuste määramiseks SH meetodil sünteesitakse esmalt mõlemast võrreldavast mRNA populatsioonist cDNA-d. Seda populatsiooni, milles erinevalt ekspresseeruvaid gene soovitakse tuvastada, nimetatakse testriks. Teist, nn referents-cDNA populatsiooni, millega esimest võrreldakse, nimetatakse draiveriks. Tester- ja draiverpopulatsioonid segatakse kokku ning lastakse hübriseeruda. SH meetodil on mitmeid variatsioone (Hubank ja Schatz, 1994; Diachenko *et al*, 1996), ent üldpõhimõte on erinevatel meetoditel ühine: pärast kahe populatsiooni hübriseerumist kõrvaldatakse hübriseerunud ehk kaheaheelalised järjestused. Üheaheelalisteks jäänud cDNA-d esindavad spetsiifilisi gene, mis ekspresseeruvad kas ainult tester- või draiverkoes. Testerpopulatsiooni järjestuste otsesse on eelnevalt ligeeritud adapterid, mis on spetsiifiliste praaimerite seondumisjärjestused ning võimaldavad testerjärjestusi pärast hübridisatsiooni üles amplifitseerida.

Seega, subtraktsioon (*subtraction*; eesti keeles “lahutamine” või “eraldamine”) seisneb käesoleva meetodi puhul selles, et kui huvialusest cDNA populatsioonist (tester) lahutada see ühisosa, mis tal on võrreldava referents-cDNA populatsiooniga (draiver), jäävad järele need transkriptid, mis esindavad huvialuses populatsioonis (testris) unikaalselt ekspresseeruvaid järjestusi.

1.3.2 SUPRESSIOONI EFEKTIL PÕHINEV SUBTRAKTIIVNE HÜBRIDISATSIOON (SSH)

On kaks peamist PCR-il baseeruvat subtraktsiooni meetodit: RDA (*representational difference analysis*) ja supressioon-PCR'i reaktsiooni sisaldav subtraktiivne hübridisatsioon (SSH, *suppression subtractive hybridization*). RDA kasutab mitut subtraktsiooni faasi (Hubank ja Schatz, 1994); SSH puhul on subtraktsioon saavutatav ühe etapina (Andersson *et al*, 2002). SSH puhul kombineeritakse hübridisatsioonikineetika efektidega “allasuruv” PCR-i fenomen, mis saavutatakse sellega, et rohkeltesinevatel järjestustel on spetsiifilise protokolliga järgimisel mõlemas otsas pikemad kordusjärjestused kui unikaalsetel transkriptidel (Diachenko *et al*, 1996). Seetõttu amplifitseeritakse supressioon PCR käigus eelistatult üles just unikaalsed järjestused.

1.3.3 SH MEETODI EELISED JA PUUDUSED

1.3.3.1 Subtraktiivse hübridisatsiooni eelised:

- SH võimaldab leida uusi kandidaatgeene.
- SH võimaldab detekteerida väga väikese koopiaarvuga geene.
- SH läbiviimiseks piisab väga vähesest mRNA hulgast.

1.3.3.2 Subtraktiivse hübridisatsiooni puudused:

- SH meetodiga ei saa tõestada, et erinevust ei eksisteeri.
- Lõplik tulemuse kinnitamine nõuab mingisugust kvantitatiivset meetodit, nagu näiteks kvantitatiivne PCR või *Northern blot*.
- Paljud transkriptid jäävad erinevatel põhjustel kõrvale (mõned geenid, mida esineb üksikutes koopiates võivad algmaterjalist välja jääda; kõiki kloone ei suudeta enamasti blottida ega sekveneerida; ei detekteerita erinevusi transkriptides, kus puudub amplifitseeritav *RsaI* otstega fragment).

1.4 TÖÖ EESMÄRK

Käesolev töö on osa suuremast projektist, mille käigus on kavas teostada subtraktiivne hübridisatsioon veel kahe agressiivsusega seotud olulise ajuosaga (amügdala ja frontaalkoor) ning kinnitada saadud tulemusi kvantitatiivse PCR-i meetodil.

1.4.1. Käesoleva töö eesmärgiks on leida subtraktiivse hübridisatsiooni (SH; *subtractive hybridization*) meetodil madalaläviseid erinevusi ning uusi kandidaatgeene agressiivsete (SAL) ja mitteagressiivsete (LAL) hiirte hippokampuste geeniekspressioonis.

1.4.2. Teiseks eesmärgiks on kontrollida saadud SH tulemusi *dot blot* analüüsil.

1.4.3. Kolmandaks eesmärgiks on võrrelda SH tulemusi varasemate leidudega SAL ja LAL loomade hippokampuste geeniekspressiooniga seoses, mis on saadud teiste meetoditega (SAGE, *GeneChip*, *in situ* hübridisatsioon).

2 MEETOD

2.1 KATSELOOMAD

Katseloomadeks olid 17 SAL ja 17 LAL liini hiirt. SAL ja LAL liini hiiri säilitatakse Hollandis Groningeni ülikoolis. Viiekuustelt loomadelt eraldati kolm peajastruktuuri: hippokampus, amügdala ja frontaalkoor. Ajuosad külmutati koheselt vedelas lämmastikus.

2.2 RNA ERALDAMINE

Ajuosad transporditi Hollandist Eestisse kuival jääl. Totaalne RNA eraldati *RNeasy* midi kitiga (Qiagen, Hilden, Saksamaa). RNA kvaliteet kontrolliti agarosgeelil ja kontsentratsioon määrati spektrofotomeetriga.

2.3 SUBTRAKTIIVNE HÜBRIDISATSIOON

Subtraktiivne hübridisatsioon viidi läbi Clontech'i supressiooni efektil põhinevat PCR-i sisaldava subtraktiivse hübridisatsiooni protokolliga kasutades (*PCR-Select cDNA Subtraction Kit*; Clontech, Palo Alto, CA).

2.3.1 TESTER- ja DRAIVER-cDNA VALMISTAMINE

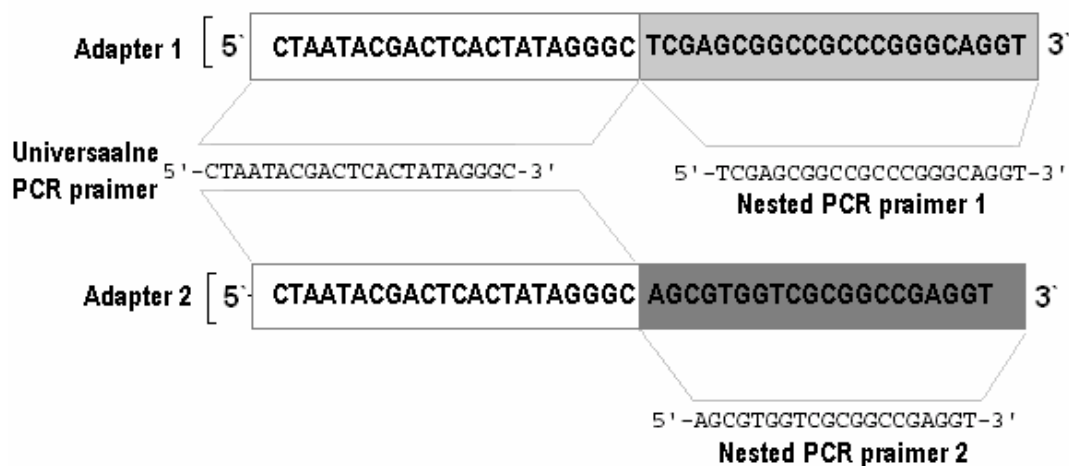
2.3.1.1 cDNA sünteesimine ja restrikteerimine

Kaheaahelaline cDNA sünteesiti LAL ja SAL hippokampuste totaalsest mRNA-st kasutades SMART cDNA sünteesi protokolliga (Clontech, Palo Alto, CA). Algmaterjaliks võeti 500 ng totaalset RNA-d ning sellest sünteesiti kaheaahelaline eksponentsiaalses amplifikatsioonifaasis cDNA vastavalt SMART protokollile. Seejärel restrikteeriti mõlemad cDNA-d ensüümiga *RsaI*. See on nelja-aluspaarilist järjestust 5'-GTAC-3' lõikav endonukleas, mis jätab cDNA keskmiselt 256 aluspaari pikkusteks tõmpide otstega fragmentideks.

2.3.1.2 Adapterite ligeerimine

Järgnevalt jagati tester-cDNA kahte ossa (vt skeem, joonis 2) ning mõlemale portsjonile ligeeriti erinev adapter (adapter 1 ja adapter 2 järjestused vt joonis 1). Adapteritel puuduvad 5'-fosfaadid, ning iga cDNA 5'-otsa kinnitub oma 3'-OH rühma kaudu vaid üks adapter. Mõlemad adapterid on 44 aluspaari pikkused ning neil on 5'-otsas 22 aluspaari pikkune identne järjestus; adapterite ligatsiooni järgselt jääb see järjestus cDNA molekuli 5'-otsa ning pärast üheaahelaliste otste täissünteesimist on see ühtlasi universaalse praimeriseondumiskoht. Sisemine, 3'-poolne järjestus, mis ligeeritakse vahetult cDNA 5'-otsa külge, on mõlemal adapteril erinev ning see kujutab endast *nested* praimeriseondumissaiti.

Adapterid ligeeriti ka kontroll-SAL ja -LAL cDNA proovidele, millega viidi läbi kõik protseduurid, välja arvatud subtraktiivne hübridisatsioon. Nende cDNA populatsioonide puhul lisati ligatsioonisegusse korraga mõlemad adapterid. Selle tagajärjel peaks 1/3 cDNA järjestustest olema adapter 1, 1/3 järjestustest adapter 2 ning 1/3 järjestustest mõlemad adapterid. Järgnevate protseduuride kestel säilitavad need cDNA populatsioonid oma algupäraseid järjestuste proportsioonid; edasises tekstis nimetatakse neid proove vastavalt “SAL totaalne cDNA populatsioon” ja “LAL totaalne cDNA populatsioon”.

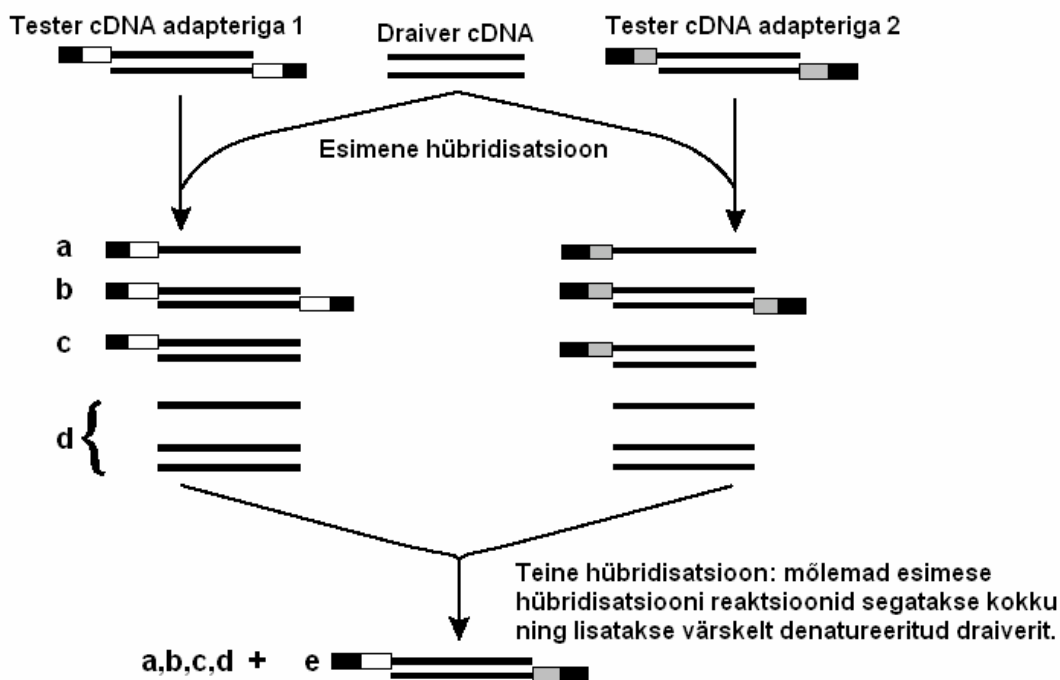


Joonis 1. Adapterite järjestused. Adapteritel puuduvad 5`-fosfaadid ning iga cDNA 5`-otsa kinnitub oma 3`-OH rühma kaudu vaid üks adapter. Mõlema adapteri 5`-otsas on 22 aluspaari pikkune identne järjestus, adapterite ligeerumisel jääb see järjestus cDNA molekuli 5`-otsa ning pärast üksikahelaliste otste täissünteesimist on see universaalse praimerise seondumiskoht. Sisemine, 3`-poolne järjestus, mis ligeeritakse vahetult cDNA 5`-otsa külge, on mõlemal adapteril erinev ning see on *nested* praimerite seondumissait. Joonis 3 on tehtud Clontech`i protokollil illustratsiooni eeskujul (Clontech, Palo Alto, CA).

2.3.2 SUBTRAKTIIVNE HÜBRIDISATSIOON

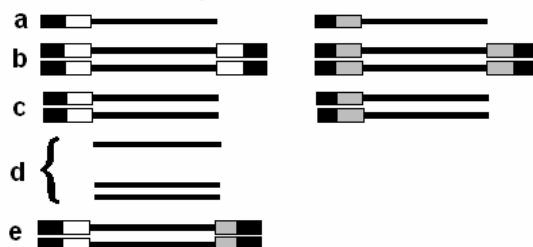
2.3.2.1 Esimene hübridisatsioon

Järgnevalt teostati kaks hübridisatsiooni. Esimesel hübridisatsioonis lisati mõlemale erinevatele adapteritega testerpopulatsioonile ülehulgas draiverit. Tekivad neli erinevat tüüpi molekuli (joonis 2: a, b, c ja d). Üheaaheliste adapteriga cDNA fragmentide hulgas (joonis 2: a) on proportsionaalselt tunduvalt rohkem unikaalseid järjestusi kui totaalses cDNA populatsioonis, sest enamik rohkelt esindatud cDNA fragmente leiab hübridisatsioonikineetika reeglite kohaselt (Diachenko *et al*, 1996) kiiresti komplementaarse partneri ja moodustab kaheaahelise hübriidi.



