

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Mari-Anne Härma
Endogeense GDNF-i mõju dopamiini neuronitele
Magistritöö

Juhendajad: PhD Jaan-Olle Andressoo, PhD Viljar Jaks

TARTU 2014

Sisukord

Sisukord	2
Kasutatud lühendid	3
Kirjanduse ülevaade.....	5
Parkinsoni tõbi	5
Basaalganglion ja motokoordinatsioon.....	6
Dopamiini süsteem	7
Nigrastriataalne juhtetee	7
Striatumi rakupopulatsioon ja PV+ interneuronid	9
GDNF	9
Rekombinantne GDNF ja farmakoloogiline perspektiiv	10
Töö eesmärgid.....	11
Materjal ja meetodika	12
Katseloomad	12
Kudede eraldus	12
qPCR.....	12
Immuunohistokeemiline värving	13
Parvalbumiin-positiivsete rakkude lugemine.....	13
Konfokaalmikroskoopia.....	14
Konfokaalpiltide töötlus.....	14
Konfokaalpiltide analüüs	14
Andmete analüüs.....	15
Autori osalus.....	15
Tulemused.....	16
GDNF tase ajus.....	16
Parvalbumiin-positiivsete rakkude kirjeldus.....	17
Parvalbumiin-positiivsete rakkude arv ja asukoht	18
PV+ rakke ümbritsev TH+ fiibrите maht.....	20
DARPP-32 positiivseid rakke ümbritsev TH+ fiibrите maht 0-5 µm distantsil.....	22
Arutelu	23
Kokkuvõte.....	27
Resume	28
Tänuavaldused	29
Kasutatud kirjandus	30
Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks.....	38

Kasutatud lühendid

DA – dopamine (dopamiin)

DARPP 32 - dopamine and cyclic AMP-regulated phosphoprotein

dlSTR – dorso-lateral striatum

dmSTR – dorso-medial striatum

dSTR – dorsal striatum

FSI – fast spiking interneuron

GABA - gamma-aminobutyric acid

GDNF – Glial cell-line derived neurotrophic factor

GDNF 3'UTR-crR - conditionally reversible replacement

L-DOPA - L-3,4-dihydroxyphenylalanine

lSTR – lateral striatum

MSN – medium spiny neurons

MV – mikroskoopiline väli

PV – parvalbumin

SN – substantia nigra (mustollus)

STR - striatum (juttkeha)

TH – tyrosine hydroxylase

vSTR – ventral striatum

Sissejuhatus

Parkinsoni tõbi on neurodegeneratiivne haigus, mis on põhjustatud dopaminergiliste neuronite degeneratsioonist ja selle tagajärjel tekkinud dopamiini defitsiidist striatumis. Praegusel hetkel ei ole Parkinsoni tõvele ravi ning teraapias keskendutakse peamiselt dopamiini hulga suurendamisele, mis on pikemas perspektiivis väheefektiivne ja riskantne.

Neurotroofsed faktorid, nagu GDNF (Glial cell-line derived neurotrophic factor), võivad tagada efektiivse teraapia neurodegeneratiivsetele haigustele läbi dopamiini süsteemi kaitsvate omaduste. Kuna on teada, et dopamiini neuronite kahjustused kutsuvad esile endogeense GDNF ekspressiooni suurenemist ning eksogeense GDNF-i süstimine ajju kutsub esile dopaminergiliste neuritide vohamise GDNF-i süstimiskoha suunas, siis selle töö käigus vaadati, kas endogeense GDNF-i üleekspressioon on piisav, et kutsuda esile muutusi striatumis dopaminergiliste neuronite aksonites.

Kasutasime mudellooma, kellel on ühe alleeli GDNF 3'UTR ette kloonitud Puro-TK-bGHpA kassett, mis takistab GDNF mRNA 3'UTR regiooni transkriptsiooni, vähendab seeläbi GDNF-i mRNA degradatsiooni ja suurendab GDNF-i ekspressiooni. Kuna hiljuti näidati, et 95% GDNF ekspresseerivatest rakkudest striatumis on parvalbumiin positiivsed GABAergilised interneuronid, siis käesolevas töös keskendusime GDNF-i mõjule dopamiini neuronite aksonitele, striatumis parvalbumiini ekspresseerivate rakkude läheduses ja kirjeldasime parvalbumiini ekspresseerivate rakkude populatsiooni.

Töö teostati Helsingi ülikooli Biotehnoloogiainstituudis, prof. Mart Saarma molekulaarse neuroteaduste töögrupis vahemikus juuni 2013-mai 2014.

GDNF, dopamiin, striatum, parvalbumiin, motokoordinatsioon

Kirjanduse ülevaade

Parkinsoni tõbi

Parkinsoni tõbi on levinuim liikumishäiret põhjustav krooniline neuroloogiline haigus, mida põeb umbes üks protsent üle 60 aasta vanustest inimestest. Ülemaailmne Tervishoiuorganisatsioon (WHO) käsitleb Parkinsoni tõbe kui tõsist tervishoiuprobleemi vananevates populatsioonides, mis põhjustab koormust ühiskonnale ja vajab järjest suurenevaid tervishoiuressursse (Janca 2002, Olesen ja Leonardi 2003).

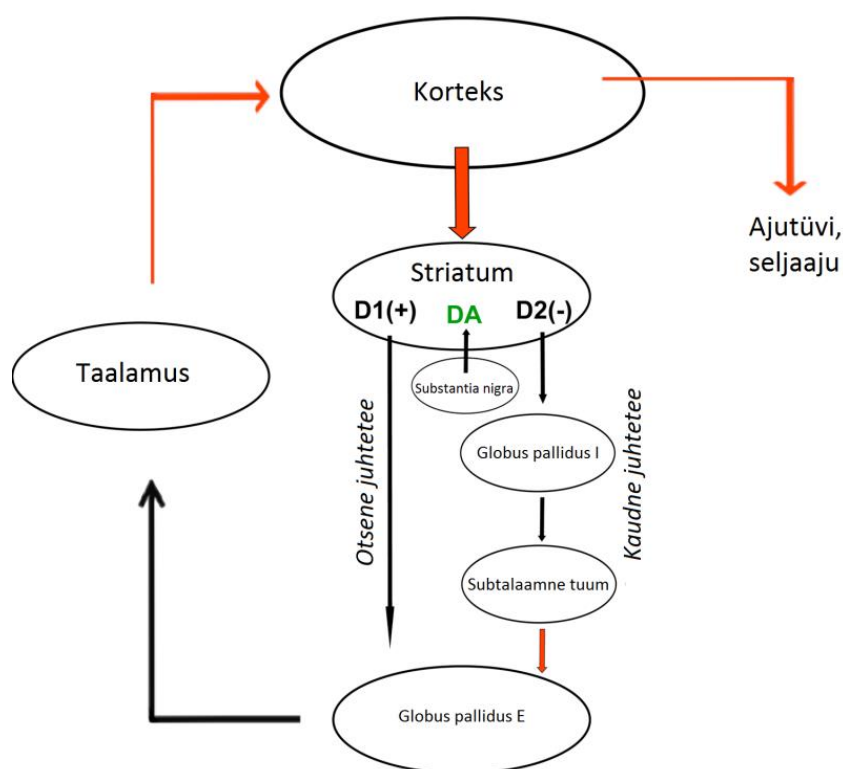
Parkinsoni tõbi on olemuselt neurodegeneratiivne haigus, mis on tingitud basaalganglionide kahjustusest ning mille juhtivaks patoloogiliseks muutuseks on substantia nigra (SN) dopaminergiliste neuronite degeneratsioon. Neurodegeneratsiooni tulemusena tekib dopamiini (DA) defitsiit nigrostriataalsetes juhteteedes ning kaasuvad muutused teistes neuroanatomilistes struktuurides ja neurotransmittersüsteemides (Yanagisawa 2006).

Praegusel hetkel ei ole Parkinsoni tõvele ravi, ning kuna Parkinsoni tõve neuropaalsete sümptomite põhjuseks peetakse DA puudust (Carlsson 1959), siis teraapias keskendutakse peamiselt DA hulga suurendamisele. Ühe näitena kasutatakse DA agoniste, mille manustamisel stimuleeritakse dopamiini retseptoreid, seeläbi suurendades mootorset aktiivsust. Meetod on väheefektiivne ja võib põhjustada kõrvalnähte nagu segadus ja psühhoos. Tõenäoliselt on nende kõrvalnähtude põhjuseks retseptorite stimulatsioon, mis tavaliselt DA poolt mõjutatud ei ole. Kõige levinumalt on Parkinsoni teraapias kasutusel L-DOPA, DA prekursor, mis läbib hematoentsefaalse barjääri ning muudetakse ajus DA-ks. L-DOPA taastab esialgselt motoorsed funktsioonid, kuid pikemaajalisel kasutamisel tema toime kaob (Granéus 1978). Lisaks on näidatud, et enamusel patsientidest esinevad kõrvaltoimed nagu kõikumised motoorses võimekuses ja tahtmatud liigutused (Ahlskog ja Muentner 2001) mis viitab DA seni teadmata mehhanismidele. Kokkuvõtlikult on käesolevalt kasutatavad meetodid väheefektiivsed ja riskantsed. Seetõttu on hakatud tähelepanu pöörama DA süsteemi kaitsmisele ja neurotroofsetele faktoritele, mille abil oleks võimalik ohutumalt ja efektiivsemalt vähendada Parkinsoni tõve ja teiste neurodegeneratiivsete haiguste sümptomeid.

Basaalganglion ja motokoordinatsioon

DA roll Parkinsoni tõves on tihedalt seotud motokoordinatsiooni regulatsiooniga ajus. Normaalse, tahtliku liikumise kontrollis on oluline roll basaalganglionitel. Ilma basaalganglionitest tuleneva informatsioonita, ei ole korteksil motoorse kontrolli üle võimu. Basaalganglionite hulka kuuluvad striatum, globus pallidus, substantia nigra ja subtalaamne tuum.

Kõik korteksi alad mis on seotud liikumise planeerimise ja teostamisega, saavad info striatumisse (STR) läbi ergutava virgatsaine - glutamaadi. STR neuronid aktiveeruvad, väljastades inhibitoorset virgatsainet GABA (gamma aminovõihape), mis läbi inhibeeritakse globus pallidus. Globus palliduse inhibeerimine põhjustab motoorse taalamuse ja subtalaamse tuuma innervatsiooni suurenemise ehk dis-inhibitsiooni mis viib, kas otseselt aktiivsuse suurenemiseni taalamusel ja motoorsel korteksil või kaudselt, läbi subtalaamse tuuma, motoorse korteksi inhibeerimiseni (Bentivoglio ja Morelli 2005) (Joonis 1). Kokkuvõtlikult suurendab otsene juhteteel motoorset aktiivsust ja kaudne juhteteel inhibeerib motoorset aktiivsust ning DA sisendist ja retseptoritest sõltub, milline juhteteel aktiveeritakse.



Joonis 1 Basaalganglioni neuroregulatsioon, DA ja GABA on tähistatud mustade joontega ning glutamaat punaste joontega.

Dopamiini süsteem

DA on katehoolamiinide perekonda kuuluv virgatsaine, mille funktsioone vahendavad viite tüüpi retseptorid (D_1 - D_5). STR-le on omane kahe retseptori tüübi (D_1, D_2) koekspressioon, millest D_1 aktiveerib STR neuroneid, olles osa otsese juhtetee mehhanismidest ning D_2 inhibeerib, olles kaudse juhtetee osaks. Dopamiini sisendil aktiveeritakse otsene juhtetee, mis suurendab motoorset aktiivsust ja inhibeeritakse kaudne juhtetee, mis inhibeerib motoorset aktiivsust. Kokkuvõtlikult on dopamiini efekt suurendada motoorset aktiivsust (West ja Grace 2002, Bentivoglio ja Morelli 2005). Lisaks osalevad D_1 ja D_2 DA retseptorid kognitiivsuse (tunnetusliku) ja afektiivsuse (emotsionaalse) ning DA neuroendokriinses kontrollis (Fremeau *et al.*, 1991) ning on ekspresseeritud STR-i GABA ekspresseerivatel neuronitel (Le Moine *et al.*, 1990, 1991).

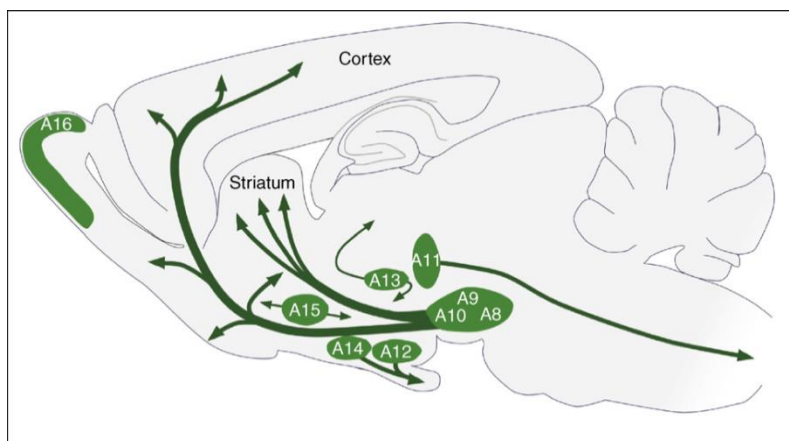
Dopaminergilisi rakke saab identifitseerida, kasutades näiteks imuunohistokeemilist värvingut DA sünteesi kiirust ja hulka kontrollivale ensüümile türosiini hüdroksülaas (TH). Keskajus esineb kolme tüüpi DA neuroneid (Joonis 2), substantia nigra (SN) A9 neuronid, mis innerveerivad STR (mesostriataalne e. nigrastriataalne innervatsioon), ventraalse tegmentaalse ala A10 neuronid, mis innerveerivad kortikaalseid keskuseid ja limbilist süsteemi (mesolimbiline ja mesokortikaalne innervatsioon) ning retrobruraalse ala A8 neuronid, mida loetakse A9 grupi jätkuks, kuna A8 grupi rakud ei ole selgelt piiritletavad (Dahlström ja Fuxe 1964). Kuna STR peetakse keskseks motokoordinatsioonis osalevaks alaks, siis on SN A8 ja A9 neuronid suurema tähelepanu all.

Nigrastriataalne juhtetee

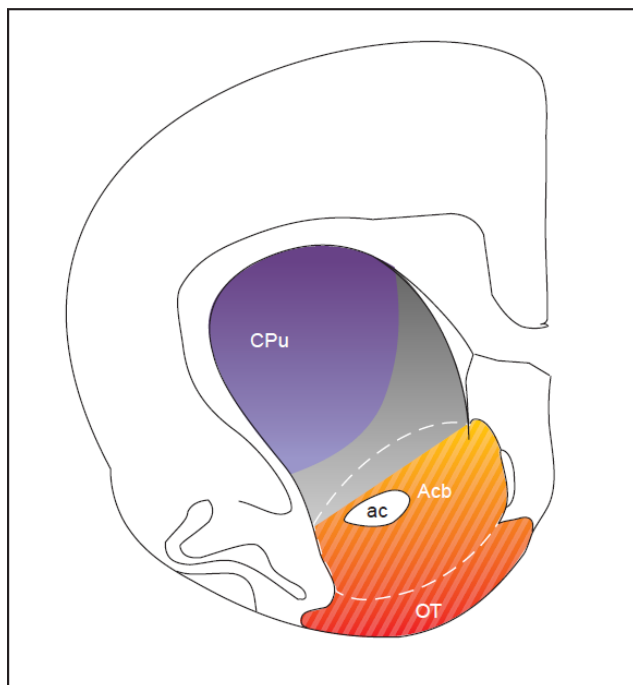
SN jaguneb kolmeks, substantia nigra pars compacta (SNc), substantia nigra pars reticulata (SNr) ja substantia nigra pars lateralis (SNl). SNc iseloomustavad tihedalt asetsevad neuronid (compacta lad k kompaktned) ning SNr hõre rakupopulatsioon põimunud fiibriga (reticulata lad k võrk). SNl koosneb väikesest neuronite hulgast SN rostraalses ja dorsolateraalses osas SNc rakud on jaotatud kaheks tüübiks, väikesed interneuronid (sooma diameeter 10-12 μm) ning suuremad neuronid (sooma diameeter 15-20 μm), mis moodustavad peamise SN väljundi (Bentivoglio ja Morelli 2005). Parkinsoni tõvele iseloomulikku kliinilist motoorset väärtalitlust seostatakse peamiselt dopamiini hulga vähenemisega STR-s, mis järgneb suurte dopaminergiliste neuronite kadumisele SNc (Björklund ja Dunnett 2007). Klassikalise käsitluse kohaselt, algab nigrastriataalne innervatsiooni rada SNc

neuronitest ning on peamine innervatsiooni allikas STR sensoormotoorsele alale, mis kontrollib mootorset käitumist (Lindvall ja Björklund 1983).

Striatum jagatakse mõtteliselt kaheks, dorsaalne (dSTR) ja ventraalne striatum (vSTR). Histoloogiliselt ja immuunohistokeemiliselt ei ole kahe striatumi osa vahel selgeid piire. dSTR loetakse sensimotoorseks alaks, mida innerveerivad A8 ja A9 grupi DA neuronid ning vSTR loetakse limbiliseks alaks (oranž ja hall ala) mida innerveerivad A10 DA neuronid (Joonis 3) (Gerfen *et al.*, 1987, Voorn *et al.*, 2004).



Joonis 2 Peamised dopaminergiliste raku-gruppide väljundid (Björklund ja Dunnett 2007).



Joonis 3 Striatumi jaotus. Sensimotoorne ala on tähistatud lillaga, limbiline ala on tähistatud oranži ja halliga (Voorn *et al.*, 2004). Dorsaalse ja ventraalse striatumi piir jookseb halli ja oranži ala vahel, osade käsitluste kohaselt loetakse piiriks ka ülemist, valge katkendjoonega tähistatud ala.) CPu (caudate putamen), Acb (nucleus accumbens), OT (olfactory tubercle), ac (anterior commissure).

Striatumi rakupopulatsioon ja PV+ interneuronid

STR-i arvukaim rakupopulatsioon on GABA-ergilised, keskmised ogalised neuronid (MSN), moodustades rohkem kui 90% kogu kohalikust rakupopulatsioonist. Ülejäänud >10% on GABA-ergilised interneuronid ja kolinergilised interneuronid. STR-s on teadaolevalt kolm klassi GABA-ergilisi interneuroneid: parvalbumiin-positiivsed (PV+), kalretiniin-positiivsed (CAL+), somatostatiini (SOM)/neuropeptiid Y (NPY)/lämmastikoksiid süntaasi (NOS) sisaldavad interneuronid (Kawaguchi *et al.*, 1995).

STR-i GABA-ergiliste interneuronite kohta avaldatud informatsioon on tagasihoidlik, nende hulgast on kõige paremini kirjeldatud PV+ interneuronid mis moodustavad 0.7-1% STR-i neuronitest (Luk ja Sadikot 2001).

PV+ interneuronid sünteesivad ja vabastavad suures koguses GABA ja kuuluvad fast-spiking GABA-ergiliste interneuronite kategooriasse (FSI) (Kawaguchi *et al.*, 1987, 1993). PV+ interneuronite sünaptid paiknevad MSN neuronite soomal ja proksimaalsetel neuriitidel (Bennett ja Bolam 1994), inhibeerides ümbritsevat MSN rakkude võrgustikku läbi GABA sisendi (Mallet *et al.*, 2005). DA stimuleerib FSI aktiivsust (Bracci *et al.*, 2002) mis omakorda inhibeerib ümbritsevaid MSN rakke, ning dopaminergilise innervatsiooni vähenemine toob kaasa MSN aktiivsuse suurenemise (Tseng *et al.*, 2001). MSN aktiivsus on suurenenud näiteks generaliseerunud epilepsia hoogude ajal (absaansid) (Slaght *et al.*, 2004) ja parkinsoni tõve korral (Mallet *et al.*, 2006, Obeso *et al.*, 2008).

GDNF

1990 ndate alguses kirjeldati gliia neurotroofne faktor (GDNF), eesmärgiga karakteriseerida neurotroofsed faktorid mis toetaksid dopaminergiliste neuronite ellujäämist. GDNF on transformeeriv-kasvufaktor beeta perekonna liige ja kuulub GDNF ligandide alampererkonda. GDNF puhastati roti glioomi rakkudest (B49) ja näidati, et see toetab keskajust eraldatud DA neuronite ellujäämist (Lin *et al.*, 1993) ja aksonite väljakasvu (Rosenblad *et al.*, 1996, Granholm *et al.*, 1997, Yurek 1998). Järgnevalt leiti, et GDNF ei ole aju spetsiifiline, toetades seljaajust eraldatud mootor-neuronite ellujäämist, ning rakkude elulemus on sõltuv GDNF kontsentratsioonist (Henderson *et al.*, 1994). Veel enam, lisaks neuronaalsele koele, ekspresseeritakse GDNF-i ka arenevas perifeerses koes, nagu neerus ja testises (Trupp *et al.*, 1995, Yamamoto *et al.*, 1996) ning GDNF knock-out hiirtel ei arene neerusid, emakat ja enteerilist närvisüsteemi (Moore *et al.*, 1996, Pichel *et al.*, 1996, Sanchez *et al.*, 1996) näidates, et GDNF ei ole mitte neurotroofne faktor vaid üldisemalt, troofne faktor.