Joonis 2. Primaarne ja sekundaarne hübridisatsioon. Tester-cDNA jagatakse kahte ossa ning mõlemale portsjonile ligeeritakse erinev adapter. Esimesel hübridisatsioonil lisatakse mõlemale testerpopulatsioonile ülehulgas draiverit. Tekivad neli erinevat tüüpi molekuli (joonisel a, b, c ja d). Teise hübridisatsiooni puhul segatakse kokku kaks esmast hübridisatsioonisegu ning lisatakse ülehulgas värskest denatureeritud draiverit. Seekord tekivad uut tüüpi hübridid (joonisel e), millel on mõlemas otsas erinevad adapterid. Joonis 2 on adapteeritud Diachenko *et al* (1996) artiklist.

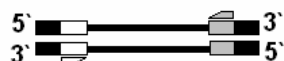
Pärast teist hübridisatsiooni sünteesitakse täis hübridide üheaheelised otsad: tulemuseks on 5 eri tüüpi cDNA molekulid:



1. PCR - supressioon PCR universaalse praimeriga, mis seondub mõlemale adapterile



2. PCR - nested praimeritega: eksponentsiaalselt amplifitseeruvad ainult need transkriptid, mil on otstes erinevad adapterid

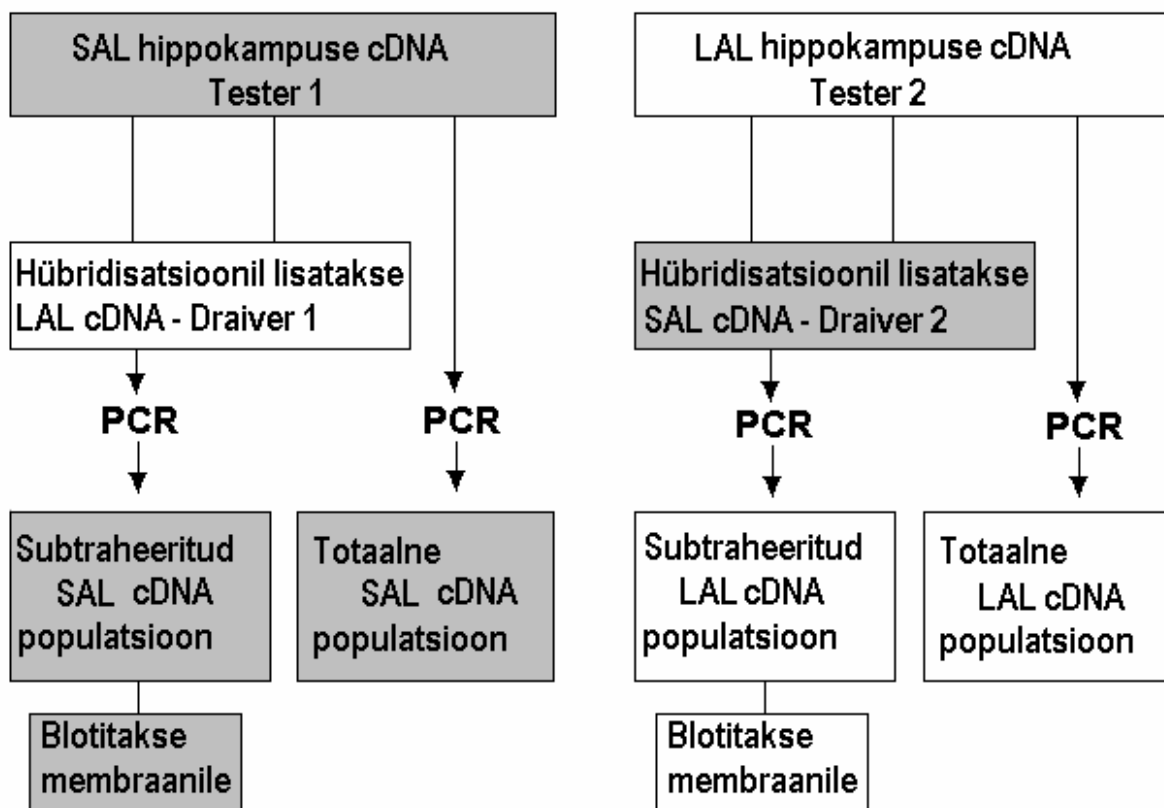


Joonis 3. PCR reaktsioonid. Pärast üheaheeliste otste täissünteesimist on diferentsiaalselt ekspresseerunud cDNA-del mõlemas otsas erinevad praimerite seondumiskohad. Pärast hübridisatsiooni viiakse läbi kaks spetsiifilist PCR-i reaktsiooni – primaarne ehk supressiooni efektil põhinev PCR ja sekundaarne ehk *nested* PCR. Mõlemad reaktsioonid soodustavad nende fragmentide amplifitseerumist, millel on otstes erinevad adapterjärjestused. Joonis 3 on adapteeritud Diachenko *et al* (1996) artiklist.

2.3.2.2 Teine hübridisatsioon

Teise hübridisatsiooni puhul segatakse kokku kaks esmast hübridisatsioonisegu ning lisatakse ülehulgas värskelt denatureeritud draiverit. Seekord tekivad uut tüüpi hübriidid (joonis 2: e), millel on mõlemas otsas erinevad adapterid. Need hübriidid saavad moodustuda ainult sellistest fragmentidest, mis esimese hübridisatsiooni käigus mõlemas testerpopulatsioonis üheaahelalisteks jäid. Need on molekulid, mille hulgas on proportsionaalselt veelgi rohkem testerpopulatsiooni unikaalseid transkripte esindavaid cDNA-sid. Edasised reaktsioonid viiakse läbi just selliste hübriidide üles amplifitseerimiseks.

Pärast üheaahelaliste otste täissünteesimist on diferentsiaalselt ekspresseerunud cDNA-del mõlemas otsas erinevad praimerite seondumiskohad (joonis 3). Testri ja draiveriga viidi läbi kahesuunaline “edasi” (*forward*) ja “tagasi” (*backward*) subtraktsioon, mis tähendab, et ühel juhul oli testriks SAL hippokampuse cDNA ja draiveriks LAL cDNA; teisel juhul oli testriks LAL cDNA ja draiveriks SAL cDNA (vt katseskeemi joonisel 4).



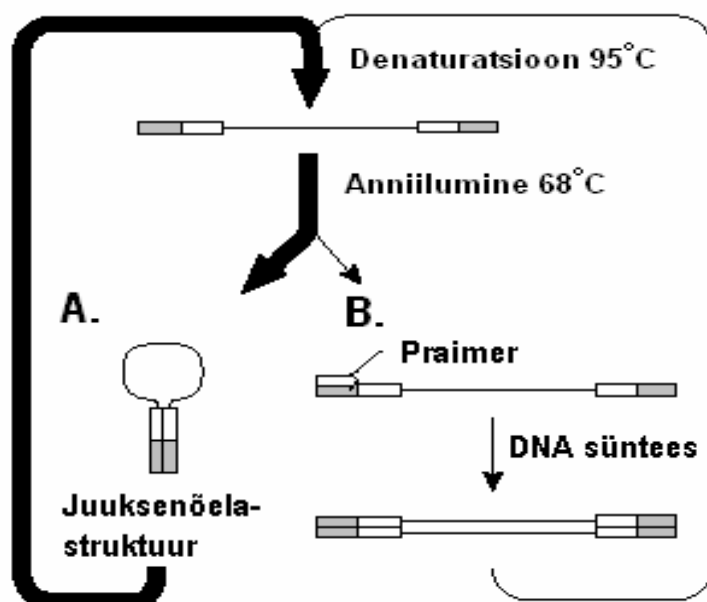
Joonis 4. Katseskeem. Testri ja draiveriga viidi läbi kahesuunaline subtraktsioon: ühel juhul oli testriks SAL hippokampuse cDNA ja draiveriks LAL cDNA; teisel juhul oli testriks LAL cDNA ja draiveriks SAL cDNA. Selleks, et välja selgitada, millised on tegelikud positiivsed kloonid, blotitakse subtraheeritud järjestused membraanile ning hübridiseeritakse nelja erineva märgistatud sondiga – mõlemast võrreldavast subtraheeritud populatsioonist valmistatud sondiga ning mõlemast võrreldavast totaalsest cDNA populatsioonist valmistatud sondiga.

2.3.3 SUPRESSIOONI EFEKTIL PÕHINEV PCR (*SUPPRESSION PCR*) JA *NESTED* PCR

Pärast hübridisatsiooni viiakse läbi kaks spetsiifilist PCR reaktsiooni – primaarne ehk supressiooni efektil põhinev PCR ja sekundaarne ehk *nested* PCR, mis mõlemad soodustavad tugevalt nende fragmentide amplifitseerimist, mil on erinevates otstes erinevad adapterjärjestused.

2.3.3.1 Supressiooni efektil põhinev PCR

cDNA fragmendid, millel on otstes erinevad adapterid, on mõlemas otsas 22 bp komplementaarne ala; nendel fragmentidel, millel on mõlemas otsas sama adapter, on erinevates otstes 44 bp komplementaarne ala. Supressioon PCR-l kasutatakse adapterite välimisele osale istuvat praimerit, mis on komplementaarne mõlema adapteri 5'-poolse järjestusega. Supressiooni efektil põhineva PCR-i põhimõte baseerub fenomenil, et sel juhul kui fragmendil on mõlemas otsas 44 bp komplementaarne ala, on 22 bp praimeril tunduvalt raskem konkureerida juuksenõelastruktuuride tekkimise vastu, mis pikkade otskordusjärjestustega transkriptist kergesti moodustuvad. Sellisel juhul seondub praimer oluliselt väiksema tõenäosusega ning fragmendi amplifitseerumine sünteesifaasi käigus on pärsitud (vt joonis 5: A). Nende fragmentide puhul, mil on erinevates otstes ainult 22 bp komplementaarsust, konkureerib praimer seandumissaidi pärast tunduvalt edukamalt ning juuksenõelastruktuure tekib oluliselt vähem. Supressiooni efektil põhinevat PCR on 1995. aastal patenteeritud (U.S. Patent #5, 565,340; *PCR suppression by inverted terminal repeats* (ITRs)). Supressioon-PCR-i kasutamise tõttu SH protseduuris nimetatakse meetodit ka pikemalt: supressiooni efektil põhinev subtraktiivne hübridisatsioon (*supression subtractive hybridization*, SSH).



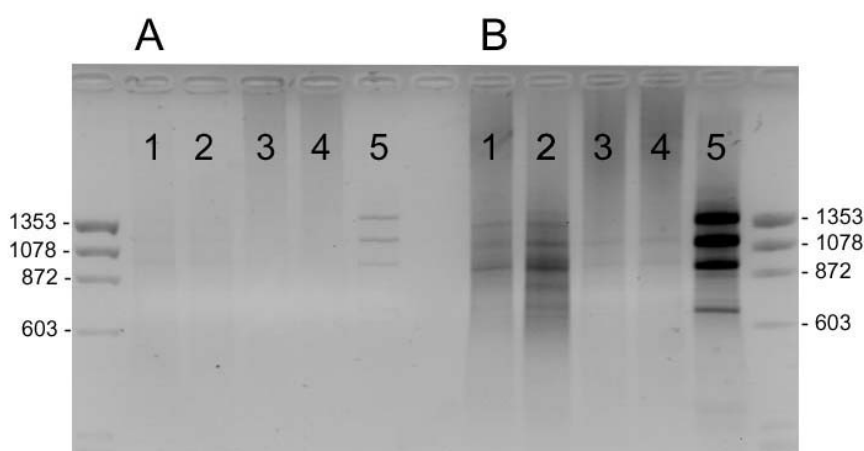
Joonis 5. Supressiooni efektil põhinev PCR. Juuksenõelastruktuuride teke, mis on tingitud pikkadest otskordusjärjestusest, pärsib praimerit seandumist ning surub alla PCR-i reaktsiooni amplifikatsioonile (A). Joonis 5 on modifitseeritud Clontech'i protokollide originaalskeemist (Clontech, Palo Alto, CA).

2.3.3.2 *Nested* PCR

Nested PCR-i käigus kasutatakse “sisemisi”, adapteri 3’-poolsele järjestusele istuvalid *nested* praimereid. Mõlemal adapteril on see järjestus erinev ning eksponentsiaalselt amplifitseeruvad ainult need fragmendid, millel on mõlemas otsas erinev adapter ning mille erinevatesse otstes seonduvad kaks erinevat *nested* praimerit (vt joonis 3).

2.3.4 PCR-I REAKTSIOONIDE SPETSIIFILISUSE KONTROLLIMINE

Supressiooni efektil põhineva ja *nested* PCR-i reaktsioonide spetsiifilisuse kontrollimiseks viidi samad reaktsioonid paralleelselt läbi subtraheeritud kontroll-cDNA-ga (vt joonis 6, rajad A5 ja B5).



Joonis 6. PCR-i reaktsioonide spetsiifilisuse kontrollimine agarosegeelil.

A. Primaarse ehk supressioon-PCR-i reaktsiooni produktid. **B.** Sekundaarse ehk *nested* PCR-i reaktsiooni produktid. **Rajad A1 ja B1:** SAL subtraheeritud cDNA; **rajad A2 ja B2:** LAL subtraheeritud cDNA; **rajad A3 ja B3:** SAL mittesubtraheeritud cDNA; **rajad A4 ja B4:** LAL mittesubtraheeritud cDNA; **rajad A5 ja B5:** subtraheeritud kontroll-cDNA. Äärmistes radades on marker Φ X174/HaeIII. PCR-i reaktsioonide spetsiifilisust kinnitab see, et kontroll-cDNA (rajad A5 ja B5) amplifitseerimisel ilmuvad Φ X174/HaeIII markerile vastavad signaalid.