GDNF-i toodetakse STR-s peamiselt PV+ interneuronites, millest 95% ekspresseerivad GDNF-i, ning transporditakse retrograadselt keskaju DA neuronitesse (Stömberg *et al.*, 1993, Tomac *et al.*, 1995b, Hidalgo-Figueroa 2012). GDNF-i vähenenud ekspressioon mõjub DA neuronitele nõrgestavalt ja kiirendab DA rakkude suremist (Boger *et al.*, 2006,2007,2008) ning DA neuronite vigastused kutsuvad esile GDNF ekspressiooni suurenemist (Hanbury *et al.*, 2003; Saavedra *et al.*, 2008). Lisaks neuroneid kaitsvale toimele, on näidatud, et GDNF suurendab DA vabastamist (Hebert *et al.*, 1996, Pothos *et al.*, 1998, Xu ja Dluzen 2000), tõenäoliselt läbi suurenenud dopaminergiliste terminalide tekkimise (Bourque ja Trudeau 2000). Kokkuvõtlikult toetab GDNF läbi erinevate signaaliradade rakkude ellujäämist, proliferatsiooni, neurogeneesi ja suurendab DA vabastamist.

Rekombinantne GDNF ja farmakoloogiline perspektiiv

GDNF-i kaalutakse kliiniliseks kasutuseks DA neuronite ellujäämist toetavate omaduste pärast (Kirik *et al.*, 2004, Pascual *et al.*, 2008). GDNF-i süstimine Parkinsoni tõvega patsientide STRi viib allesjäänud DA neuriitide vohamise ja dopamiini üleskorje suurenemiseni, mis seeläbi parandab motoorset võimekust (Gill *et al.*, 2003, Love *et al.*, 2005, Slevin *et al.*, 2005). Samas on näidatud, et GDNF-i süstimine ei anna soovitud efekti ja tekitab GDNF-i vastaste antikehade moodustumist (Lang *et al.*, 2006), mis võib osaliselt olla põhjustatud valgu rekombinantsest iseloomust ning ebasoodsast ülekandesüsteemist.

GDNF kasutamine võib tagada efektiivse ravi neurodegeneratiivsetele haigustele, kuid rekombinantne polüpeptiid ei ole tõhus farmakoloogiline toimeaine, kuna intravenoosel manustamisel ei läbi see hematoentsefaalset barjääri ning süstimisel ajju, seondub heparaan sulfaatidega ekstratsellulaarses maatriksis, vähendades difusiooni efektiivsust (Bespalov ja Saarma 2007). Lisaks võib rekombinantne polüpeptiid põhjustada põletikku ja GDNF vastaste antikehade moodustumist. Samuti tuleb tähelepanu pöörata mehhanismidele, mille abil valgu ajju viiakse (Chtarto *et al.*, 2006).

Üheks võimaluseks on GDNF-i ekspresseerida in vivo geeniteraapia abil (Kordower 2003) mis on vähem invasiivne kui korduv süstimine ning võimaldab bioloogiliselt sünteesitud ja sekreteeritud GDNF-i manustamist. Teisteks võimalusteks võimalus on kasutada GDNF-i prekursoreid (Nevalaita ja Saarma 2008), GDNF-i sünteesivate rakkude siirdamist striatum (Minguez-Castellanos *et al.*, 2007) või endogeense GDNF-i sünteesi suurendamist (Hidalgo-Figueroa *et al.*, 2012).

Töö eesmärgid

- kvantifitseerida GDNF-i tase aju eri osades
- karakteriseerida GDNF-i ekspresseerivad rakud striatumis, kasutades GDNF-i markerina parvalbumiini
- hinnata kas GDNF-i üleekspressioon suurendab dopamiini neuronite ja parvalbumiin-positiivsete rakkude vahelisi neuronaalseid ühendusi

Materjal ja meetodika

Katseloomad

Katseloomad olid GDNF 3'UTR-crR (conditionally reversible replacement) heterosügootsed hiired ja samast pesakonnast, samasoolised metsiktüüpi hiired (129Ola/C57bl6/ICR segunenud taustaga), edaspidi vastavalt GDNFh +/- ja GDNFh +/+. Loomad elasid Helsingi Ülikooli vivaariumis, 20-22°C juures, 12/12 tunnises valgus-pimedus tsüklis. Valgustsükkel algas kell 06.00. Loomad elasid 2-5 looma puuri kohta, piiramatu juurdepääsuga toidule ja veele. Kõik loomkatsed on tehtud Soome riikliku loomkatsete nõukogu loal (ESAVI/6138/04.10.03/2011).

Kudede eraldus

Katseloomad, vanuses 12-14 nädalat, surmati dekapitatsiooni läbi, aju eraldati 60 sekundi jooksul ja jahutati jääkülmas füsioloogilises lahuses. Aju asetati aju-maatriksile (Stoelting, Wood Dale) ning jagati ziletiterade abil osadeks (bregmaalselt 1.8-0.2mm). dSTR eraldati korpus callosumi alt, kasutades koe perforaatorit (sisemine diameeter 2mm). Seljaaju eemaldati hüdrostaatilise surve abil, kasutades füsioloogilist lahust. Proovid külmutati kuival jääl ja hoiti -80°C juures kuni töötluseni qPCR jaoks. Immuuntötluse jaoks katseloom uinutati naatrium pentobarbitaaliga (100mg/kg, i.p.) ja perfuseeriti intrakardiaalselt PBS-ga. Ajud fikseeriti 4% paraformaldehüüdis, külmutati ja lõigati mikrotoomiga 30 µm kaupa (bregmaalselt 1.34-0.2mm). Krüolõike säilitati 20% sukroosi sisaldavas fosfaatbuhvis -20°C juures kuni immuuntötluseni.

qPCR

Hiire ajuosadest eraldati RNA, kasutades homogeniseerimiseks 500µl TRIzol't (Ambien, Life Technologies) ja tootjate standardprotokolli. RNA kontsentratsioon mõõdeti NanoDrop spektrofotomeetriga (ND-1000, Fischer Scientific). RNA kogused jäid olenevalt koest vahemikku 2.5-10 µg ja RNA puhtus valgu suhtes (260/280) oli 1.92-2.02. Proove töödeldi DNase I-ga (Promega), genoomse DNA jääkide eraldamiseks. cDNA sünteesiti tootjate soovitude kohaselt 100-500 ng RNast, kasutades RevertAid pöördtranskriptaasi ja heksameer-praimereid (Thermo scientific). qPCR teostati LightCycler® 480 Reaal-aja PCR Süsteemiga (Roche). Referents geeniks kasutati beeta-aktiini. Iga proovi kohta tehti 3 tehnilist kordust. Praimerite järjestused on välja toodud Tabelis 1.

Tabel 1 qPCR praimerid:

Gdnf	F: cgctgaccagtgactccaatatgc R: tgccgcttgttatctggtgacc
beeta-aktiin	F: ccagttcgccatggatgac R: gagccgtgtcgacgacc

Immuunohistokeemiline värving

Hiire striataalsed 30 µm läbimõõduga fikseerimata krüolõigud värviti standard immuunohistokeemilise meetodi järgi. Lõike hoiti 30 minutit 5% harilikus eesliseerumis (Chemicon, Millipore) ja 0.3% Triton-X100 lahuses. Lõike inkubeeriti üleöö +4°C juures parvalbumiini vastase jänese antikehaga, lahjendusel 1:1000 (PV25, Swant) ja türosiin-hüdroksülaasi vastase lamba antikehaga, lahjendusel 1:200 (AB1542, Chemicon, Millipore). Järgmisel päeval inkubeeriti lõike 90 minutit toatemperatuuril, Dylight 488 jänese antikehade vastase eesli antikehadega, lahjendusel 1:400 (711-485-152, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) ja Alexa Fluor 568 jänese antikehade vastase eesli antikehadega, lahjendusel 1:400 (A-21099, Molecular probes, Life Technologies Corporation).

DARPP32/TH värving teostati sama protokolliga järgi, kasutades järgnevaid primaarseid antikehasid: DARPP-32 vastane kitse antikeha, lahjendusel 1:500 (AF6259, R&D systems Inc.) ja TH vastane jänese antikeha, lahjendusel 1:1000 (AB152, Chemicon, Millipore). Sekundaarsete antikehadena kasutati eelnevalt mainitud Dylight 488 konjugeeritud antikeha ning Alexa Fluor 568 kitse antikehade vastast eesli antikeha, lahjendusel 1:400 (A-11057, Molecular probes, Life Technologies Corporation).

Peale värvingut kaeti lõigud ProlongGold tuhmumist vähendava fikseerimisvahendiga (P36930, Molecular probes, Life Technologies Corporation) ja 15mm kattedklaasiga ning lasti kuivada 24 tundi pimedas, +4°C juures.

Parvalbumiin-positiivsete rakkude lugemine

PV+ rakkude lugemine teostati looma genotüübi suhtes pimendatult. Loendamisel kasutati kahte 1.34-0.2mm bregmaalselt mõõdetud striataalset lõiku ühe looma kohta. PV+ rakud loeti 40x objektiiviga (Olympus BX61 (Olympus Optical, JP)) mikroskoopilise välja kaupa (diam. 0.55mm) mööda corpus callosum'it mediaalselt lateraalse küljeni, kasutades striatumi ventraalseks piiriks anterior commissure'i. Dorsaalne ja lateraalne stratumi ala defineeriti viie

mikroskoopilise välja abil, ventraalne striatum defineeriti viie kuni seitsme mikroskoopilise välja abil. Andmed on esitatud raku tihedusena mikroskoopilise välja kohta. Lõigud, millel striatumi piirkond oli kahjustatud, jäeti analüüsist välja.

Konfokaalmikroskoopia

PV+ ja DARPP-32+ rakud valiti koelõigu keskmisest osast ja samast või lähedasest tasapinnast, et vähendada värvingust tingitud järske intensiivsuse muutusi. Pildid tehti toatemperatuuril, laser-skaneeriva konfokaalmikroskoobiga Zeiss LSM 700 (LCI Plan-Neofluar 63x/1.30 Imm Corr) Carl Zeiss Microscopy GmbH)) kasutades lasereid 555 nm/10mW ja 488 nm/10mW. Piltide tegemisel kasutati järgnevaid parameetreid: mikromeetrilise ava väärtus 1 AU, kaadri suurus 992x992 μ m, bitisügavus 12 Bit, suurendus 1.3, skaneerimise intervall 0.38 μ m, skaneerimise kiirus 7, laseri võimsus 1-2% (optimaalne) ja gain 750-900v (optimaalne). Laserivõimsus ja gain valiti vastavalt lõigu intensiivsusele, varieerudes lõikude vahel, kuid mitte ühe lõigu siseselt. Rakke pildistati ühe korra, et vältida pildi pleekimist ja signaali vähenemist. Analüüsist jäeti välja pildid kus esines silmnähtav vahe intensiivsusel ühe fokaaltasandite virna sees; kui TH+ fiibrites esinesid koetöötlemisest katked või füsioloogiliselt iseloomulikud fiibrite vaesed alad (tõenäoliselt naabruses asetsevate rakkude poolt hõivatud alad või veresooned).

Konfokaalpiltide töötlus

Konfokaalpildi formaat muudeti sobilikuks edasise töötlemise, pildi kvaliteedi parandamise ja müra vähendamise eesmärgil, kasutades Imarise tarkvara (Imaris File Converter, Bitplane AG). Müra eraldamiseks soovitud signaalist, kasutati standard algoritmidel põhinevat dekonvolutsiooni tarkvara (AutoQuant X3, Media Cybernetics, Inc.). Dekonvolutsiooni seaded valiti vastavalt konfokaalmikroskoobis kasutatud seadetele, ning olid samad kõigi piltide jaoks.

Konfokaalpiltide analüüs

PV+ rakkude ruumala ja TH+ fiibrite ruumala arvutati kasutades Imarise tarkvara (versioon 7.3, Bitplane AG) ja vastavaid Mathlab-liideseid. PV+ raku pindala loomiseks, piiritleti visuaalne rakukeha ruum, jättes neuriidid loodavast pinnast välja. Absoluutne intensiivus raku pinna loomiseks arvutati automaatse lävendi alusel. Raku pinna detailide loomisel kasutati täpsuseks 0.5 μ m, mis oli fikseeritud kõikidel pildidel. Objektid, mis ei olnud kontaktis raku pinnaga, filtreeriti välja. Loodud pinna alusel arvutati raku ruumala. DARPP-32 positiivsete

rakkude madala intensiivsuse tõttu tehti raku ümber kujutletav ruum, mille pinnalt teostati edasised mõõtmised, DARPP32 raku pinda ei arvestatud ruumala mõõtmiseks.

TH+ fiibrite pinna loomiseks kasutati eelnevalt loodud PV+ rakkude pinda, mille ümber arvutati ala mis ümbritseb rakku 5 μ m, 10 μ m, 15 μ m, 20 μ m, 30 μ m raadiuses. Kauguse mõõtmiseks rakupinnast kasutati Mathlab-liidest. TH+ pinna loomisel kasutati pinna detaili täpsust 0.158 μ m ja tausta lahutusega lokaalset kontrasti, mis arvestas fiibri maksimaalseks läbimõõduks 0.600 μ m. Kohaliku tausta efekti vähendamiseks arvutati taustalahutuse lävi terve pildi TH+ fiibrite keskmise intensiivsuse kohta ja seda keskmist rakendati iga kauguse segmendi jaoks (5,10 jne μ m). 30 voxelist väiksemad objektid filtreeriti välja ning fiibrite ruumala arvutati järelejäänud pinna alusel. Pildid, millel esinesid katked TH+ fiibrite võrgustikus (põhjustatud tõenäoliselt naaberrakkudest ja veresoontest) ja märgatava intensiivsuse gradient (põhjustatud tõenäoliselt värvi ebaühtlasest difundeerumisest läbi koelõigu), arvati analüüsist välja. DARPP 32-positiivseid rakke ümbritseva TH+ fiibrite analüüsiks tehti looma kohta viis pilti ning pildi kohta võeti kolm raku.

Andmete analüüs

qPCR tulemuste analüüsiks lahutati GDNF-i Cp väärtus keskmisest beeta-aktiini Cp väärtusest (saadud funktsioonist Absolute Derivative Max, Lightcycler® 480 Software, 1.5.0 SP1). Saadud dCt väärtus võeti aluseks GDNF kordse erinevuse arutamiseks referents-geeni suhtes (2-dCt). Andmete statistiliseks analüüsiks kasutati Microsoft Excel 2010 ja statistika tarkvara R versiooni 3.02 (R core team, 2014). Analüüsid tehti kasutades pakette stats ja pgirmess. Andmete jaotuse põhjal valiti parameetiline või mitteparameetiline test. Kahe grupi võrdluseks kasutati kas t-testi või Mann-Whitney U testi. Rohkem kui kahe grupi omavaheliseks võrdluseks kasutati dispersioonanalüüsi või Kruskal-Wallis testi. Post-hoc analüüs tehti kasutades Tukey testi (ANOVA korral) või R- funktsiooni kruskalMC (Kruskal-Wallise testi puhul). Graafikutel on kujutatud andmete aritmeetilised keskmised koos SEM (standard error of the mean) Tärnid *, **,***, tähistavad vastavalt $p < 0.05$, 0.005, 0.0005.

Autori osalus

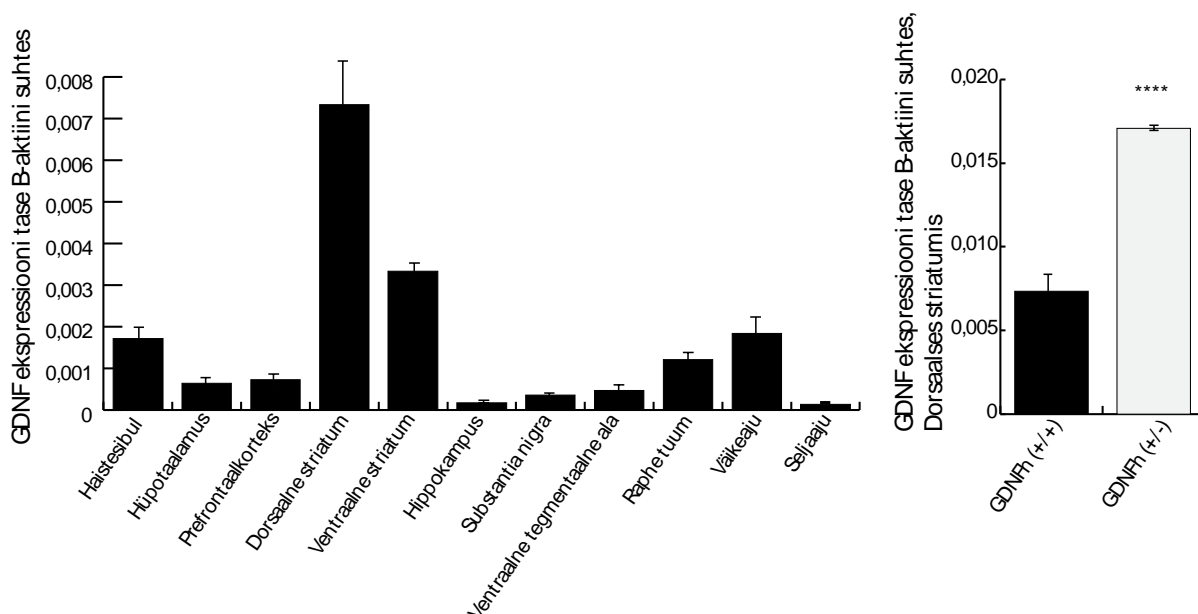
Katseloomade käsitus, kudede eraldamine ning krüolõikude valmistamine on tehtud kogenud kolleegi poolt. Kõik töös kirjeldatud katsed ja katseandmete analüüs on teostatud autori poolt.

Tulemused

GDNF tase ajus

Selleks, et vaadata GDNF ekspressiooni hiire ajus ja kindlaks teha suurenenud GDNFh +/- looma GDNF ekspressioon striatumis, tehti süstemaatiline qPCR analüüs. GDNF mRNA tase oli dorsaalses ja ventraalses striatumis kõrgem kui teistes ajuosades, iga ajuosa kohta kasutati 8 GDNFh ++ looma. GDNF mRNA tase on kujutatud β -aktiini suhtena (Graafik 1).

GDNF mRNA tase GDNFh ++ looma ajus oli keskmiselt kaks korda väiksem $0,007 \pm 0,001$ SEM kui GDNFh +/- looma ajus $0,017 \pm 0,0001$ SEM (GDNFh ++ n=8; GDNFh +/- n=4; T-test: $p < 0,0001$) (Graafik 1)

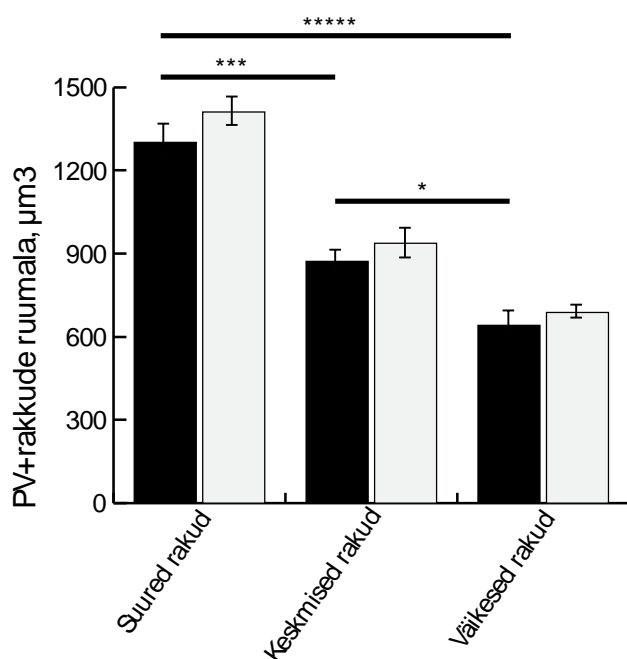


Graafik 1 vasakul, GDNF mRNA GDNFh ++ ajus; paremal, GDNF ekspressiooni võrdlus GDNFh ++ ja +/- looma dorsaalses striatumis.

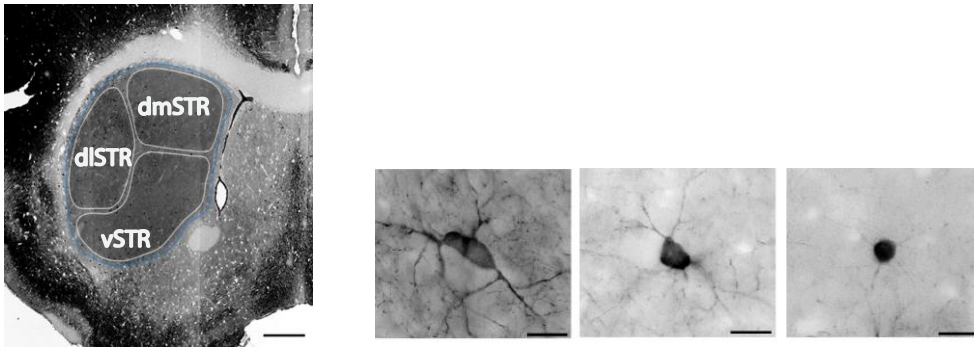
Parvalbumiin-positiivsete rakkude kirjeldus

GDNF3'UTR-Cre heterosügootse looma ja metsiktüüpi looma striatume võrreldi neuronite asukoha ja morfoloogia hindamiseks. PV+ rakke võis jagada kolme alamgruppi nende suuruse järgi (Joonis 4). Suured rakud, massiivse neuriitide võrgustikuga ja rakukeha suurusega GDNFh $+/+$ loomal keskmiselt $1300,1 \pm 65,6 \mu\text{m}^3$ (n=5; 20 rakku) ja GDNFh $+/-$ loomal $1409,8 \pm 51,3 \mu\text{m}^3$ (n=7; 29 rakku). Keskmised rakud, ümara rakukehaga, tagasihoidliku neuriitide võrgustikuga, GDNFh $+/+$ loomal suurusega $872,4 \pm 53,1 \mu\text{m}^3$ (n=5; 17 rakku) ja GDNFh $+/-$ loomal $938,2 \pm 39,8 \mu\text{m}^3$ (n=7; 39 rakku). Väikesed rakud, ümara rakukeha ja tagasihoidliku neuriitide võrgustiku GDNFh $+/+$ loomal suurusega keskmiselt $640,987 \pm 44,333 \mu\text{m}^3$ (n=5; 27 rakku) ja GDNFh $+/-$ loomal $686,8 \pm 23,3 \mu\text{m}^3$ (n=7; 27 rakku).