2.3.5 SUBTRAKTSIOONI EFEKTIIVSUSE KONTROLLIMINE

Subtraktsiooni efektiivsust kontrolliti kvantitatiivse PCR-i reaktsiooniga, mis viidi läbi koduhoidja GAPDH-i (glütseeraldehüüd-3-fosfaat dehüdrogenaas) geenile vastavate praimeritega nii subtraheeritud kui totaalsel populatsioonil.

2.4 SEKUNDAARSETE PCR-I PRODUKTIDE KLONEERIMINE

Sekundaarse PCR-i produktid puhastati *QIAquick* PCR reaktsiooni puhastamise (Qiagen, Valencia, CA) kiti abil ning adapterid lõigati ära restriktasiga *Eag*I. Restriktsioonisegu kanti agarosegeelile ning puhastati ränimaatrikskolonnil (*QIAGEX II Gel Extraction Kit*;

Qiagen, Hilden, Saksamaa). Kleepuvate otstega fragmendid kloneeriti *SalI* saiti vektorisse *pGem11-Zf (+)* (Promega).

2.5 TRANSFORMEERIMINE JA MINIPREPARATSIOON

Ligatsioonisegu transformeeriti *E. Coli* kompetentsesse tüvesse DH5 α ning külvati ampitsilliini sisaldavale LB tardsöötmele. Edasiseks analüüsiks selekteeriti juhuslikkuse alusel 400 kolooniat. Plasmiidse DNA puhastamiseks kasutati Qiageni 96-kannulist (96-well) minipreparatsiooni kitti (Qiagen, Valencia, CA).

2.6 DOT BLOT ANALÜÜS

Seda, et SH meetodil saadud järjestused ka tõepoolest testerpopulatsioonis intensiivsemalt ekspresseeruvad, võimaldab kinnitada *dot blot* analüüs – subtraheeritud cDNA populatsioon sisaldab proportsionaalselt rohkem unikaalseid järjestusi kui totaalne cDNA populatsioon. Selleks, et välja selgitada, millised on tegelikud positiivsed kloonid, blotitakse subtraheeritud järjestused membraanile ning hübridiseeritakse nelja erineva märgistatud sondiga – mõlemast võrreldavast subtraheeritud populatsioonist valmistatud sondiga ning mõlemast võrreldavast totaalsest cDNA populatsioonist valmistatud sondiga (joonis 4). See protseduur võimaldab välistada valepositiivseid kloonid subtraheeritud populatsioonis (vt 2.8 positiivsete kloonide valikukriteeriumid).

PCR-i fragmentide amplifitseerimine ning kloonide ettevalmistamine viidi läbi Clontech'i positiivsete kloonide skriinimise kiti alusel (*PCR-Select Differential Screening Kit User Manual*; Clontech, Palo Alto, CA). Samast protokollist pärineb üldine katseskeem.

2.6.1 PCR-I FRAGMENTIDE AMPLIFITSEERIMINE

Kloneeritud PCR-i fragmendid amplifitseeriti üles universaalsete M13 praimeritega. PCR-i reaktsioon viidi läbi 100 μ l mahus; PCR-i amplikonide kvaliteeti kontrolliti agarosgeelil.

2.6.2 SPOTTIMISE METODOLOOGIA

PCR-i produktid aurutati koguseni 20 μ l ning lisati pooles mahus 0,6 M NaOH (lõpplahuses 0,3 M). Kloonid spotiti Hybond N+ nailonmembraanile Bio-Rad spotteriga (*VersArray ChipWriter Pro*). Iga kloon kanti membraanile neljas korduses, kloonidevaheline (tsentrist tsentrini) kaugus oli 0,75 mm. Positiivsete kontrolljärjestusena kasutati koduhoidjageenide GAPDH'i ja tsüklofülliini cDNA-d; negatiivse kontrollina kanti membraanile tühja *pGem11-Zf (+)* (Promega) kloneerimisvektori järjestus.

2.6.3 MÄRGISTATUD SONDI VALMISTAMINE.

Märgistatud sondi valmistamiseks kasutati Roche digoksigeniin-dUTP-ga märgistamise kitti (*DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I*; Roche Applied Science, Mannheim, Saksamaa). Digoksigeniin-dUTP (DIG-dUTP) on modifitseeritud nukleotiid,

mis PCR-i reaktsiooni käigus asendab edukalt dTTP-d. DIG-märgistatud DNA sondide valmistamiseks kasutati juhuslikke heksameerseid praimereid (*random primed DNA labeling technique*). Hübridisatsioonisondid valmistati mõlemast võrreldavast totaalsest cDNA populatsioonist (SAL totaalne sond ja LAL totaalne sond) ning mõlemast subtraheeritud cDNA populatsioonist (SAL subtraheeritud sond ja LAL subtraheeritud sond).

2.7 SONDIDE HÜBRIDISEERIMINE MEMBRAANILE JA SIGNAALIDE VISUALISEERIMINE

Märgistatud sondid hübridiseeriti membraanide 65°C juures üleöö, järgides Roche'i DIG-nukleotiidiga DNA märgistamise ja detekteerimise protokoll (Roche Applied Science, Mannheim, Saksamaa). Hübridiseeritud sondid detekteeriti immunoloogiliselt digoksigeniini antikehaga, mis seondub spetsiifiliselt modifitseeritud digoksigeniin-dUTP nukleotiidiga. Digoksigeniini antikehale on liidetud aluseline fosfataas (AP) ning antikeha visualiseerimiseks inkubeeriti membraane 1,5 tundi NBT/BCIP-ga; substraadiga, mis ensümaatilises reaktsioonis aluselise fosfataasiga annab visuaalselt detekteeritava värvussignaali.

2.8 POSITIIVSETE KLOONIDE VALIKUKRITEERIUMID

1. Subtraheeritud sond peab andma statistiliselt oluliselt kõrgema signaali kui referents-cDNA subtraheeritud sond.
2. Subtraheeritud sond peab andma statistiliselt oluliselt kõrgema signaali kui referents-cDNA totaalne sond.
3. Tester-cDNA totaalne sond ei tohi anda tugevamat signaali kui referents-cDNA totaalne sond.

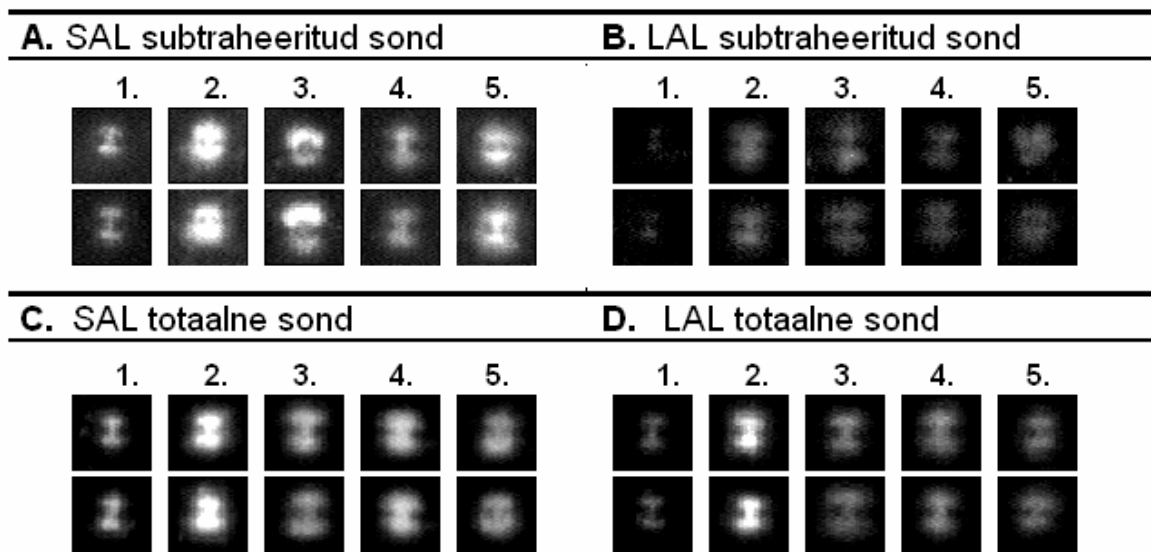
Statistiliselt olulised erinevused määrati Studenti t-testiga olulisuse nivool $p < 0,05$.

2.9 BLOTTIDE KVANTITEERIMINE

Dot blot id skaneeriti densitomeetriga (GS 710 *Calibrated Imaging Densitometer*, BioRad, München, Saksamaa) ning analüüsiti *Quantity One* tarkvaraga (BioRad, München, Saksamaa). Iga kloni puhul arvutati välja nelja kordus-spoti keskmine intensiivsus. Signaalid normaliseeriti membraani tausta ning koduhoidjageenide suhtes.

2.10 SEKVENEERIMINE

Positiivsed kloonid sekveneeriti ABI Prism Genetic Analyser ABI 310 DNA sekvenaatoriga (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Sekveneerimisreaktsioonis kasutati üht universaalset M13 praimerit



Joonis 7. Subtraheeritud kloonide analüüs *dot blot*-il SAL kloonide näitel.

A. SAL kloonid on hübridiseeritud SAL (tester) subtraheeritud sondiga; **B.** SAL kloonid on hübridiseeritud LAL (draiver) subtraheeritud sondiga; **C.** SAL kloonid on hübridiseeritud SAL (tester) mittesubtraheeritud totaalse sondiga; **D.** SAL kloonid on hübridiseeritud LAL (draiver) mittesubtraheeritud totaalse sondiga. Joonisel toodud kloonide nimed: **1.** gamma-amino-võihappe A (GABA-A) retseptori alfa2 subühik; **2.** *camki*-sarnase kinaasi homoloog (*Homo Sapiens*); **3.** *Solute carrier family 38 member 2*; **4.** karboksüpeptidaas E (CPE); **5.** osteopontiin (Opn).

2.11 POSITIIVSETE KLOONIDE IDENTIFITSEERIMINE

Positiivsete kloonide järjestused identifitseeriti NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) BLAST (*Basic local alignment search tool*) otsingusüsteemi kasutades (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)

3 TULEMUSED

Dot blot analüüsil tuvastati 37 erinevat geeni, mis ekspresseeruvad intensiivsemalt SAL hiirte hippokampustes ning 33 geeni, mis ekspresseeruvad tugevamalt LAL hiirte hippokampustes. Geenid jaotati funktsiooni alusel seitsmesse funktsionaalsesse kategooriasse (vt tabel 1): 1) signaali ülekandega seotud geenid; 2) rakutsükli osalevaid valke kodeerivad geenid; 3) kromatiiniga seotud geenid; 4) mRNA ja valkude protsessinguga seotud geenid; 5) raku energaetika ja metabolismiga seotud geenid; 6) valkude transpordiga seotud geenid; 7) tsütoskeleti ja aksonitega seotud geenid. Kaheksanda järjestuste grupi moodustasid tundmatu funktsiooniga transkriptid.

Tabel 1. Subtraktiivse hübridisatsiooni meetodil tuvastatud erinevused agressiivsete ja mitteagressiivsete hiirte hippokampuse geeniekspressioonis. Vasakus veerus on reastatud SAL hiirte hippokampustes intensiivsemalt ekspresseerunud geenid; paremas veerus LAL hiirte hippokampuses intensiivsemalt ekspresseerunud geenid. Geeni nimetuse taga nurksulgudes on ära toodud vastava järjestuse Geenipanga kood (*Gene bank accession number*).

| | SAL | LAL |
|---|--|---|
| 1. Signaali ülekandega seotud valgud | | |
| GABA- ja glutamaadisüsteemiga seotud valgud | Gamma-aminobutyric acid (GABA-A) receptor, subunit alpha 2 [AK036049] Solute carrier family 38, member 2 , mRNA [BC057454] | Glutamate receptor, ionotropic, AMPA2 (alpha 2) [NM_013540] Diazepam binding inhibitor (Dbi) mRNA [NM_007830] |
| Kaltsiumiga seotud signaaliülekanne valgud | Camki-like protein kinase homolog (Homo sapiens) [AK042107] Neurotrophic tyrosine kinase receptor (TrkC) mRNA [AY336094] | Mus musculus calmodulin-like 4 (Calml4) , mRNA [BC023475] |
| 2. Rakutsükli regulaatorid | | |
| Neurodegeneratsiooni vastased | Transducin-like enhancer of split 4, E(spl) mRNA [BC058525] Osteopontin (OPN) mRNA [AF515708] | Tgfb3 gene for transforming growth factor beta-3, exon 1 [AJ414642] Peptidyl-prolyl cis/trans isomerase NIMA-interacting 1 (Pin1) , mRNA [NM_023371] |
| Oksüdatiivse stressi vastased | | Macrophage migration inhibitory factor (Mif) , mRNA [NM_010798] Thioredoxin 2 (Txn2) , mRNA [NM_019913] |
| Apoptoosivastased | | Prothymosin alpha (Ptma) , mRNA [NM_008972] Defender against cell death 1 (Dad1) , mRNA [NM_010015] |
| Oletatav osalus rakutsükli | Mus musculus upregulated during skeletal muscle growth 5 , mRNA [BC024355] Son cell proliferation protein (Son) [AK019312] Glypican 5 mRNA [AK038547] | Mus musculus tetratricopeptide repeat domain 3TTC3 , mRNA [BC057207] |

Tabel 1 jätkub:

| | SAL | LAL |
|--|--|---|
| 3. Kromatiiniga seotud valgud | | |
| DNA reparatsioon | | Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2 , mRNA (Ube2v2) [BC029742] Similar to DNA double-strand break repair and V(D)J recombination protein XRCC4 (Homo sapiens) [AK088281] |
| Transkriptsioon | SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 5 (Smarca5), mRNA [NM_053124] | |
| 4. mRNA ja valkude protsessinguga seotud valgud | | |
| mRNA protsessimine | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2 [AK077716] Mus musculus fibrillarin , mRNA [BC003813] | RNA binding motif protein 8 (Rbm8), mRNA [NM_025875] |
| Valkude protsessimine | Carboxypeptidase E ; mRNA [AK013509] UDP-glucose glycoprotein: glucosyltransferase precursor (Uggt) mRNA [AF200359] | |
| 5. Raku energeetika ja metabolism | | |
| | | Mvp gene for vacuolar H⁺-ATPase 16-kDa proteolipid subunit [AB059662] Creatine kinase, brain (Ckb) , mRNA [NM_021273] |
| Elektrontransportahelas osalevad valgud | | NADH dehydrogenase 4 , mitochondrial, mRNA [BC020382] NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex 8 (Ndufb8) , mRNA [NM_026061] Mus musculus cytochrome b (Cytb) gene [AY057807] Cytochrome c oxidase III , mitochondrial [BC012020] |
| Lipiidide metabolism | Low density lipoprotein receptor-related protein 11 (Lrp11) , mRNA [NM_172784] Apolipoprotein D (apoD) mRNA [L39123] | Trans-2-enoyl thioester reductase of the intramitochondrial fatty acid synthesis (FAS) [NM_025297] |
| 6. Valkude transport | | |
| Eksotsütoos | N-ethylmaleimide sensitive fusion protein attachment protein alpha NAPA , mRNA [BC004804] | |
| Rakusisene transport | | Adaptor-related protein complex 3 (AP-3), sigma 1 subunit , mRNA [BC012656] Protein transport protein Sec23B [BC005464.1] |
| Endotsütoos | Adaptor-associated kinase (AAK) [XM_196384] | Vacuolar protein sorting 35 , mRNA [BC006637] |

Tabel 1 jätkub:

| | SAL | LAL |
|--|---|--|
| 7. Tsütoskelett ja aksonid | | |
| Tsütoskeleti ümberkorraldamisega seotud valgud | Mus musculus engulfment and cell motility 2, ced-12 homolog (<i>C. elegans</i>), mRNA [BC023954] Emerin (Emd) mRNA [XM_194094] Microtubule-associated protein 1 light chain 3 (Map1lc3), mRNA [NM_026160] | |
| Aksoniga seotud valgud | Brain acid soluble protein 1 (BASPI) cDNA; Neural axonal membrane protein NAP-22) homolog (<i>Rattus norvegicus</i>) [AK046868] | Cyclic nucleotide phosphodiesterase 1 (Cnp1), mRNA [NM_009923] |
| 8. Tundmatu funktsiooniga valgud | | |
| Oletatav funktsioon | Mus musculus cDNA: hypothetical DUF152/ Cytochrome c family heme-binding site containing protein [AK033565] Nucleolar protein 4 (Nol4) , mRNA [NM_199024] Mus musculus BTB (POZ) domain containing 2 (Btbd2), mRNA [XM_354550] Mus musculus cDNA, RIKEN clone: 2810430008 product: hypothetical ADP-ribosylation structure containing protein [AK013206] Mus musculus cDNA, RIKEN clone product: BA261N11.2.2 (novel protein isoform 2) [AK021096] | Mus musculus cDNA, RIKEN clone: 2410012P20 hypothetical 15.5 kDA protein homolog [AK010479] Mus musculus cDNA, product: Yippee protein (fragment) homolog [AK010201] PEST-containing nuclear protein , mRNA, with apparent retained intron [BC023320] |
| Tundmatud järjestused | Mouse DNA sequence from clone RP23-467P7 on chr 2 [AL512587] Mus musculus cDNA, RIKEN clone: C530016O13 [AK049659] Mus musculus adult male testis cDNA, RIKEN clone: 4930529F24 [AK015934] Mus musculus adult male hippocampus cDNA, RIKEN clone: C630002N23 [AK083095] Mus musculus cDNA RIKEN clone: E130105J22 [AK053528] Mouse DNA sequence from clone RP23-375G11 on chr X [AL672103] MRNA for KIAA1601 protein [AK129403] Mus musculus RIKEN cDNA C330017I15 gene [BC008544] Mus musculus BAC clone RP23-62F20 from 3, complete sequence [AC131746] Mus musculus, clone RP24-400C16, complete sequence [AC102705] | Mus musculus, RIKEN cDNA 2010300C02 gene, clone MGC:27999, mRNA [BC029089] Mus musculus cDNA, RIKEN clone:C130086A10 product: hypothetical protein [AK048604] Mus musculus RIKEN cDNA 6030443O07 gene [BC060679] Mus musculus adult male hippocampus cDNA, RIKEN clone: C630035F03 [AK049979] Mus musculus Chr 13, D13Wsu177e mRNA [NM_178605] Mus musculus chromosome 18, clone RP23-253J5 [AC102135] |

4 ARUTELU

4.1 GABA- ja GLUTAMAADI NÄRVIÜLEKANDESÜSTEEMID

SAL ja LAL hiirte hippokampuste geeniekspressiooni profiili mRNA tasemel on võrreldud mitmete erinevate meetoditega (*GeneChip*, SAGE (Feldker *et al*, 2003a ja 2003b) ning subtraktiivse hübridisatsiooniga käesolevas uurimuses). Kõikidel juhtudel on erinevusi tuvastatud vaid üksikute otseselt aju närviülekanDES osalevaid valke kodeerivate geenide ekspressioonis. On märkimisväärne, et kõik need geenid on seotud kas glutamaatergilise või GABA-ergilise närviülekanDE süsteemiga. Glutamaat on peamine neurotransmitter närvisüsteemi erutavates sünapSITES ning GABA on närvisüsteemi valdavaim pidurdav närviülekanDEaine. Glutamaatergilised ja GABA-ergilised sünapSIDS kokku moodustavad hinnanguliselt 90% korteksi neuronite vahelistest biokeemilistest ühendustest (Shulman *et al*, 1998).

SAL hiirtel üleekspressseerunud GABA-A retseptori alfa2 subühik kuulub retseptorvalkude hulka, mille kaudu avaldab mõju pidurdav neurotransmitter GABA; LAL hiirtel üleekspressseerunud diasepaami seondumise inhibiitor (DBI, *diazepam binding inhibitor*) valgul on võime toimida GABA-A retseptori antagonistina, seega vähendab DBI GABA-A retseptori aktiivsust ja GABA toimet. LAL hiirtel intensiivsemalt ekspressseerunud glutamaadiretseptorid AMPA-2 (*Gria2*; käesolevas uurimuses) ja kainaat-5 (Feldker *et al*, 2003b – 1,5-kordne tõus *GeneChip*il) on valgud, mille kaudu avaldab mõju erutav närviülekanDEaine glutamaat. On selgelt näha, et agressiivsetel hiirtel on üleekspressseerunud pidurdava neurotransmitteri GABA retseptor ning mitteagressiivsetel hiirtel on üleekspressseerunud erutava neurotransmitteri glutamaadi retseptorid ning GABA-A retseptori aktiivsust pärssiv DBI. On ilmne, et SAL ja LAL hiirte hippokampustes esineb erinevusi GABA-ergilises ja glutamaatergilises regulatsioonis.

GABA- ja glutamaatergilise süsteemiga on seotud veel SAL hiirte hippokampuses üleekspressseerunud geen *Scf38m2* (*solute carrier family 38, member 2*; uuemas kirjanduses sagedamini SNAT2), mis kuulub glutamiini neuronisse transportivate süsteem A transporterite hulka (Chaudry *et al*, 2002). Feldker *et al* (2003b) uurimuses ekspressseerus LAL hiirte hippokampustes intensiivsemalt GABA ja glütsiini vesikulaarne transporter (3,3-kordne ekspressiooni tõus *GeneChip*il) – vesiikuli membraanis asuv valk, mis kogub pidurdavad närvitransmitterid sünaptilistesse põiekestesse.

4.2 RAKU ENERGEETIKA ja METABOLISMIGA SEOTUD GEENID

Üheks kõige selgemaks leiuks käesolevas töös on see, et ainult LAL hiirtel ekspressseerus intensiivsemalt mitmeid metabolismi ja energeetikaga seotud gene. Varasemad tööd (Feldker *et al* 2003a; 2003b) pole sellist seost välja toonud, ehkki LAL hiirtel üleekspressseeruvates geenides esineb kokkulangevusi. Nii SH meetodil käesolevas töös kui SAGE analüüsil (Feldker *et al*, 2003a) ilmnES LAL hiirtel kõrgem kreatiini kinaasi ekspressioon; samuti ekspressseerus mõlemas uurimuses LAL hippokampuses tugevamalt NADH ubikvinooni oksidoreduktaasi subühik. Kreatiini kinaas katalüüsib fosfaadi ülekannet ATP-lt fosforüleeritavatele substraatidele. NADH ubikvinooni oksidoreduktaas paikneb mitokondri sisemembraanis ning osaleb elektronide transpordil NADH⁺ilt hingamisahelale.

Kolmas järjestus, mis kodeerib raku energietikas osalevat valku on tsütokroom c oksüdaas. Feldker *et al* (2003b) *GeneChip*´il andis LAL hiirte hippokampuses oluliselt tugevama signaali tsütokroom c oksüdaasi VIIc subühik. Käesolevas töös osutus üheks LAL loomadel üleekspressseerunud klooniks tsütokroom c oksüdaasi III subühik. Tsütokroom c oksüdaas on elektrontransportahela viimane lüli, mis kannab elektronid hapnikule. Subtraktiivse hübriidatsiooni andmetel osutus LAL hiirtel üleekspressseerunuks ka vakuolaarse prootonpumba (*vacuolar H⁺-ATPase*) 16 kDa proteolipiidne subühik; sama valguga V0 subühiku ekspressiooni tõusu LAL hiirtel nägid Feldker *et al* (2003b) *GeneChip*´il.

Lisaks ekspresseerus käesolevas uurimuses LAL hiirte hippokampuses intensiivsemalt veel üks hingamisahela tasandil raku energietikaga seotud geenijärjestus: tsütokroom b (Cytb) ning lipiidide metabolismis osalev 2-enoüül tioester reduktaas (varem tuntud kui Nr1f1 – tuumaretseptoriga seonduv faktor 1).

Erinevate uurimuste tulemusi kõrvutades on ilmne, et LAL hiirte hippokampuses on raku energietikaga seotud geenid üleekspressseerunud.

4.3 LIPIIDIDE METABOLISMIGA SEOTUD GEENID

LAL hiirtel on üleekspressseerunud mitmed geenid, millel on osalus raku energietikas mitokondri tasandil. Ka ainus LAL hiirtel lipiidide metabolismis osalev valg 2-enoüül tioester reduktaasil on kriitiline roll rasvhapete sünteesis mitokondris. (Miinalainen *et al*, 2003). Seevastu SAL hiirtel on üleekspressseerunud kaks geeni, mis on otseselt seotud lipiidide transpordiga: LDL retseptoriga seotud retseptor 11 (Lrp11) ja apolipoproteiin D (ApoD). Lrp11 kuulub LDL (*Low Density Lipoprotein*) retseptorite perekonda. LDL retseptorid on peamiselt tuntud kolesterooli transportijatena; tegelikult on igal LDL retseptori perekonna valgul mitmeid erinevaid lipiidseid ligandeid, mida transporditakse rakku retseptor-vahendatud endotsütoosiga. Lrp11 täpsed ligandid pole praeguseks teada (Chung ja Wasan, 2004). Apolipoproteiin D (ApoD) on glükoproteiin, mis ei ole teiste apolipoproteiinidega sarnane ei järjestuse homoloogia ega struktuuri poolest. Pigem kuulub ApoD lipokaliinide (*lipocalin*) perekonda, mille liikmed transpordivad väikseid hüdrofoobseid ligandeid. Kõrgenenud ApoD taset närvisüsteemis on seostatud mitmete patoloogiliste sündroomidega, nagu skisofreenia, Alzheimeri tõbi, bipolaarne meeleoluhäire ja toksiline närvikahjustus. *In vitro* on näidatud, et ApoD seob kolesterooli, steroidhormoone nagu progesteroon ja pregnenoloon, bilirubiini ja arahidoonhapet. Senini pole aga täpselt näidatud suudetud, millised on ApoD füsioloogilised ligandid ja spetsiifilisemad funktsioonid (Thomas *et al*, 2003).

4.4 RAKUTSÜKLIGA SEOTUD GEENID

SAGE analüüsi tulemuste alusel esitasid Feldker *et al* (2003a) teooria, et rakutsükli võimendavatel geenidel on LAL hiirte hippokampuses oluline osa; *GeneChip*´i (Feldker *et al*, 2003b) andmete analüüsil jäi see teooria välja. Feldker *et al* (2003a) leidsid, et LAL hiirtel ekspresseerub SAGE andmetel proportsionaalselt palju kaltsiumi poolt vahendatud signaalirajaga seotud gene, nagu erinevad kalmoduliinigeenid, kaltsiumi siduv valg A11,

CaM jt. Ka subtraktiivse hübriidisatsiooni meetodil osutus LAL hiirtel üleekspressioneerunud positiivseks klooniks Calm14 (kalmoduliinisarnane geen 4), samas SAL hiirtel üleekspresseerus *camki*-sarnane kinaas (CKLiK). Seetõttu ei ole käesolevate andmete alusel võimalik teha järeldusi kaltsiumiga seotud signaaliradade erineva regulatsiooni kohta nende hiirte hippokampuses.

Subtraktiivse hübriidisatsiooni andmetel ei ole rakutsükliga seotud geenides selget skeemi näha, kuigi mõlema hiireliini hippokampuses on ekspresseerunud proportsionaalselt suhteliselt palju rakutsükliks osalevaid gene. Näiteks LAL hiirtel ekspresseeruvad intensiivsemalt rakutsükliks võimendavad pro-tümosiin alfa (Ptma) (Jiang *et al*, 2003), makrofaagide migratsiooni inhibeeriv faktor (Mif) (Thierry ja Thierry 2003), transformeeriv kasvufaktor beeta-3 (TGF-beta3) (Dudas *et al*, 2004) ning rakutsükliks inhibeeriv peptidüül-prolüül *cis/trans* isomeraas (Pin1) (Zheng *et al*, 2002).