Grupid olid suurusjärkude poolest üksteisest erinevad (GDNFh $+/+$ ANOVA, $F=42,41$; $p<0,001$), kuid grupi siseselt ei olnud rakusuurstel erinevust GDNFh $+/+$ ja GDNFh $+/-$ loomade vahel (Graafik 2).



Graafik 2 PV+ rakkude ruumala võrdlus GDNFh $+/+$ ja $+/-$ looma dorsaalses striatumis. GDNFh $+/+$ tähistatud mustaga, GDNFh $+/-$ tähistatud halliga.



Joonis 4 Striatumi jaotus; PV+ rakud suuruse järgi. Mõõtkava vastavalt 500 μm ja 20 μm .

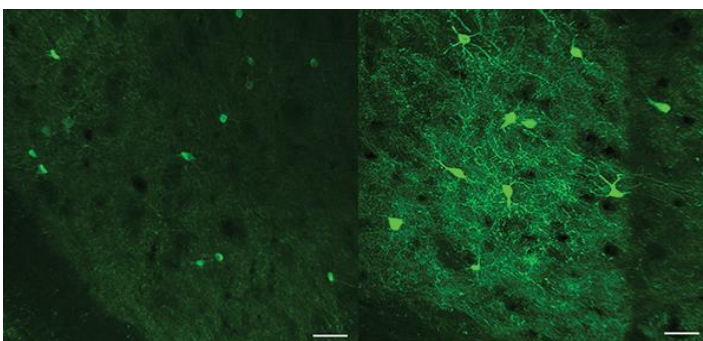
Parvalbumiin-positiivsete rakkude arv ja asukoht

Selleks, et vaadata PV+ rakkude arvulist erinevust GDNFh +/- ja GDNFh ++ loomades, loeti kokku nelja GDNFh ++ looma rakud ja seitsme GDNFh +/- looma rakud. Iga looma kohta võeti aritmeetiline keskmine kahe koelõigu, kahelt STR poolelt. Ühe looma kohta loeti keskmiselt 52 mikroskoopilist välja (MV). GDNFh ++ looma keskmine PV+ rakkude arv oli $8,9 \pm 0,4$ rakku/MV ja GDNFh +/- loomal $9,1 \pm 0,6$ rakku/MV. Genotüüpide vahel ei esinenud erinevust rakkude koguarvus (Graafik 3).

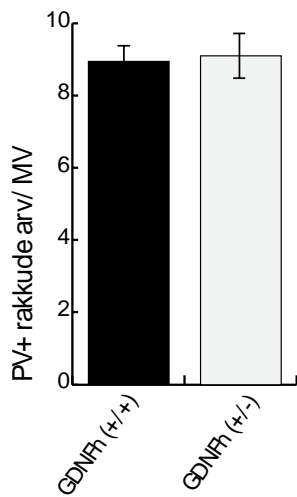
Kõige arvukamalt leidus väikeseid rakke ning suuri rakke esines kõige harvem (Graafik 4).

Suured ja keskmised rakud GDNFh ++ loomadel olid arvukamad dorsolateraalses striatumis osas (dlSTR), väikesed rakud olid jaotunud ühtlasemalt, ja rakkude keskmine arvukus eri erinenud statistiliselt olulisel määral (suured rakud: ANOVA $F=5,256$; $p=0.03$; keskmised rakud: ANOVA $F=12,55$, $p=0.002$) (Joonis 4, Graafik 4).

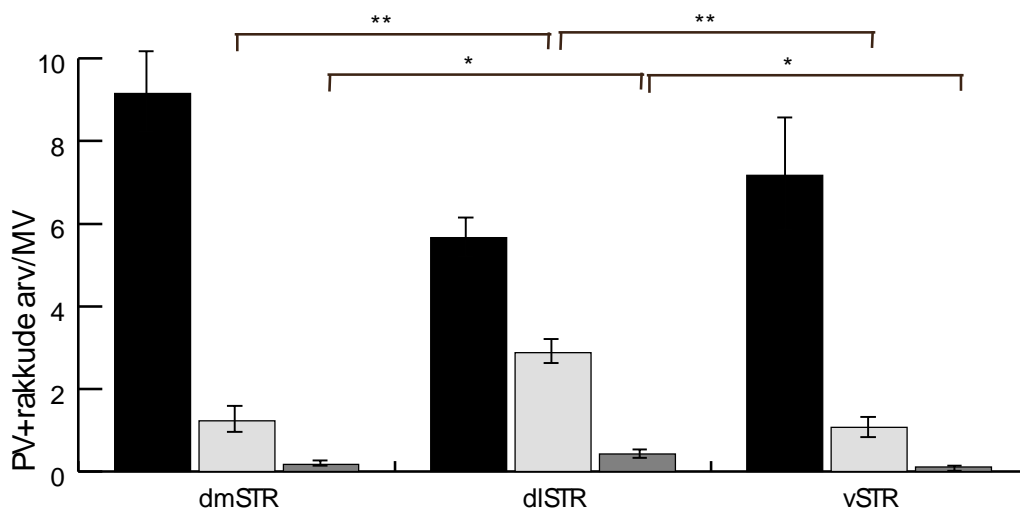
Suurte rakkude arv dlSTR on GDNFh +/- loomal suurem võrreldes GDNFh ++ loomaga (ANOVA $F=2,617$, $p=0.04$) (Graafik 5, Joonis 5).



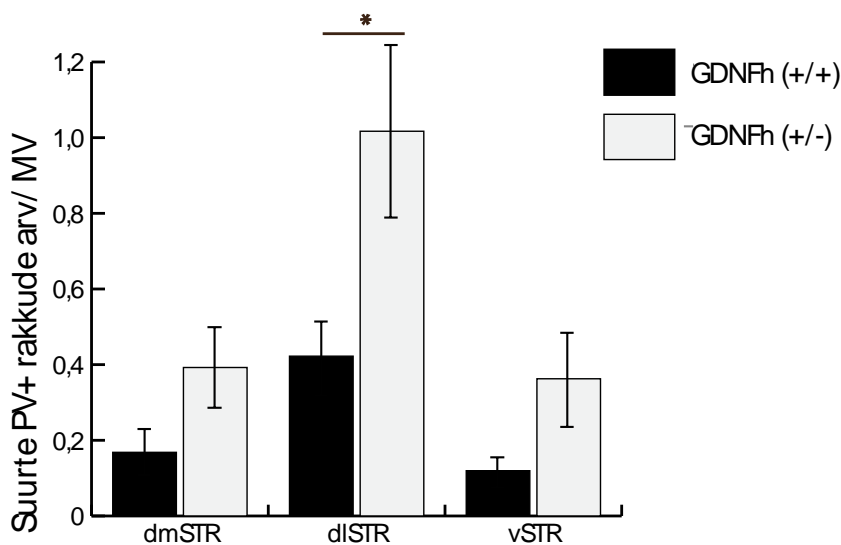
Joonis 5 Suured PV+ rakud GDNFh ++ (vasakul) ja GDNF +/- looma (paremal) dlSTR-s. Mõõtkava 50 μm .



Graafik 3 PV+ rakkude koguarvu võrdlus GDNFh +/+ ja +/- looma striatumis.



Graafik 4 Rakkude arvuline jaotumine GDNFh +/+ looma striatumis. Väikesed rakud on tähistatud mustaga, keskmised rakud hele halliga, suured rakud tumehalliga; tärnid tähistavad Tukey testi tulemusi.

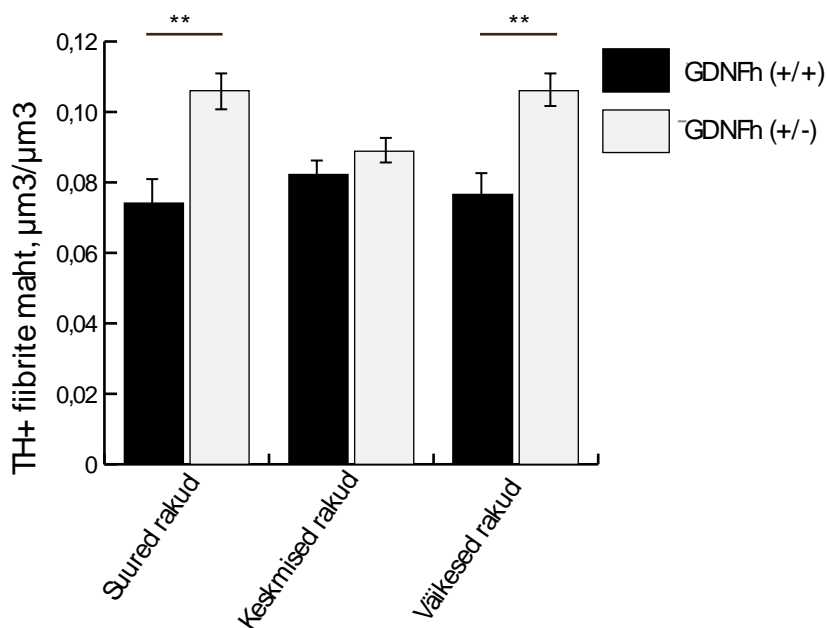


Graafik 5 Suurte PV+ rakkude jaotumine striatumis. GDNFh +/+ tähistatud mustaga, GDNFh +/- tähistatud halliga; ; tärn tähistab Tukey testi tulemust.

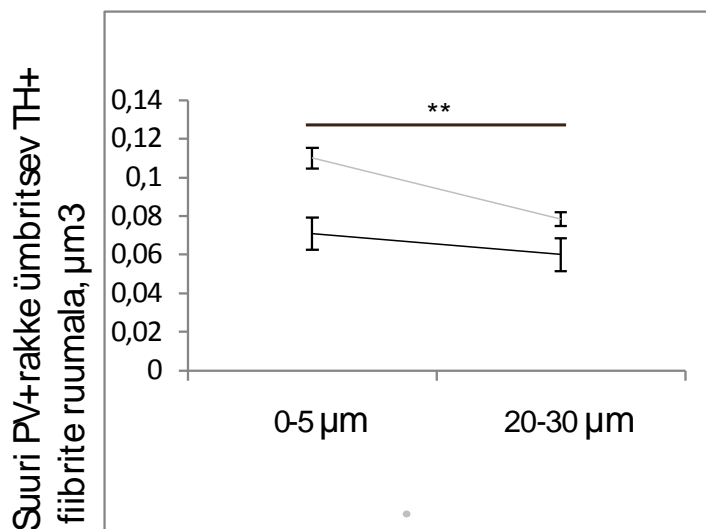
PV+ rakke ümbritsev TH+ fiibrите maht

Selleks, et vaadata GDNF-i eksprepeerivate rakkude mõju dopaminergiliste rakkude aksonitele, tehti konfokaalmikroskoopiline analüüs. TH+ fiibrите maht ümber GDNFh +/- looma PV+ rakkude, võrreldes GDNFh +/+ loomaga oli suurem (ANOVA $F=7,225$, $p<0.0001$). Suurenenud TH+ maht oli ümber suurte ja väikeste PV+ rakkude, aga mitte ümber keskmiste (GDNFh +/+ n=5, 16 suurt rakku, 18 keskmist rakku, 22 väikest rakku; GDNFh +/- n=7, 20 suurt rakku, 22 keskmist rakku, 24 väikest rakku) (Graafik 6).

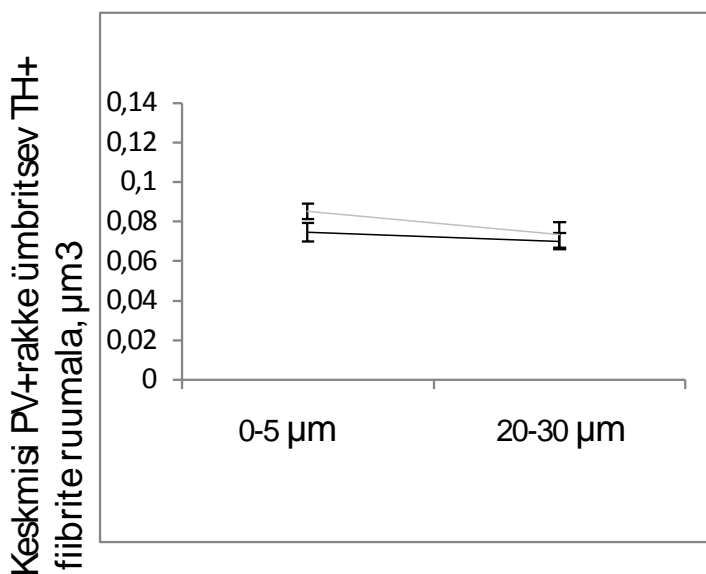
Selleks, et kindlaks teha kas TH+ fiibrите maht langeb distantsi suurenedes, olles raku keha spetsiifiline bioloogiline efekt, mõõtsime TH+ fiibrите mahtu 0-5 μ m ja 20-30 μ m distantsil PV+ raku pinnast. GDNFh +/+ looma suuri rakke ümbritseva TH+ fiibrите ruumala langes 12,4% (n=5, 14 rakku) distantsi suurenedes rakukehast ja GDNFh +/- loomal 28,5% (n=5, 10 rakku, T-test: $p=0.002$). Keskmiste rakkude ümber oli langus vastavalt 6% GDNFh +/+ loomal (n=5, 9 rakku) ja 14,1% GDNFh +/- loomal (n=3, 7 rakku). Väikeste rakkude ümber, GDNFh +/+ loomal, langes TH+ fiibrите maht 2,2% (n=5, 13 rakku) ja GDNFh +/- loomal 24,6% (n=6, 11 rakku, T-test: $p=0.005$). 20-30 distantsil ei olnud genotüüpide vaheliselt TH+ fiibrите mahus erinevust (Graafik 7, Graafik 8, Graafik 9)



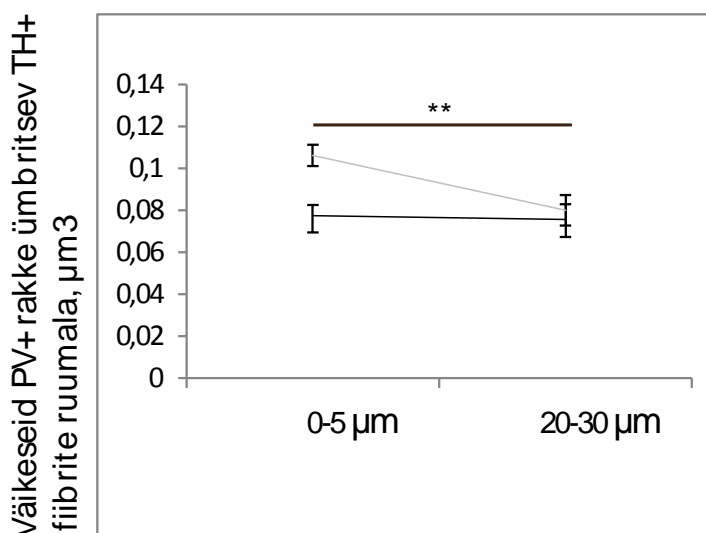
Graafik 6 PV+ rakke ümbritsev TH+ fiibrите maht, 5 μ m raadiuses. GDNFh +/+ tähistatud mustaga, GDNFh +/- tähistatud halliga.



Graafik 7 TH+ fiibrite mahu langus ümber suurte PV+ rakkude, 0-5um ja 20-30 um distantsil. GDNFh +/+ tähistatud mustaga, GDNFh +/- tähistatud halliga.



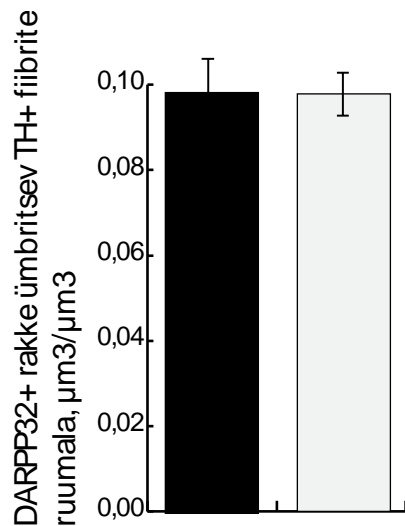
Graafik 8 TH+ fiibrite mahu langus ümber keskmiste PV+ rakkude, 0-5um ja 20-30 um distantsil. GDNFh +/+ tähistatud mustaga, GDNFh +/- tähistatud halliga.



Graafik 9 TH+ fiibrite mahu langus ümber väikeste PV+ rakkude, 0-5um ja 20-30 um distantsil. GDNFh +/+ tähistatud mustaga, GDNFh +/- tähistatud halliga.

DARPP-32 positiivseid rakke ümbritsev TH+ fiibrите maht 0-5 μm distantsil.

Selleks, et kindlaks teha kas TH+ langus on PV+ rakkude spetsiifiline, mõõtsime STR MSN neuroneid (DARPP 32+) ümbritseva TH+ fiibrите mahu. DARPP 32+ rakkude 0-5 μm raadiuses ei esinenud erinevusi GDNFh $+/+$ looma $0,098 \pm 0,0080 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$ (N=3, 45 rakku) ja GDNFh $+/-$ looma $0,097 \pm 0,005 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$ (N=3, 45 rakku) TH+ fiibrите mahus.



Graafik 10 TH+ fiibrите maht ümber DARPP32+ rakkude, 0-5 μm distantsil. GDNFh $+/+$ tähistatud mustaga, GDNFh $+/-$ tähistatud halliga

Arutelu

Gliia neurotroofne faktor (GDNF) on β -kasvufaktorite perekonna liige ja avaldab mõju dopamiini neuronitele ning mootor-neuronitele in vivo (Hoffer *et al.*, 1994, Beck *et al.*, 1995, Kearns *et al.*, 1995). Eksogeense GDNF doseerimine suurendab TH+ rakkude arvu SN-s ja dopaminergiliste neuronite aksonite arvu STR-s, suurendades lokomotoorset aktiivsust (Kirik *et al.*, 2001, Grondin *et al.*, 2002, Palfi *et al.*, 2002, Maswood *et al.*, 2003). Lisaks on näidatud, et GDNF-i transporditakse retrograadselt STR-st SN-sse, toetades SN dopaminergiliste neuronite ellujäämist ja funktsionaalsust (Stömberg *et al.*, 1993, Tomac *et al.*, 1995b, Lapchak *et al.*, 1997, Kirik *et al.*, 2000, Ai *et al.*, 2003, Barroso-Chinea *et al.*, 2005). Kuna eksogeenne GDNF avaldab suurt mõju imetaja dopamiini süsteemile STR-s, siis selle töö eesmärk oli vaadata kas endogeense GDNF-i üleekspressioon omab sarnast efekti.

GDNF-i mRNA tase on kõige kõrgem STR-s, seejärel väikeajus ja haistesibulas (Graafik 1), mis on kooskõlas varasemate tulemustega, näidates, et STR-s on GDNF ekspressiooni tase kõrgem kui teistes ajuosades (Trupp *et al.*, 1997, Hidalgo-Figueroa *et al.*, 2012). SN-s, kus paikneb suur osa DA rakkude kehasid, on GDNF-i mRNA tase oluliselt madalam kui striatumis (Graafik 1), kuid seevastu on GDNF retseptorid rohkem ekspresseeritud just substantia nigras (Trupp *et al.*, 1997) toetades retrograadse transpordi mehhanismi.

Vastupidiselt meie tulemustele on näidatud, et GDNF-i mRNA tase on kõrgem vSTR võrreldes dSTR-ga (Barroso-Chinea *et al.*, 2005). Erinevus võib olla tingitud kasutatud meetodite tundlikkuse erinevusest. Teise võimalusena, kuna dSTR on *corpus callosum*'i alt mõõdetuna 2 mm ja piiritletud *anterior commissure* poolt, ning koe perforaator on sisemise diameetriga 2mm, siis eksimine koeeraldusel võib samuti põhjustada erinevuse mRNA tasemes.

Hiljuti näidati, et 95% GDNF ekspresseerivatest rakkudest striatumis on PV+ GABAergilised interneuronid (Hidalgo-Figueroa *et al.*, 2012). Sellest tulenevalt keskendusime GDNF-i mõjule dopamiini neuronite aksonitele STR-i PV+ rakkude läheduses, kuna puuduvad usaldusväärsed GDNF-i vastased antikehad. Kasutasime looma, kellel on ühe alleeli GDNF 3'UTR ette kloonitud Puro-TK-bGHpA kassett, mis takistab GDNF mRNA 3'UTR regiooni transkriptsiooni, seeläbi vähendab GDNF-i mRNA degradatsiooni ja suurendab GDNF-i ekspressiooni (loommudel on kirjeldatud Andressoo *et al.*, retsenseerimisel). Ootuspäraselt oli GDNF 3'UTR-Cre heterosügootse looma striatumis GDNF mRNA ekspressiooni tase kõrgem kui metsiktüüpi loomas (Graafik 1).