Ka SAL hiirtel ekspresseeruvad mitmeid rakutsükliks võimendavaid gene, nagu *camki*-sarnane kinaas, osteopontiin (Opn) (Selvaraju *et al*, 2004), neurotroofne türosiinkinaasi retseptor TrkC (Chalazontis, 2004) ning proliferatsiooni inhibeeriv Tle4 (*transducin-like enhancer 4*) (Chen ja Courey, 2000).

Mõlema hiireliini hippokampuses ekspresseeruvad erinevad rakutsükliks võimendavad, aga ka mõned inhibeerivad geenid, mistõttu pole võimalik käesolevate andmete põhjal väita, et nende hiirte hippokampuses esineb erinev rakutsükli regulatsioon.

4.5 LAL HIIRTE HIPPOKAMPUSES EKSPRESSEERUB PALJU RAKKU STRESSI JA APOPTOOSI EEST KAITSVAID VALKE

Selgematest funktsionaalsetest ekspressioonimustritest saab aga rääkida siis, kui vaadata rakutsükliga seotud geenide teisi funktsioone. Nimelt ekspresseerub LAL hiirte hippokampuses kõrgemalt mitmeid gene, mille peamine või alternatiivne funktsioon on oksüdatiivse stressi või apoptoosivastane ning samuti selliseid valke, millel on näidatud neurodegeneratsiooni eest kaitsev toime.

Vähemalt kahe LAL hiirtel üleekspresseeruva geeni puhul on demonstreeritud neurodegeneratsioonivastast mõju. Nii näitasid transformeeriva kasvufaktori TGF-beta3 puhul neurodegeneratsiooni vastast mõju Kim *et al* (2002) ning Pin1 puhul närvirakkude vananemisega seotud degeneratsiooni eest kaitsvat mõju Liou *et al* (2003).

LAL hiirte hippokampuses ekspresseerub SAL hiirtega võrreldes kõrgemalt mitmeid apoptoosivastaseid gene. Näiteks pro-tümosiin alfa (Ptma) puhul on näidatud, et mitokondrist alguse saava kaspasid aktivatsiooni puhul takistab Ptma valk apoptoosumi kujunemist (Jiang *et al*, 2003).

Dad1 (*defender against apoptotic cell death 1*) on geen, mis ekspresseerub LAL hiirtel intensiivsemalt nii *GeneChip*'i andmetel (Feldker *et al*, 2003b) kui käesolevas töös subtraktiivse hübriidisatsiooni andmetel. Dad1 otsene funktsioon on N-terminaalne valkude glükosüleerimine ning apoptoosivastane toime sõltub tõenäoliselt substraatvalkude olemasolust igas spetsiifilises rakus (Hong *et al*, 2000).

Kahe LAL hiirte hippokampuses intensiivsemalt ekspresseerunud geeni puhul on näidatud, et nad on võimelised pärssima oksüdatiivse stressi poolt indutseeritud apoptoosi: tioredoksiin 2 (Trx2) ja makrofaagide migratsiooni inhibeeriv faktor (Mif). Tioredoksiin 2 lokaliseerub mitokondris ning tema peamised rollid on mitokondri membraanipotentsiaali säilitamine ning raku kaitsemine oksüdantide poolt indutseeritud apoptoosi vastu (Tanaka *et al*, 2002). Nguyen *et al* (2003) demonstreerisid, et ka Mif valgul on oksidoreduktaasne aktiivsus ning ta kaitseb rakku oksüdatiivse stressi poolt indutseeritud apoptoosi eest.

Seda, et LAL hiirte hippokampuse rakkudes on tegemist võimendunud oksüdatiivse stressiga, kinnitab lisaks Feldker *et al* (2003b) leid *GeneChip*’ilt, kus LAL hiirtel esines 1,67-kordne tõus oksüdatiivse stressi poolt indutseeritava valgu (*oxidative stress-induced protein*) geeni ekspressioonis.

Mif valgul on veel teisigi funktsioone: Koebernick *et al* (2002) näitasid, et Mif *knockout* hiirtel on peale defitsiitse immuunsüsteemi ka kõrgeenenud kortikosteronide tase. Need autorid järeldasid, et Mif toimib regulaatorina immuunsüsteemi ja HPA-telje vahel, surudes alla kortikosteroidhormoonide taseme, mis pärsvivad immuunsüsteemi ja põletikureaktsioone. See leid on kooskõlas Veenema *et al* (2003a) uurimusega, kes leidsid, et LAL hiirte reaktsioon stressile on intensiivsem ning stressi poolt indutseeritud kortikosterooni vallandumine tugevam ja pikaajalisem; samuti van Riel *et al* (2002) järeldustega, et LAL hiirte hormonaalsüsteem on krooniliselt häirunud.

LAL hiirte hippokampuse rakkudes esineva stressisituatsiooniga on kooskõlas kahe DNA reparatsiooniga tegeleva valgu Ube2v2 ja XRCC4 ülekspressioon. Ube2v2 (*Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2*), mida tuntakse ka MMS2 (metüül metaan-sulfonaaditundlik 2) valgul on kriitiline osalus replikatsioonijärgses DNA parandamises RAD6 signaalirajas (Hoegge *et al*, 2002). XRCC4 (*DNA double-strand break repair and V(D)J recombination protein*) valk osaleb katkenud kromosomaalse DNA mittehomoloogsete otste ühendamisel ja parandamisel (Modesti *et al*, 2003).

4.6 TSÜTOSKELETIGA SEOTUD GEENID

Feldker *et al* (2003a; 2003b) üks selgemaid leide oli see, et LAL hiirte hippokampuses on üleekspressioonid erinevad tsütoskeletiga seotud geenid, nagu tubuliini erinevad alatüübid, kofiliin, aktiin ja dünaktiin. Käesolevas uurimuses selliseid seaduspärasid ei leitud, mis tuleneb tõenäoliselt meetodi omapäras: tsütoskeletiga seotud transkriptid annavad *dot blot*’il suure tõenäosusega maksimaalse signaali, ning osutuvad “laeefekti” tõttu käesolevas töös kasutatud meetodi ja positiivsete kloonide valikukriteeriumite alusel negatiivseteks.

Küll aga ekspresseerus SAL hiirtel intensiivsemalt mitmeid kloone, mis on seotud tsütoskeleti ümberkorraldamise, fagotsütoosi ja autofagotsütoosiga. Näiteks SAL hiirtel üleekspressioonid Elmo2 (*Engulfment and cell motility 2, ced-12 homolog*) valk osaleb tsütoskeleti ümberkorraldamises, mis on vajalikud apoptootiliste rakkude fagotsütoosi ning raku liikumise jaoks (Gumienny *et al*, 2001). Map1lc3 kuulub mikrotobuliga seonduvate valkude perekonda, mis reguleerib mikrotobulite konformeerumist. Viimasel ajal on aga just Map1lc3 puhul keskendutud valgu osalusele autofagotsütoosis. On näidatud, et mikrotobuliga seotud valk Map1lc3 on autofagosoomi membraani fundamentaalne osa

(He *et al*, 2003). Emeriini valk lokaliseerub rakus tuumamembraani siseküljel. On teada, et emeriin osaleb tuumakorteksi aktiivivõrgustiku konformatsiooni reguleerimisel ning sellel valgul on tõenäoliselt oluline osalus tuumamembraani ümberkorraldamises mitoosi ajal (Bengtsson ja Wilson, 2004).

4.7 AKSONITEGA SEOTUD GEENID

Lisaks ekspresseerus nii SAL kui LAL hiirtel intensiivsemalt mitmeid aksoniga seotud geene. Varem on näidatud, et LAL hiirte hippokampuse GD piirkonna granulaarrakkude aksonid (sammalkiud) on pikemad ning aksoniterminaalid suuremad. Esimese leiuga on kooskõlas LAL hiirtel ekspresseerunud tsükliline fosfodiesteras 1 (Cnp1). Lappe-Siefke *et al* (2003) näitasid, et Cnp1-l on aksonite väljakasvul fundamentaalne roll. Samuti on näidatud, et Cnp1 seondub teatud tsütoskeleti valkudega ning on tubuliini membraanne ankur. Cnp1 üleekspressioon rakukultuuris võimendab filopoodide (aktiinkimpude) väljakasvu (Lappe-Siefke *et al*, 2003).

Samas ekspresseerus SAL hiirtel kaks geeni, mil on osalus müelinisatsioonis. Ekstratsellulaarses maatriksis lokaliseeruv osteopontiin võimendab *in vitro* müeliini kujunemist ning osteopontiin on müeliniseerumisel ja remüeliniseerumisel üleekspressioonunud ka *in vivo* (Selvaraju *et al*, 2004). Yamauchi *et al* (2003) näitasid, et perifeerses närvisüsteemis indutseerib neurotroofne türosiinkinaasi retseptor TrkC müeliinkihi teket; seda, kas sama kehtib ka kesknärvisüsteemis, pole siiski näidatud. Hüpoteesile, et SAL hiirte hippokampuses võiks müelinisatsioon võimendunud olla, annavad kinnitust Feldker *et al* (2003a), kellel SAGE andmetel üleekspressioon SAL hiirtel müeliini proteolipiidne valk (*Myelin proteolipid protein*, PLP; teise nimega *Lipophilin*). See integraalne membraanivalk on kesknärvisüsteemi peamine müelinisatsiooni reguleeriv valk, mis on oluline nii müeliini säilimisel kui selle multilamellaarse struktuuri organiseerimisel (Cailloux *et al*, 2000).

SAL hiirtel ekspresseerus intensiivsemalt veel üks aksoniga seotud valk: BASP1 (tuntud ka nime all CAP-23 ja NAP-22) valgu kohta on teada vaid see, et valk on membraanseoseline ning lokaliseerub rohkelt aksoniterminaalides (Zakharov *et al*, 2003).

4.8 mRNA ja rRNA SÜNTEESI JA PROTSESSIMISEGA SEOTUD GEENID

SAL hiirtel ekspresseerus intensiivsemalt kaks tuuma ribonukleovalku: hnRNP (heterogeenne tuuma ribonukleoproteiin) HNRPH2 ning väike tuuma ribonukleoproteiin (SnRNP) fibrillariin. HNRPH2 (*Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2*) kuulub heterogeensete tuuma ribonukleovalkude hnRNP hulka ning osaleb pre-mRNA-de protsessingus, enne kui need tuumast välja viiakse (Honore *et al*, 1995). Fibrillariin osaleb rRNA protsessingus (Yanagida *et al*, 2004). rRNA transkriptsiooni reguleerib ka SAL hiirtel ekspresseerunud Smarca5 (*SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin*). Smarca5 kuulub NoRC kompleksi, mis surub alla rDNA transkriptsiooni (Santoro *et al*, 2002).

LAL hiirtel intensiivsemalt ekspresseeruva ribonukleoproteiini RBM8A (*RNA-binding protein 8A*, kirjanduses ka Y14) peamiseks funktsiooniks on splaissingueelsete ja -järgsete sündmuste reguleerimine (Kim *et al*, 2001).

4.9 VALKUDE PROTSESSIMISEGA SEOTUD GEENID

SAL hiirte hippokampuses ekspresseerub intensiivsemalt kaks valkude protsessinguga seotud valku: glükosüültransferaas UggT (UDP-glükoos glükoproteiin) ning eksoproteaas karboksüpeptidaas E (CPE). Mõlemad modifitseerivad sekreteeritavaid valke. Endoplasmaatilises retiikulumis lokaliseerub glükosüültransferaas UggT on sensorvalk, mis valesi volditud või glükosüleerimata valgud ära tunneb ning osaleb sekretoorsete ja membraanseoseliste glükoproteiinide voltimisel ja glükosüleerimisel (Taylor *et al*, 2004). Karboksüpeptidaas E lokaliseerub rakkudes *trans*-Golgi võrgustikus ja peptiide sisaldavates sekretoorsetes vesiikulites. CPE on esiteks sorteerimisretseptor, mis võimaldab propeptiididel ja prohormoonidel sekretoorsetesse graanulitesse siseneda ja reguleeritud sekretoorsesse radadesse suunduda; teiseks eemaldab CPE paljude prohormoonide ja peptiidsete neurotransmitterite karboksüülterminusest aluselisi aminohappeid, muutes need peptiidid bioloogiliselt aktiivseteks signaalmolekulideks. CPE teadaolevad substraadid on POMC (pro-opio-melanokortiin), PENK (pro-enkefaliin) ja proinsuliin (Dhanvantari *et al*, 2002).

4.10 VALKUDE TRANSPORDIGA SEOTUD GEENID

Subtraktiivse hübridisatsiooni andmetel esineb SAL ja LAL hiirte hippokampuses erinevusi ka mõnedes rakkude transpordis osalevate geenide ekspressioonimustris.

SAL hiirtel üleekspresseerub alfa-SNAP (*N-ethylmaleimide sensitive fusion protein attachment protein alpha* NAPA) osaleb sünaptiliste vesiikulite eksotsütoosis koordineerides SNARE (*soluble NSF attachment protein receptor*) valkude funktsioone (Marz *et al*, 2003). Teine SAL hiirtel üleekspresseerub valk AAK (*adaptor-associated kinase*) lokaliseerub neuronites eriti rohkelt presünaptilistes terminalides ning valgu funktsiooniks on klatriiniga seotud endotsütoosi regulatsioon (Conner ja Schmid, 2002).

LAL hiirtel üleekspresseerub sigma-3A-adaptiin (*adapter-related protein complex 3 sigma 1 subunit*) valk on osa AP-3 kompleksist, mis hõlbustab vesikulaarset transporti Golgi membraanist lüsoosoomidesse (Dell'Angelica *et al*, 1997). Teine LAL hiirtel üleekspresseerub valk Sec23B kuulub COPII kompleksi, mis katab endoplasmaatilisest retiikulumist Golgisse transporditavaid vesiikuleid (Roberts *et al*, 2003). Vps35p (*vacuolar protein sorting 35*) on "retromeeri" kompleksi kuuluv valk, mis osaleb valkude retrograadses transpordis endosoomidest *trans*-Golgi võrgustikku (Haft *et al*, 2000).

Mõlemad SAL hiirtel üleekspresseerunud transportvalgud lokaliseeruvad aksoni lõpmetesse; LAL hiirtel on intensiivsemalt ekspresseerunud kaks rakusisese transpordiga seotud valku.

4.11 SAL HIIRTE HIPPOKAMPUSE GEENIEKSPRESSIOONI PROFIIIL

Kuigi GABA on pidurdav neurotransmitter ning enamasti seostatakse kõrgeenenud GABA taset madalama agressiivsusega, on hulgaliselt andmeid, et teatud tingimustel võivad GABA-A retseptori agonistid agressiivsust tõsta (Miczek *et al*, 2003). Näiteks GABA retseptorite allosteerilised modulaatorid, nagu bensodiasepiinid, alkohol ja neurosteroid mõjutavad agressiivsust doosist sõltuvalt: madalamad annused kalduvad agressiivsust tõstma, ent kõrgemate annuste puhul või süsteemse manustamise puhul ilmneb üldine sedatiivne efekt, mis ühtlasi vähendab agressiivsust (Miczek *et al*, 2003). Tõendeid selle kohta, et GABA hulga vähendamine võib agressiivsust hoopis alandada, on veelgi: GABA sünteesiva glutamaathappe dekarboksülaasi (GAD-65) *knockout* hiired, kel GABA tase on püsivalt madal, on vähemagressiivsed kui metsiktüüpi hiired (Stork *et al*, 2000). GABA süsteemil on ilmselge osa agressiivsuse regulatsioonis.

Selgust, miks agressiivsetel hiirtel esineb pidurdava neurotransmitteri üleekspressioon, annab Weinshenkeri ja Siegeli (2002) agressiivsuse bimodaalne teooria, mille alusel jaguneb agressiivsus kaheks äärmiselt erinevaks alatüübiks: afektiivseks kaitseagressiivsuseks ning kiskjalikuks ründaagressiivsuseks. Selle teooria kontekstis on SAL hiired selekteeritud afektiivse kaitseagressiivsuse alusel; SAL hiiri iseloomustab ärev vaenlase tajumine ning nende agressioon on suunatud hirmutava objekti kõrvaldamisele. Just GABA-A retseptori alfa2 subühik on spetsiifiliselt seotud ärevusega (Low *et al*, 2000).

GABA-A retseptori alfa2 subühiku üleekspressioon agressiivsetel hiirtel viitab sellele, kui vajalik võib olla patoloogilise agressiooni ravi puhul erinevaid agressiivsuse liike eristada. GABA-A alfa2 retseptor võib olla farmakoterapeutiline sihtmärk afektiivse agressiivsusega impulsiivsetele isikutele, kelle puhul ärevuse vähendamine alandaks ka agressiooni vallandumist. Sama sihtmärk ei ole aga tõenäoliselt efektiivne ründaagressiivsusega patsientide korral, sh düssotsiaalse isiksushäire puhul, keda iseloomustab just sümpaatilise erutusseisundi ja ärevuse puudumine.

SAL hiirtel ekspresseeruvad hippokampuses intensiivsemalt kaks väikseid lipiidseid ning hüdrofoobseid ligandeid transportivat valku Lrp11 ja apolipoproteiin D (ApoD). Seega võib oletada, et SAL hiirtel on võimendunud teatavad lipiidide metabolismirajad. Kahjuks pole senini teada ei Lrp11 ega ApoD füsioloogilisi ligandeid ning spetsiifilisemaid järeldusi SAL hippokampuses toimuvate protsesside kohta pole praeguste andmete põhjal võimalik teha.

SAL hiirte hippokampuses ekspresseeruvad kaks valkude protsessinguga seotud valku. ER-is lokaliseeruv glükosültransferaas Ugg1 (UDP-glükoos glükoproteiin) ning eksoproteaas karboksüpeptidaas E (CPE). Mõlemad modifitseerivad sekreteeritavaid valke, mistõttu võib oletada, et SAL hiirte hippokampuses on ülesreguleeritud teatavad sekretoorsed rajad. Seda oletust kinnitab ka SAL hiirtel üleekspressioon eksotsütoosis osalev valk alfa-SNAP. Karboksüpeptidaas E-1 on lisaks otsene oluline roll neurotransmitterite sünteesis, CPE muudab bioloogiliselt aktiivseteks signaalmolekulideks mitmeid erinevaid neuropeptide ja prohormoone nagu POMC (pro-opio-melanokortiin), PENK (proenkefaliin) ja proinsuliin (Dhanvantari *et al*, 2002).

4.12 LAL HIIRTE HIPPOKAMPUSE GEENIEKSPRESSIOONI PROFIL

Kahes erinevas uurimuses on näidatud, et LAL hiirtel on üleekspressioonid eritava neurotransmitteri glutamaadi retseptorid. Käesolevas uurimuses üleekspressioonid glutamaadireseptor AMPA2 ning Feldker *et al* (2003b) uurimuses kainaaditundlik glutamaadireseptor 5. Kuna agressiivsetel hiirtel on üleekspressioonid pidurdavad ja mitteagressiivsetel eritavad signaalirajad, annab see põhjust oletada, et patoloogilise agressiivsuse tõusu või languse taga on arvatavasti häired pidurdavate (GABA) ja eritavate (glutamaat) signaalide regulatsioonis ja tasakaalus.

LAL hiirtel ekspresseeruvad intensiivsemalt mitmeid raku energia- ja ATP tootmisega seotud geene. Seda efekti on näidatud kahes varasemas uurimuses SAGE (Feldker *et al*, 2003a) ja geenikiibi (Feldker *et al*, 2003b) andmete põhjal. Subtraktiivse hübriidsatsiooni tulemused käesolevas uurimuses kinnitavad sama fenomeni. Käesolevas uurimuses osutusid positiivseteks peamiselt hingamisahelaga seotud geenid; *GeneChip*'i andmetel (Feldker *et al*, 2003b) ekspresseeruvad LAL hiirtel tugevamalt ka varasemate energiatootmise faasidega seotud valke kodeerivad geenid (laktaadi dehüdrogenaas, püruvaadi kinaas, aspartaadi süntetaas). SAGE andmetel (Feldker *et al*, 2003a) ekspresseeruvad LAL hiirtel tugevamalt ka ATP süntetaasi β -subühik, malaadi dehüdrogenaas, heksokinaas ning aldolaas A. Nagu näha, on ka SAGE ning *GeneChip*'iga saadud tulemused erinevad, kuid osutavad samale efektile. Seega, eri meetoditega saadud tulemuste sisuline mõte on sama: LAL hippokampuses on metabolism ja ATP süntees võimendunud.

Võimalik seletus glutamaatergilise süsteemi ja raku energia- samaaegse ülesreguleerituse kohta sisaldub Chatton *et al* (2003) uurimistulemustes. Chatton *et al* (2003) näitasid, et glutamaadi üleskorjamine astrotsüütidesse pärast sünaptilist närviülekanne indutseerib gliiarakkudes tugeva metaboolse reaktsiooni: astrotsüüdis tõusevad nii ATP kui glükoosi tase. Seevastu GABA üleskorjamine samasuguste Na^{2+} ioonidest sõltuvate transporterite poolt ei tekita detekteeritavat metaboolset reaktsiooni. Need andmed võivad anda olulist selgust, miks LAL hiirte hippokampuses on ülesreguleeritud nii glutamaatergiline süsteem kui ka ATP-d tootvad metabolismirajad. Mõnede uuringute alusel on aju glutamaatergiline süsteem kõige enam energiat nõudev närviülekanne süsteem ning selle töös hoidmiseks kulutatakse kuni 90% kogu raku energiataoavaradest (Shulman *et al*, 1998). Kuigi mõningad autorid selles arvas kahtlevad, on siiski hulgaliselt viiteid, et glutamaatergiline närviülekanne on väga energiakulukas.

LAL hiirte hippokampuse rakkudes esineva stressi olemasolust annab tunnistust see, et LAL hippokampuses ekspresseerub kõrgemalt mitmeid geene, mille peamine või alternatiivne funktsioon on oksüdatiivse stressi või apoptoosivastane ning samuti selliseid valke, millel on näidatud neurodegeneratsioonivastane toime. Kõrgenenud oksüdatiivne stress on väga suure tõenäosusega seotud võimendunud metabolismiga ning paljude oksüdatiivse stressi ja apoptoosivastaste valkude ekspressioon on tõenäoliselt kaitsereaktsioon. LAL hiirte hippokampuse rakkudes esineva stressisituatsiooniga on kooskõlas kahe DNA reparatsiooniga tegeleva valguga kõrgenenud ekspressioon.

4.13 SUBTRAKTIIVSE HÜBRIDISATSIOONI TULEMUSED, VÕRRELDES TEISTE SAL ja LAL HIPPOKAMPUSE GEENIEKSPRESSIOONI VÕRDLUSEKS KASUTATUD MEETODITEGA

4.13.1 SUBTRAKTIIVNE HÜBRIDISATSIOON ja SAGE

SAGE sarnaneb SH-ga selle poolest, et võimaldab tuvastada uusi kandidaatgeene, ent SAGE meetod ei sisalda subtraktsiooni ning baseerub transkriptide juhuslikul üleskorjamisel (*random sampling*). SAGE piiranguks on lühikesed järjestused ning tundlikkus sõltub otseselt sellest, kui palju *tag*-e suudetakse sekveneerida. Näiteks Feldker *et al* (2003a) kasutasid lühikesi 14-aluspaariseid SAGE *tag*-e ning sekveneerisid üle 60 000 *tag*-i, ent ei suutnud tuvastada ühtki närviülekanesüsteemidega seotud transkripti. Näiteks ei esindanud ükski SAGE transkript glutamaadi ega GABA retseptoreid. Need on madalaläviselt ekspresseeruvad neurotransmitterite retseptorvalgud, mille ekspressioonimäär on neurokeemilise ülekande vahendamisel äärmiselt oluline. Seega ei ole 60 000 piisav SAGE *tag*-ide sagedus, et tuvastada muutusi aju biokeemilise regulatsiooniga seotud geeniekspressioonis.

4.13.2 SUBTRAKTIIVNE HÜBRIDISATSIOON ja GEENIKIIP

Kahes uurimuses on Affymetrix-i *GeneChip*-ile kantud vastavalt roti (Evans *et al*, 2002) ja hiire (Feldker *et al* 2003b) hippokampuste cDNA-d ning võrreldud saadud tulemusi SAGE meetodiga. Mõlemal juhul ei suudetud *GeneChip*-iga leida madalaläviseid erinevusi; usaldusväärne signaal suudeti saada vaid üksikute oluliste ajubiokeemiat mõjutavate geenide puhul. Evans *et al* (2002) järeldasid, et Affymetrix-i *GeneChip* suudab usaldusväärset detekteerida mitte rohkem kui 30% hippokampuses ekspresseeruvatest järjestustest ning ei suuda üldse detekteerida vähemalt 30%. Selle kiibiga saab detekteerida üksnes keskmiselt ning tugevalt ekspresseeruvaid transkripte ning SAGE meetodi tundlikkus on umbes sama. Võimalik, et *GeneChip*-i vähene tundlikkus tuleneb lühikestest 25-aluspaaristest oligonukleotiididest, mida selle kiibi puhul kasutatakse.

4.13.3 SUBTRAKTIIVSE HÜBRIDISATSIOONI TUNDLIKKUS KÄESOLEVAS UURIMUSES

Käesolevas töös suudeti subtraktiivse hübridisatsiooni meetodil detekteerida samuti vaid üksikuid aju biokeemilises regulatsioonis osalevaid valke. Sellegipoolest suudeti näidata olulisi geeniekspressioonimuutusi, mida SAGE ja geenikiip detekteerida ei suutnud. Näiteks SAL hiirte hippokampuses üleekspresseerunud GABA-A retseptori alfa2 subühik, Scf38m2, karboksüpeptidaas E, Lrp11, apolipoproteiin D jt ning LAL hiirte hippokampuses üleekspresseerunud glutamaadireseptor AMPA2, diasepaami seondumise inhibiitor, tioredoksiin 2 jt.

Oluline on märkida, et erinevate meetodite tulemused on osaliselt kokkulangevad. Nii SAGE (Feldker *et al*, 2003a) kui ka käesolevas uurimuses kasutatud SH andmetel ekspresseerusid LAL hippokampustes intensiivsemalt kreatiini kinaas ning NADH ubikvinooni oksidoreduktaasi subühik. Nii *GeneChip*-i (Feldker *et al*, 2003b) kui

käesolevas uurimuses kasutatud SH andmetel ekspresseerunud LAL hippokampustes intensiivsemalt tsütokroom c oksüdaasi subühikud, vakuolaarse prootonpumba subühikud ning Dad1 (*defender against apoptotic cell death1*) valk. Kokkulangevad leiud on ka LAL hiirtel intensiivsemalt ekspresseerunud glutamaadiretseptor AMPA-2 (Gria2; käesolevas uurimuses) ja kainaat-5 (Feldker *et al*, 2003b *GeneChip`il*). Need on struktuuri ja funktsiooni poolest väga lähedased valgud, mille kaudu avaldab mõju erutav närviülekanneaine glutamaat.