PV+ rakkude iseloomustamisel oli aluseks PV+ rakkude visuaalne jagamine kolmeks alatüübiks, suuruse järgi. Varasemalt on näidatud, et kõige arvukamalt esineb roti STR-s keskmisi rakke (83%) seejärel väikeseid rakke (15%) ja suuri rakke 2% (Cowan *et al.*, 1990). Käesoleva töö käigus kogutud andmete kohaselt olid kõige arvukamad väikesed rakud (77,6%), seejärel keskmised rakud (19,8%) ja suured rakud (2,6%). Erinevused võivad olla põhjustatud loomade liigilisest erinevusest ning kasutatud tehnika erinevustest. Suur osa PV+ väikeseid rakke oli väga madala intensiivsusega ja valgusmikroskoobi väiksemate suurendustega märkamatud. Samuti tuleb arvestada, et rakkude visuaalne suurus võib sõltuda nurgast, mille suhtes rakk koes paiknes, ning osa loendatud väikeseid rakke võis olla koe lõikamisel tekkinud defekt. Rakkude koguarvus ei esinenud genotüüpide vahel erinevusi (Graafik 3), see on kooskõlas varasemalt avaldatud töödega, näidates, et GDNF ei kutsu esile rakkude arvu suurenemist (Lin *et al.*, 1993). Samuti ei olnud erinevust rakkude suurustel GDNFh *+/+* ja GDNFh *+/-* looma vahel (Graafik 2, Graafik 3). Praeguseks ei ole teada kas suured, keskmised ja väikesed rakud on eri tüüpi. Varasemalt on arutletud kahe võimaliku PV+ rakkude alamtüübi üle, tuginedes erinevustele elektrofüsioloogilistes mõõtmistes ja morfoloogilistele erinevustele dendriitides (Koos ja Tepper 1999, Bracci *et al.*, 2003).

PV+ interneuronid ei ole striatumis ühtlaselt distributeeritud, vaid jaotuvad kasvava gradiendina ventraal-doraalses suunas, mediaal-lateraalses suunas ning kaudaal-rostraalses suunas (Mura *et al.*, 2000, Wu ja Parent 2000). Väikesed, vähe intensiivselt värvunud PV+ rakud moodustasid STR dorso-mediaalses sektoris selgelt eristuva populatsiooni, mida pole varem teadaolevalt kirjeldatud. See võib edaspidiselt osutada oluliseks, kuna dmSTR-i seostatakse õppimise ja õppimishäiretega rottidel (Kimchi ja Laubach 2009). Keskmised ja suured rakud paiknevad suuremas osas dlSTR (Graafik 4), mida seostatakse motoorse kontrolliga (Costa *et al.*, 2006). Kokkuvõtlikult annavad need tulemused põhjust uskuda, et klassikaline STR jagamine dSTR ja vSTR on aegunud, ning tugineda tuleks pigem dorso-lateraalsele ja dorso-mediaalsele jagamisele (Voorn *et al.*, 2004). Tuginedes erinevustele PV+ rakkude asetuses ja arvus võib oletada, et GDNF-il on STR-i eri kompartmentide siseselt erinevad funktsioonid, kuna on näidatud, et neuronite suremus võib olla STR-i kompartmentide spetsiifiline (Miller *et al.*, 1999, Sato *et al.*, 2007).

PV+ rakkude jaotus oli mõlemas genotüübis sarnane, selle erinevusega et GDNFh *+/-* looma dlSTR-s oli suuri PV+ rakke rohkem kui GDNFh *+/+* loomas (Graafik 5). Rakke jagati loendamisel rühmadesse ainult visuaalse suuruse alusel, seega ei saa välistada, et suurte rakkude hulk võis olla suurenenud keskmiste rakkude arvelt. Kuna varasemalt on teada, et GDNF ei suurenda kultuuris kasvavate rakkude arvu, aga suurendab rakkude keha ristlõike

pindala (Lin *et al.*, 1993, Burke *et al.*, 1998) ning GDNF osaleb rakkude diferentseerumisel ning indutseerib hüpertroofiat (Orth *et al.*, 1999, Coulpier *et al.*, 2001), siis võib oletada, et osad suured rakud võivad olla suurenenud keskmised rakud. Tulemused viitavad siis GDNF-i ekspresseerivate rakkude autokriinsele regulatsioonile, mis oleksid kooskõlas in vitro tulemustele tuginevatele hüpoteesidele (Cerchia *et al.*, 2006). Selles küsimuses saab selgust, kui vaadata PV+ rakkude arvu vanas GDNFh +/- loomas, et hinnata, kas endogeenne GDNF suudab lisaks DA neuronite elushoidmisele ka toetada PV+ neuronite ellujäämist.

Kuna eksogeense GDNF üleekspressioon kutsub esile dopamiini fiibrите kasvu striatumis (Tomas *et al.*, 1995a, Choi-Lundberg *et al.*, 1997, Rosenblad *et al.*, 1998) ning dopamiini neuronitel on otsene roll moto-koordinatsioonile (Bentivoglio ja Morelli 2005), võib oletada, et kui suurendada endogeenset GDNF ekspressiooni, suureneb TH+ fiibrите hulk ja paraneb motokoordinaatorne võime.

Meie tulemuste kohaselt oli GDNF üleekspressiooni tagajärjel osade PV+ rakkude ümber näha suurenenud TH+ fiibrите mahtu (Graafik 6), mis vähenes distantssi suurenemisel (Graafik 7, Graafik 8,

Graafik 9), näidates, et DA rakkude aksonid on suurenenud ainult PV+ rakkude vahetus läheduses. Kontrolliks olid MSN neuronid, mis ei ekspresseeri GDNF-i (Hidalgo-Figueroa 2012) ja mille ümber puudus suurenenud TH+ fiibrите hulk (Graafik 10). Täpsustamata on, kas suurenenud oli üksiku fiibrите ruumala või kontaktide arv raku pinnaga. Kuna varasemalt on näidatud, et GDNF suurendab dopaminergilisi terminale in vivo (Bourque ja Trudeau *et al.*, 2000) ja põhjustab neuriitide vohamist (Rosenblad *et al.*, 1996, Granholm *et al.*, 1997, Yurek 1998, Gill *et al.*, 2003), siis võib oletada, et tegemist on suurenenud TH+ fiibrите arvuga ümber PV+ rakkude, kuid kas need terminalid ka PV+ rakkudega kontakte moodustasid, ei ole teada. Üheks võimaluseks on vaadelda terminalide kontakte elektronmikroskoobiga või teostada värving DA retseptoritele PV+ rakkudel. Teise variandina saab teha värvingu dopamiini transporterile DAT, kuna on võimalik, et TH transkriptsioon on suurenenud GDNF-i üleekspressiooni tagajärjel ja fiibrите arv pole muutunud (Xiao *et al.*, 2002).

Dopamiini terminalide suurenemise bioloogiline tähendus on mitmeti tõlgendatav. Ühest küljest, suurenenud terminalide arv võimaldab suuremat GDNF retrograadset transporti SN-sse, suurendades DA neuronite arvu SN-s seeläbi suurendades DA sisendit STR-s. Teisest küljest on näidatud, et GDNF suurendab DA molekulide arvu, mida väljastatakse korraga ühe sünapsi kohta (Pothos *et al.*, 1998). Mõlemal juhul on tulemuseks suurenenud DA sisend STR-s.

Kuna GDNF näis omavat efekti ainult PV+ rakkude vahetus läheduses, tekib küsimus, kas DA terminalide suurenemine ümber PV+ rakkude omab suuremat efekti MSN neuronite inhibeerimisel? PV+ interneuronid on suurimad GABA ekspresseerivad neuronid STR-s, kuid ei pruugi olla esmase tähtsusega MSN neuronite inhibeerimisel. Osa dopaminergilisi rakke sünteesib GABA-t (Gonzalez-Hernandes *et al.*, 2001), mida vabastatakse dopamiini terminalidest (Tritch *et al.*, 2012, Nelson *et al.*, 2014) ning 60-70% dopamiini terminalidest ei moodusta STR-s sünaptilisi kontakte (Descarries *et al.*, 1996) viidates PV+ FSI-st iseseisvale, parakriinsele GABA vahendatud MSN inhibitsioonile. Kokkuvõttelikult võib öelda, et GDNF-i üleekspressioon suurendab dopaminergilist sisendit STR-i, kuid kas GDNF-i üleekspressioonil on PV+ rakkude vahendusel mõju motokoordinatsioonile on spekulatsioon, kuid võimalik kindlaks teha erinevate optogeneetiliste meetoditega.

Parkinsoni tõvele on iseloomulik dopaminergiliste neuriitide kadumine vSTR, nii et dSTR jääb peaaegu intaktseks (Miller *et al.*, 1999). Kui olemasolevate DA aksonite funktsionaalsust ja kasvu saab reguleerida läbi dSTR, mis ei ole Parkinsoni tõve poolt mõjutatud ja seeläbi suurendada DA taset STR-s, viitaks GDNF endogeenne üleekspressioon tulevastele terapeutilistele võimalustele.

Kokkuvõte

Parkinsoni tõbi on olemuselt neurodegeneratiivne haigus, mille motoorsed sümptomid avalduvad peale dopaminergiliste neuronite degeneratsiooni, põhjustades striatumis dopamiini defitsiidi. Praegusel hetkel ei ole Parkinsoni tõvele ravi ning teraapias keskendutakse peamiselt DA hulga suurendamisele, mis on pikemas perspektiivis väheefektiivne ja riskantne.

Neurotroofsed faktorid nagu GDNF võivad tagada efektiivse ravi neurodegeneratiivsetele haigustele läbi dopamiini süsteemi kaitsvate omaduste. Kuna on teada, et dopamiini neuronite kahjustused kutsuvad esile endogeense GDNF-i ekspressiooni suurenemise ning eksogeense GDNF-i süstimine ajju kutsub esile dopaminergiliste neuritide vohamise GDNF-i süstimiskoha suunas, võib oletada, et kui suurendada endogeenset GDNF ekspressiooni, suureneb dopamiini sisend ja paraneb motokoordinaatorne võime.

Käesolevas töös kasutati mudellooma, kelle striatumis on endogeenne GDNF üleekspressioon. GDNF-i ekspressioon on ajus kõige kõrgem dorsaalses striatumis ja GDNF-i üleekspressioonil suureneb dopaminergiliste neuritide maht ümber GDNF-i ekspresseerivate neuronite. Lisaks näidati, et GDNF ekspresseerivaid neuroneid on tõenäoliselt mitut tüüpi, ning nad paiknevad peamiselt dorsaal-lateraalses striatumis, mida seostatakse motoorse kontrolliga. Kooskõlas varasemalt avaldatud töödega näitame, et suurendades GDNF-i taset on võimalik suurendada striatumi dopaminergilist sisendit.

Kui olemasolevate dopaminergiliste neuronite aksonite funktsionaalsust ja kasvu saab reguleerida GDNF-i abil, seeläbi suurendades dopamiini taset striatumis, viitaks GDNF-i endogeenne üleekspressioon tulevastele terapeutilistele võimalustele, sealhulgas toetades siirdamise ja operatsioonide järgselt neuronaalsete ühenduste loomist ja taastamist.

Resume

The role of endogenously expressed GDNF on striatal dopamine neurons

Mari-Anne Härma

Parkinson's disease is a progressively degenerative neurological disorder which affects the control of body movements. Symptoms result from the degeneration of neuronal cells located in the substantia nigra that causes a deficiency in the availability of dopamine, a chemical neurotransmitter necessary for controlled movements. At the present, there is no curing treatment available and therapeutic strategies are focused on increasing striatal dopamine levels, what is not safe and efficient enough for longer treatment.