JÄRELDUSED

Käesolevas uurimuses näidati subtraktiivse hübriidsatsiooni meetodil mitmeid uusi erinevusi SAL ja LAL hiirte hippokampuse geeniekspressioonis; samuti võimaldasid SH tulemused selgemini tõlgendada mitmeid andmeid, mis on varasemates uuringutes saadud SAGE ning *GeneChip`i* meetodil. SH meetodil näidati, et SAL ja LAL hiirte hippokampustes on ülesreguleeritud erinevad signaalirajad. Kuna agressiivsetel hiirtel on üleekspressioonid pidurdavad ja mitteagressiivsetel erutavad signaalirajad, annab see põhjust oletada, et patoloogilise agressiivsuse tõusu või languse taga on häired pidurdavate (GABA) ja erutavate (glutamaat) signaalide regulatsioonis ja tasakaalus. GABA-A retseptori alfa2 subühiku üleekspressioon agressiivsetel hiirtel viitab sellele, kui vajalik võib olla patoloogilise agressiooni ravi puhul erinevaid agressiivsuse liike eristada. GABA-A alfa2 retseptor võib olla farmakoterapeutiline sihtmärk afektiivse agressiivsusega impulsiivsetele isikutele, kelle puhul ärevuse vähendamine alandaks ka agressiooni vallandumist. Sama sihtmärk ei ole aga tõenäoliselt efektiivne ründaagressiivsusega patsientide korral, sh düssotsiaalse isiksushäire puhul, keda iseloomustab just sümpaatilise erutus seisundi ja ärevuse puudumine. Lisaks erinevustele signaaliradades, viitavad käesoleva töö tulemused, et SAL ja LAL hiirte hippokampuses esineb erinevusi raku energaetikas, lipiidide ning valkude transpordis ja valkude protsessingus.

Lisaks sellele, et SH meetodil näidati uusi erinevusi SAL ja LAL hiirte hippokampuse geeniekspressioonis, ilmnis SH tulemustes ka osaliselt kattuvaid andmeid varem kasutatud meetodite - SAGE ning *GeneChip`i* andmetega. Kokkuvõttes võib öelda, et erinevad meetodid täiendavad üksteist ning ükski senikasutatud meetoditest ei võimalda biokeemilistes signaaliradades osalevate valkude ekspresiooniprofiili täielikult välja tuua. SH on efektiivne meetod kahe cDNA populatsiooni võrdluseks ning SH tulemused täiendavad igati andmeid, mis on varasemates uuringutes saadud SAGE`t ning geenikiipi kasutades.

TÄNUAVALDUSED

Asendamatu abi ja lõputu innustuse eest minu magistritöö valmimisel soovin tänada oma juhendajat Sulev Kõksi.

Suured tänud professor Andres Metspalule asjalike nõuannete ja toetuse eest.

Tänan professor Eero Vasarat ning kõiki laborikaaslasi füsioloogia instituudist toetuse ja parima seltskonna eest, eriti Jürgen Innost keeleliste korrektuuride eest ning Hendrik Luuki, Kaido Kurrikoffi ja Aleksei Nelovkovi nõu ja abi eest laboritöös.

Viited:

- Anderson SW, Bechara A, Damasio H, Tranel D, Damasio AR** (1999) Impairment of social and moral behavior related to early damage in human prefrontal cortex. *Nat Neurosci*, 2: 1032-37
- Andersson T, Unneberg P, Nilsson P, Odeberg J, Quackenbush J, Lundeberg J** (2002) Monitoring of Representational Difference Analysis Subtraction Procedures by Global Microarrays. *BioTechniques*, 32: 1348-58
- Becker A, Grecksch G** (2003) Haloperidol and clozapine affect social behaviour in rats postnatally lesioned in the ventral hippocampus. *Pharmacol Biochem Behav*, 76(1): 1-8
- Bengtsson L, Wilson KL** (2004) Multiple and surprising new functions for emerin, a nuclear membrane protein. *Curr Opin Cell Biol*, 16(1): 73-9
- Bjork JM, Dougherty DM, Moeller FG, Swann AC** (2000) Differential behavioral effects of plasma tryptophan depletion and loading in aggressive and nonaggressive men. *Neuropsychopharmacology*, 22 (4): 357-69
- Blanchard RJ, Wall PM, Blanchard DC** (2003) Problems in the study of rodent aggression. *Horm Behav*, 44: 161-70
- Brower MC, Price BH** (2001) Neuropsychiatry of frontal lobe dysfunction in violent and criminal behaviour: a critical review. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 71: 720-26
- Brunner HG, Nelen MR, Breakefield XO, Ropers HH, van Oost BA** (1993) Abnormal behavior associated with a point mutation in the structural gene for monoamine oxidase A. *Science*, 262: 578-80
- Cailloux F, Gauthier-Barichard F, Mimault C, Isabelle V, Courtois V, Giraud G, Dastugue B, Boespflug-Tanguy O, Baethmann M, Bertini E, Cuisset J.M, Gaertner J, Hanefeld F, Kohlschutter A, Landrieu P, Mayer M, Peudenier S, Rodriguez D, Rating D, Surtees R, Uziel G, Vallee L, Voit T** (2000) Genotype-phenotype correlation in inherited brain myelination defects due to proteolipid protein gene mutations. *Eur J Hum Genet*, 8: 837-45
- Cases O, Seif I, Grimsby J, Gaspar P, Chen K, Pournin S et al** (1995) Aggressive behavior and altered amounts of brain serotonin and norepinephrine in mice lacking MAO-A. *Science*, 268: 1763-66
- Caspi A, McClay J, Moffitt TE, Mill J, Martin J, Craig IW** (2002) Role of genotype in the cycle of violence in maltreated children. *Science*, 297: 851-54
- Chalazonitis A** (2004) Neurotrophin-3 in the development of the enteric nervous system. *Prog Brain Res*, 146: 243-63
- Chatton JY, Pellerin L, Magistretti PJ** (2003) GABA uptake into astrocytes is not associated with significant metabolic cost: implications for brain imaging of inhibitory transmission. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100(21): 12456-61
- Chaudhry FA, Schmitz D, Reimer RJ, Larsson P, Gray AT, Nicoll R, Kavanaugh M, Edwards RH** (2002) Glutamine Uptake by Neurons: Interaction of Protons with System A Transporters. *J Neurosci*, 22(1): 62-72

- Chen G, Courey AJ** (2000) Groucho/TLE family proteins and transcriptional repression. *Gene*, 249(1-2): 1-16
- Chung NS, Wasan KM** (2004) Potential role of the low-density lipoprotein receptor family as mediators of cellular drug uptake. *Adv Drug Deliv Rev*, 56(9): 1315-34
- Coccaro EF, Kavoussi RJ, Hauger RL** (1997) Serotonin function and antiaggressive response to fluoxetine: a pilot study. *Biol Psychiatry*, 42 (7): 546-52
- Coccaro EF, Lee R, McCloskey M** (2003) Norepinephrine function in personality disorder: plasma free MHPG correlates inversely with life history of aggression. *CNS Spectr*, 8 (10): 731-36
- Coleman RA** (2003) Of mouse and man – what is the value of the mouse in predicting gene expression in humans? *Drug Discov Today*, 8 (6): 233-35
- Comings DE, Johnson JP, Gonzalez NS, Huss M, Saucier G, McGue M** (2000) Association between the adrenergic alpha 2A receptor gene (ADRA2A) and measures of irritability, hostility, impulsivity and memory in normal subjects. *Psychiatr Genet* 10: 39-42
- Compaan JC, de Ruiter AJ, Koolhaas JM, van Oortmerssen GA, Bohus B** (1992) Differential effects of neonatal testosterone treatment on aggression in two selection lines of mice. *Physiol Behav*, 51(1): 7-10
- Compaan JC, Buijs RM, Pool CW, De Ruiter AJ, Koolhaas JM** (1993 a) Differential lateral septal vasopressin innervation in aggressive and nonaggressive male mice. *Brain Res Bull*, 30(1-2): 1-6
- Compaan JC, van Wattum G, de Ruiter AJ, van Oortmerssen GA, Koolhaas JM, Bohus B** (1993 b) Genetic differences in female house mice in aggressive response to sex steroid hormone treatment. *Physiol Behav*, 54(5): 899-902
- Compaan C, Hutchison JB, Wozniak A, de Ruiter AJH, Koolhaas JM** (1994) Brain aromatase activity and plasma testosterone levels are elevated in aggressive male mice during early ontogeny. *Brain Res Dev Brain Res*, 82(1-2): 185-92
- Conner SD, Schmid SL** (2002) Identification of an adaptor-associated kinase, AAK1, as a regulator of clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol*, 156(5): 921-29
- Damberg M, Garpenstrand H, Alfredsson J, Ekblom J, Forslund K** (2000) A polymorphic region in the human transcription factor AP-2b gene is associated with specific personality traits. *Mol Psychiatry*, 5: 220-24
- de Boer SF, van der Vegt BJ, Koolhaas JM** (2003) Individual variation in aggression of feral rodent strains: a standard for the genetics of aggression and violence? *Behav Genet*, 33(5): 485-01
- Dell'Angelica EC, Ohno H, Ooi CE, Rabinovich E, Roche KW, Bonifacino JS** (1997) AP-3: an adaptor-like protein complex with ubiquitous expression. *EMBO J*, 16: 917-28
- Dhanvantari S, Arnautova I, Snell CR, Steinbach PJ, Hammond K, Caputo GA, London E, Loh YP** (2002) Carboxypeptidase E, a prohormone sorting receptor, is anchored to secretory granules via a C-terminal transmembrane insertion. *Biochemistry*, 41(1): 52-60

- Diachenko L, Lau YF, Campell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K et al** (1996) Suppression Subtractive Hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci*, 93(12): 6025-30
- Dick DM, Li TK, Edenberg HJ, Hesselbrock V, Kramer J, Kuperman S, Porjesz B, Bucholz K, Goate A, Nurnberger J, Foroud T** (2004) A genome-wide screen for genes influencing conduct disorder. *Mol Psychiatry*, 9: 81-86
- Dudas M, Nagy A, Laping NJ, Moustakas A, Kaartinen V** (2004) Tgf-beta3-induced palatal fusion is mediated by Alk-5/Smad pathway. *Dev Biol*, 266(1): 96-108
- Ebstein RP, Kotler M** (2003) Aggression and Criminal Behavior. *Nature Encycloedia of the human genome*, 35-37
- Evans SJ, Datson NA, Kabbaj M, Thompson RC, Vreugdenhil E, de Kloet ER, Watson SJ, Akil H** (2002) Evaluation of Affymetrix GeneChip sensitivity in rat hippocampal tissue using SAGE analysis. *Eur J Neurosci*, 16: 409-13
- Feldker DE, Datson NA, Veenema AH, Meulmeester E, de Kloet ER, Vreugdenhil E** (2003a) Serial analysis of gene expression predicts structural differences in hippocampus of long attack latency and short attack latency mice. *Eur J Neurosci*, 17(2): 379-87
- Feldker DE, Datson NA, Veenema AH, Proutski V, Lathouwers D, de Kloet ER, Vreugdenhil E** (2003b) GeneChip analysis of hippocampal gene expression profiles of short- and long-attack-latency mice: technical and biological implications. *J Neurosci Res* 74(5): 701-16
- Feng Y, Ling Liang H, Wong-Riley M** (2004) Differential gene expressions in the visual cortex of postnatal day 1 versus day 21 rats revealed by suppression subtractive hybridization. *Gene*, 329: 93-101
- Fujii T, Tamura K, Masai K, Tanaka H, Nishimune Y, Nojima H** (2002) Use of stepwise subtraction to comprehensively isolate mouse genes whose transcription is up-regulated during spermiogenesis. *EMBO Rep*, 4: 367-72
- Gumienny TL, Brugnera E, Tosello-Trampont AC, Kinchen JM, Haney LB, Nishiwaki K, Walk SF, Nemergut ME, Macara IG, Francis R, Schedl T, Qin Y, Van Aelst L, Hengartner MO, Ravichandran KS** (2001) CED-12/ELMO, a novel member of the CrkII/Dock180/Rac pathway, is required for phagocytosis and cell migration. *Cell*, 107(1): 27-41
- Haft CR, de la Luz Sierra M, Bafford R, Lesniak MA, Barr VA, Taylor SI** (2000) Human orthologs of yeast vacuolar protein sorting proteins Vps26, 29, and 35: assembly into multimeric complexes. *Mol Biol Cell*, 11(12): 4105-16
- He H, Dang Y, Dai F, Guo Z, Wu J, She X, Pei Y, Chen Y, Ling W, Wu C, Zhao S, Liu JO, Yu L** (2003) Post-translational modifications of three members of the human MAP1LC3 family and detection of a novel type of modification for MAP1LC3B. *J Biol Chem*, 278(31): 29278-87
- Hoegge C, Pfander B, Moldovan GL, Pyrowolakis G, Jentsch S** (2002) RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature*, 419 (6903): 135-41

- Hong NA, Flannery M, Hsieh SN, Cado D, Pedersen R, Winoto A** (2000) Mice lacking Dad1, the defender against apoptotic death-1, express abnormal N-linked glycoproteins and undergo increased embryonic apoptosis. *Dev Biol*, 220(1): 76-84
- Honore B, Rasmussen HH, Vorum H, Dejgaard K, Liu X, Gromov P, Madsen P, Gesser B, Tommerup N, Celis JE** (1995) Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins H, H', and F are members of a ubiquitously expressed subfamily of related but distinct proteins encoded by genes mapping to different chromosomes. *J Biol Chem*, 270(48): 28780-9
- Hubank M, Schatz DG** (1994) Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucl Acids Res*, 22: 5640-48
- Ji P, Diederichs S, Wang W, Böing S, Metzger R, Schneider PM, Tidow N, Brandt B, Buerger H, Bulk E, Thomas M, Berdel WE, Serve H, Müller-Tidow C** (2003) MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer. *Oncogene*, 22: 8031-41
- Jiang X, Kim HE, Shu H, Zhao Y, Zhang H, Kofron J, Donnelly J, Burns D, Ng SC, Rosenberg S, Wang X** (2003) Distinctive roles of PHAP proteins and prothymosin-alpha in a death regulatory pathway. *Science*, 299: 223-26
- Kavoussi RJ, Liu J, Coccaro EF** (1994) An open trial of sertraline in personality disordered patients with impulsive aggression. *J Clin Psychiatry*, 55 (4): 137-41
- Kim VN, Yong J, Kataoka N, Abel L, Diem MD, Dreyfuss, G** (2001) The Y14 protein communicates to the cytoplasm the position of exon-exon junctions. *EMBO J*, 20: 2062-68
- Kim HC, Bing G, Kim SJ, Jhoo WK, Shin EJ, Bok Wie M, Ko KH, Kim WK, Flanders KC, Choi SG, Hong JS** (2002) Kainate treatment alters TGF-beta3 gene expression in the rat hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res*, 108(1-2): 60-70
- Knox SS, Wilk JB, Zhang Y, Weidner G, Ellison RC** (2004) A genome scan for hostility: the national heart, lung, and blood institute family heart study. *Mol Psychiatry*, 9: 124-26
- Koebnick H, Grode L, David JR, Rohde W, Rolph MS, Mittrucker HW, Kaufmann SHE** (2002) Macrophage migration inhibitory factor (MIF) plays a pivotal role in immunity against *Salmonella typhimurium*. *Proc Nat Acad Sci*, 99: 13681-86
- Korte SM, Meijer OC, De Kloet ER, Buwalda B, Keijser J, Sluyter F, Van Oortmerssen Gand Bohus B** (1996) Enhanced 5-HT1a receptor expression in forebrain regions of aggressive house mice. *Brain Res*, 736: 338-43
- Krug et al** (Eds) (2002) World report on violence and health. Geneva: World Health Organization
- Lappe-Siefke C, Goebbels S, Gravel M, Nicksch E, Lee J, Braun PE, Griffiths IR, Nave KA** (2003) Disruption of *Cnp1* uncouples oligodendroglial functions in axonal support and myelination. *Nat Genet*, 33(3): 366-74
- Larose M, Bouchard C, Chagnon YC** (2001) A new gene related to human obesity identified by suppression subtractive hybridization. *Int J Obes*, 25 (6): 770-76
- Liou YC, Sun A, Ryo A, Zhou XZ, Yu ZX, Huang HK, Uchida T, Bronson R, Bing G, Li X, Hunter T, Lu KP** (2003) Role of the prolyl isomerase Pin1 in protecting against age-dependent neurodegeneration. *Nature*, 424: 556-61
- Lisitsyn N, Lisitsyn N, Wigler M** (1993) Cloning the differences between two complex genomes. *Science*, 259: 946-51

- Low K, Crestani F, Keist R, Benke D, Brunig I, Benson JA, Fritschy JM, Rulicke T, Bluethmann H, Mohler H, Rudolph U** (2000) Molecular and neuronal substrate for the selective attenuation of anxiety. *Science*, 290(5489): 131-34
- Manuck SB, Flory JD, Ferrell RE, Dent KM, Mann JJ and Muldoon MF** (1999) Aggression and anger-related traits associated with a polymorphism of the tryptophan hydroxylase gene. *Biol Psychiatry*, 45: 603-14
- Marz KE, Lauer JM, Hanson PI** (2003) Defining the SNARE complex binding surface of alpha-SNAP: implications for SNARE complex disassembly. *Biochem J*, 375(1): 159-66
- Mejia JM, Ervin FR, Baker GB, Palmour RM** (2002) Monoamine oxidase inhibition during brain development induces pathological aggressive behavior in mice. *Biol Psychiatry*, 52(8): 811-22
- Miczek KA, Fish EW, de Bold JF, de Almeida RMM** (2002) Social and neural determinants of aggressive behavior: pharmacotherapeutic targets at serotonin, dopamin and GABA systems. *Psychopharmacology*, 163: 434-58
- Miczek KA, Fish EW, De Bold JF** (2003) Neurosteroids, GABA_A receptors, and escalated aggressive behavior. *Horm Behav*, 44: 242-57
- Miinalainen IJ, Chen ZJ, Torkko JM, Pirila PL, Sormunen RT, Bergmann U, Qin YM, Hiltunen JK** (2003) Characterization of 2-enoyl thioester reductase from mammals. An ortholog of YBR026p/MRF1'p of the yeast mitochondrial fatty acid synthesis type II. *J Biol Chem*, 278 (22): 20154-61
- Miller GM, Bendor J, Tiefenbacher S, Yang H, Novak MA, Madras BK** (2004) A mu-opioid single nucleotide polymorphism in rhesus monkey: association with stress response and aggression. *Mol Psychiatry*, 9(1): 99-108
- Modesti M, Junop MS, Ghirlando R, van de Rakt M, Gellert M, Yang W, Kanaar R** (2003) Tetramerization and DNA ligase IV interaction of the DNA double-strand break repair protein XRCC4 are mutually exclusive. *J Mol Biol*, 334(2): 215-28
- Moeller FG, Dougherty DM, Swann AC, Collins D, Davis CM, Cherek DR** (1996) Tryptophan depletion and aggressive responding in healthy males. *Psychopharmacology (Berl)*, 126(2): 97-103
- Moran P** (1999). The epidemiology of antisocial personality disorder. *Am J Soc Psychiatry*, 34(5): 231-42
- Moragrega I, Carrasco MC, Vicens P Redolat R** (2003) Spatial learning in male mice with different levels of aggressiveness: effects of housing conditions and nicotine administration. *Behav Brain Res*, 147(1-2): 1-8
- Moyer KE** (1968) Kinds of aggression and their physiological basis. *Communications in Behavioural Biology*, 2A: 65-87
- Nguyen MT, Lue H, Kleemann R, Thiele M, Tolle G, Finkelmeier D, Wagner E, Braun A, Bernhagen J** (2003) The cytokine macrophage migration inhibitory factor reduces pro-oxidative stress-induced apoptosis. *J Immunol*, 170(6): 3337-47

- Nyberg MN, Sandnabba NK, Schalkwyk L, Sluiter F** (2004) Genetic and environmental (inter) actions in male mouse lines selected for aggressive and nonaggressive behavior. *Genes Brain Behav*, 3: 101-09
- Panksepp J** (1998) *Affective Neuroscience: The Foundations of Human and Animal Emotions*. Oxford University Press, New York
- Persson ML, Wasserman D, Jonsson EG, Bergman H, Terenius L, Gyllander A** (2000) Search for the influence of the tyrosine hydroxylase (TCAT)(n) repeat polymorphism on personality traits. *Psychiatry Res*, 95: 1–8
- Plomin R, Defries JC, McClearn GE, McGuffin P** (2000) *Behavioral Genetics*; W Freeman & Co
- Raine A, Ishikawa SS, Arce E, Lencz T, Knuth KH, Bihrlé S, LaCasse L, Colletti P** (2004) Hippocampal Structural Asymmetry in Unsuccessful Psychopaths. *Biol Psychiatry*, 55: 185-91
- Reif A, Lesch KP** (2003) Toward a molecular architecture of personality. *Behav Brain Res*, 139: 1-20
- Rahvusvaheline haiguste klassifikatsioon RHK-10; Psüühika- ja käitumishäirete klassifikatsioon: kliinilised kirjeldused ja diagnostilised juhused. Maaailma tervishoiuorganisatsioon, 1992
- Riel van E, Meijer OC, Veenema AH, Joels M** (2002) Hippocampal Serotonin responses in short and Long Attack latency Mice. *J Neuroendocrinol*, 14: 234-39
- Rissoan MC, Duhén T, Bridon JM, Bendriss-Vermare N, Peronne C, de Saint Vis B, Briere F, Bates EE** (2002) Subtractive hybridization reveals the expression of immunoglobulin-like transcript 7, Eph-B1, granzyme B, and 3 novel transcripts in human plasmacytoid dendritic cells. *Blood*, 100(9): 3295-303
- Roberts B, Clucas C, Johnstone IL** (2003) Loss of SEC-23 in *Caenorhabditis elegans* Causes Defects in Oogenesis, Morphogenesis, and Extracellular Matrix Secretion. *Mol Biol Cell*, 14 (11): 4414-26
- Rujescu D, Giegling I, Bondy B, Gietl A, Zill P, Möller HJ** (2002) Association of anger-related traits with SNPs in the TPH gene. *Mol Psychiatry*, 7(9): 1023-29
- Rujescu D, Giegling I, Gietl A, Hartmann AM, Möller HJ** (2003) A functional single nucleotide polymorphism (V158M) in the COMT gene is associated with aggressive personality traits. *Biol Psychiatry*, 54: 34-39
- Sabol SZ, Hu, S, Hamer D** (1998) A functional polymorphism in the monoamine oxidase A gene promoter. *Hum Genet*, 103: 273-79
- Sadou F, Amara DA, Dierich A, LeMeur M, Ramboz S, Segu L et al,** (1994) Enhanced aggressive behavior in mice lacking 5-HT_{1B} receptor. *Science*, 5180: 1875-78
- Santoro R, Li J, Grummt I** (2002) The nucleolar remodeling complex NoRC mediates heterochromatin formation and silencing of ribosomal gene transcription. *Nat Genet*, 32(3): 393-96
- Selvaraju R, Bernasconi L, Losberger C, Graber P, Kadi L, Avellana-Adalid V, Picard-Riera N, Van Evercooren AB, Cirillo R, Kosco-Vilbois M, Feger G, Paoïan R, Boschert U**

- (2004) Osteopontin is upregulated during in vivo demyelination and remyelination and enhances myelin formation in vitro. *Mol Cell Neurosci*, 25(4): 707-21
- Shulman RG, Rothman DL** (1998) Interpreting functional imaging studies in terms of neurotransmitter cycling. *Proc Natl Acad Sci*, 95 (20): 11993-98
- Sluyter F, Jamot L, Oortmerssen GA van, Crusio WE** (1994) Hippocampal mossy fiber distributions in mice selected for aggression. *Brain Res*, 646: 145-48
- Sluyter F, Korte SM, Bohus B, Van Oortmerssen GA** (1996) Behavioral stress response of genetically selected aggressive and nonaggressive wild house mice in the shock-probe/defensive burying test. *Pharmacol Biochem Behav*, 54(1): 113-16
- Sluyter F, Arseneault L, Moffitt TE, Veenema AH, de Boer S, Koolhaas JM** (2003) Toward an animal model for antisocial behavior: parallels between mice and humans. *Behav Genet*, 33(5): 563-74
- Stork O, Ji FY, Kaneko K, Stork S, Yoshinobu Y, Moriya T, Shibata S, Obata K** (2000) Postnatal development of a GABA deficit and disturbance of neural functions in mice lacking GAD65. *Brain Res*, 865: 45-58
- Tanaka T, Hosoi F, Yamaguchi-Iwai Y, Nakamura H, Masutani H, Ueda S, Nishiyama A, Takeda S, Wada H, Spyrou G, Yodoi J** (2002) Thioredoxin-2 (TRX-2) is an essential gene regulating mitochondria-dependent apoptosis. *EMBO J*, 21: 1695-703
- Taylor SC, Ferguson AD, Bergeron JJ, Thomas DY** (2004) The ER protein folding sensor UDP-glucose glycoprotein-glucosyltransferase modifies substrates distant to local changes in glycoprotein conformation. *Nat Struct Mol Biol*, 11: 128-34
- Thierry C, Thierry R** (2003) Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 3: 791-800
- Thomas EA, George RC, Sutcliffe JG** (2003) Apolipoprotein D modulates arachidonic acid signaling in cultured cells: implications for psychiatric disorders. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 69(6): 421-27
- Tordjman S, Carlier M, Cohen D, Cesselin F, Bourgoin S, Colas-Linhart N, Petiet A, Perez-Diaz F, Hamon M, Roubertoux PL** (2003) Aggression and the three opioid families (endorphins, enkephalins, and dynorphins) in mice. *Behav Genet*, 33(5): 529-36
- Toth M** (2003) 5-HT_{1A} receptor knockout mouse as a genetic model of anxiety. *Eur J Pharmacol*, 463: 177-84
- U.S. Patent #5, 565,340; PCR suppression by inverted terminal repeats (ITRs)
- Veenema AH, Meijer OC, Ronald de Kloet E, Koolhaas JM, Bohus BG** (2003a) Differences in basal and stress-induced HPA regulation of wild house mice selected for high and low aggression. *Horm Behav*, 43(1): 197-204
- Veenema AH, Meijer OC, Ronald de Kloet E, Koolhaas JM** (2003b) Genetic Selection For Coping Style Predicts Stressor Susceptibility. *J Neuroendocrinol*, 15: 256-67
- Walther DJ, Peter JU, Bashammakh S, Hortnagl H, Voits M, Fink H, Bader M** (2003) Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science*, 299(5603): 76

- Weinshenker NJ, Siegel A** (2002) Bimodal classification of aggression: affective defense and predatory attack. *Aggress Violent Behav*, 7: 237-50
- Yamauchi J, Chan JR, Shooter EM** (2003) Neurotrophin 3 activation of TrkC induces Schwann cell migration through the c-Jun N-terminal kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci*, 100(24): 14421-26
- Yanagida M, Hayano T, Yamauchi Y, Shinkawa T, Natsume T, Isobe T, Takahashi N** (2004) Human fibrillarin forms a sub-complex with splicing factor 2-associated p32, protein arginine methyltransferases, and tubulins alpha 3 and beta 1 that is independent of its association with preribosomal ribonucleoprotein complexes. *J Biol Chem*, 279(3): 1607-14
- Yokota N, Mainprize TG, Taylor MD, Kohata T, Loreto M, Ueda S, Ura W, Grajkowska W, Kuo JS, Rutka JT** (2004) Identification of differentially expressed and developmentally regulated genes in medulloblastoma using suppression subtraction hybridization. *Oncogene*, 23(19): 3444-53
- Zakharov VV, Capony JP, Derancourt J, Kropolova ES, Novitskaya VA, Bogdanova MN, Mosevitsky MI** (2003) Natural N-terminal fragments of brain abundant myristoylated protein BASP1. *Biochim Biophys Acta*, 1622: 14-19
- Zheng J, Shen W, He DZ, Long KB, Madison LD, Dallos P** (2000) Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells. *Nature*, 405(6783): 149-55
- Zheng H, You H, Zhou XZ, Murray SA, Uchida T, Wulf G, Gu L, Tang X, Lu KP, Xiao ZX J** (2002) The prolyl isomerase Pin1 is a regulator of p53 in genotoxic response. *Nature*, 419: 849-53