Because of the neurorestorative and neuroprotective potential of neurotrophic factors such as GDNF (Glial cell-derived neurotrophic factor), their administration is considered a promising therapeutic strategy for Parkinson's disease. GDNF induces dopaminergic fiber outgrowth when administered into the brain and lesions in the dopamine system increase GDNF expression, deriving conclusion that increasing endogenous GDNF results in increase of dopaminergic input to striatum.

In current work, animal model was used where Puro-TK-bGHpA was followed by *Gdnf* 3'UTR resulting a cassette that was flanked with homologous arms to generate *Gdnf* 3'UTR-crR (GDNF3'UTR-conditionally reversible replacement) mice. In the animal, transcription of *Gdnf* gene is terminated before 3'UTR, resulting a transcript that lacks miRNA binding sites, thus giving dis-inhibited levels of GDNF mRNA.

In this work, it is shown that GDNF expression is highest in the dorsal striatum, and overexpression of endogenous GDNF results in increase of dopaminergic terminals near the GDNF expressing cells. In addition, it is shown that there is likely more than one type of GDNF expressing cells, and most of them are distributed in dorsolateral striatum, associated with motocoordination.

If functional sprouting could be induced in dopamine axons resulting in increased level of dopamine, then overexpression of endogenous GDNF would be potential candidate for therapy, similarly, it could promote the establishment of functional connections in transplantation approaches.

Tänuavaldused

Suured tänud ideede ja võimaluste eest Jaan-Olle Andressoole, tehnilise teostuse ja abi eest Kärt Varendile, suurepärase töötingimuste ja erakordse atmosfääri eest prof. Mart Saarmale ning korraldusliku abi ja nõu eest Viljar Jaksile.

Lisaks olen tänulik Susannale, Anmolile ja Jaakkole igakülgse abi ja toetuse eest ning Oliverile ja Henrikule abi eest statistikas ja grammatikas. Ning viimaks, eriti suured tänud Oliverile ja Sädele lõputu toetuse ja armastuse eest.

Kasutatud kirjandus

- Ahlskog, J. Eric, and Manfred D. Muentzer. (2001). "Frequency of levodopa-related dyskinesias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature." *Movement Disorders* 16, no. 3: 448-458.
- Ai, Yi, William Markesbery, Zhiming Zhang, Richard Grondin, Dennis Elseberry, Greg A. Gerhardt, and Don M. Gash. (2003). "Intrapatamenal infusion of GDNF in aged rhesus monkeys: distribution and dopaminergic effects." *Journal of Comparative Neurology* 461, no. 2: 250-261.
- Barroso-Chinea, Pedro, Ignacio Cruz-Muros, María S. Aymerich, Manuel Rodríguez-Díaz, Domingo Afonso-Oramas, José L. Lanciego, and Tomás González-Hernández. (2005). "Striatal expression of GDNF and differential vulnerability of midbrain dopaminergic cells." *European Journal of Neuroscience* 21, no. 7: 1815-1827.
- Beck, Klaus D., Janet Valverde, Tajrena Alexi, Kris Poulsen, Barbara Moffat, Richard A. Vandlen, Arnon Rosenthal, and Franz Hefti. (1995). "Mesencephalic dopaminergic neurons protected by GDNF from axotomy-induced degeneration in the adult brain." *Nature* 373: 339-341.
- Bennett, B. D., and J. P. Bolam. (1994). "Synaptic input and output of parvalbumin-immunoreactive neurons in the neostriatum of the rat." *Neuroscience* 62, no. 3: 707-719.
- Bentivoglio, Marina, and Micaela Morelli. (2005). "Chapter I The organization and circuits of mesencephalic dopaminergic neurons and the distribution of dopamine receptors in the brain." *Handbook of chemical neuroanatomy* 21: 1-107.
- Bespalov, Maxim M., and Mart Saarma. (2007). "GDNF family receptor complexes are emerging drug targets." *Trends in pharmacological sciences* 28, no. 2: 68-74.
- Björklund, Anders, and Stephen B. Dunnett. (2007). "Dopamine neuron systems in the brain: an update." *Trends in neurosciences* 30, no. 5: 194-202.
- Boger, H. A., L. D. Middaugh, P. Huang, V. Zaman, A. C. Smith, B. J. Hoffer, A. C. Tomac, and A-Ch Granholm. (2006). "A partial GDNF depletion leads to earlier age-related deterioration of motor function and tyrosine hydroxylase expression in the substantia nigra." *Experimental neurology* 202, no. 2: 336-347.
- Boger, Heather A., Lawrence D. Middaugh, Kennerly S. Patrick, Sammanda Ramamoorthy, Emily D. Denehy, Haojie Zhu, Alejandra M. Pacchioni, Ann-Charlotte Granholm, and Jacqueline F. McGinty. (2007). "Long-term consequences of methamphetamine exposure in young adults are exacerbated in glial cell line-derived neurotrophic factor heterozygous mice." *The Journal of Neuroscience* 27, no. 33: 8816-8825.
- Boger, Heather A., Lawrence D. Middaugh, Vandana Zaman, Barry Hoffer, and Ann-Charlotte Granholm. (2008). "Differential effects of the dopamine neurotoxin MPTP in animals with a partial deletion of the GDNF receptor, *GFR α 1*, gene." *Brain research* 1241: 18-28.
- Bourque, Marie-Josée, and Louis-Eric Trudeau. (2000). "GDNF enhances the synaptic efficacy of dopaminergic neurons in culture." *European Journal of Neuroscience* 12, no. 9: 3172-3180.

- Bracci, Enrico, Diego Centonze, Giorgio Bernardi, and Paolo Calabresi. (2002). "Dopamine excites fast-spiking interneurons in the striatum." *Journal of neurophysiology* 87, no. 4: 2190-2194.
- Bracci, Enrico, Diego Centonze, Giorgio Bernardi, and Paolo Calabresi. (2003). "Voltage-dependent membrane potential oscillations of rat striatal fast-spiking interneurons." *The Journal of physiology* 549, no. 1: 121-130.
- Burke, Robert E., Megan Antonelli, and David Sulzer. (1998). "Glial cell line-derived neurotrophic growth factor inhibits apoptotic death of postnatal substantia nigra dopamine neurons in primary culture." *Journal of neurochemistry* 71, no. 2: 517-525.
- Carlsson, Arvid. (1959). "The occurrence, distribution and physiological role of catecholamines in the nervous system." *Pharmacological reviews* 11, no. 2: 490-493.
- Cerchia, Laura, Amelia D'Alessio, Giovanni Amabile, Frederic Duconge, Carine Pestourie, Bertrand Tavitian, Domenico Libri, and Vittorio de Franciscis. (2006). "An Autocrine Loop Involving Ret and Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor Mediates Retinoic Acid-Induced Neuroblastoma Cell Differentiation." *Molecular cancer research* 4, no. 7: 481-488.
- Choi-Lundberg, Derek L., Qing Lin, Yung-Nien Chang, Yawen L. Chiang, Carl M. Hay, Hasan Mohajeri, Beverly L. Davidson, and Martha C. Bohn. (1997). "Dopaminergic neurons protected from degeneration by GDNF gene therapy." *Science* 275, no. 5301: 838-841.
- Chtarto, Abdelwahed, Xin Yang, Olivier Bockstael, Catherine Melas, David Blum, Enni Lehtonen, Laurence Abeloos *et al.*, (2007). "Controlled delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor by a single tetracycline-inducible AAV vector." *Experimental neurology* 204, no. 1: 387-399.
- Costa, Rui M., Shih-Chieh Lin, Tatyana D. Sotnikova, Michel Cyr, Raul R. Gainetdinov, Marc G. Caron, and Miguel AL Nicolelis. (2006). "Rapid alterations in corticostriatal ensemble coordination during acute dopamine-dependent motor dysfunction." *Neuron* 52, no. 2: 359-369.
- Couplier, Muriel, Jonas Anders, and Carlos F. Ibáñez. (2002). "Coordinated Activation of Autophosphorylation Sites in the RET Receptor Tyrosine Kinase" *Journal of Biological Chemistry* 277, no. 3: 1991-1999.
- Cowan, Ronald L., Charles J. Wilson, Piers C. Emson, and Claus W. Heizmann. (1990). "Parvalbumin-containing gabaergic interneurons in the rat neostriatum." *Journal of comparative neurology* 302, no. 2: 197-205.
- Dahlström, Annica, and Kjell Fuxe. (1964). "Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons." *Acta Physiologica Scandinavica. Supplementum: SUPPL-232*.
- Descarries, Laurent, Kenneth C. Watkins, Sylvia Garcia, Olivier Bosler, and Guy Doucet. (1996). "Dual character, asynaptic and synaptic, of the dopamine innervation in adult rat neostriatum: a quantitative autoradiographic and immunocytochemical analysis." *Journal of Comparative Neurology* 375, no. 2: 167-186.
- Freneau, R. T., Gary E. Duncan, Maria-Gioia Fornaretto, Allen Dearth, Jay A. Gingrich, G. R. Breese, and M. G. Caron. (1991). "Localization of D1 dopamine receptor mRNA in brain supports a role in cognitive, affective, and neuroendocrine aspects of dopaminergic neurotransmission." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88, no. 9: 3772-3776.

- Gerfen, Charles R., Miles Herkenham, and Jean Thibault. (1987). "The neostriatal mosaic: II. Patch-and matrix-directed mesostriatal dopaminergic and non-dopaminergic systems." *J. Neurosci* 7, no. 12: 3915-3934.
- Gill, Steven S., Nikunj K. Patel, Gary R. Hotton, Karen O'Sullivan, Renée McCarter, Martin Bunnage, David J. Brooks, Clive N. Svendsen, and Peter Heywood. (2003). "Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease." *Nature medicine* 9, no. 5: 589-595.
- González-Hernández, Tomás, Pedro Barroso-Chinea, Abraham Acevedo, Eduardo Salido, and Manuel Rodríguez. (2001). "Colocalization of tyrosine hydroxylase and GAD65 mRNA in mesostriatal neurons." *European Journal of Neuroscience* 13, no. 1: 57-67.
- Granéus, Ann-Kathrine. "Factors Influencing the Occurrence of "on-off" Symptoms during Long-Term Treatment with L-dopa." *Acta Medica Scandinavica* 203, no. 1-6 (1978): 75-85.
- Granhölm, A-C., J. L. Mott, K. Bowenkamp, S. Eken, S. Henry, B. J. Hoffer, P. A. Lapchak, M. R. Palmer, C. Van Horne, and G. A. Gerhardt. (1997). "Glial cell line-derived neurotrophic factor improves survival of ventral mesencephalic grafts to the 6-hydroxydopamine lesioned striatum." *Experimental brain research* 116, no. 1: 29-38.
- Grondin, Richard, Zhiming Zhang, Ai Yi, Wayne A. Cass, Navin Maswood, Anders H. Andersen, Dennis D. Elsberry, Michael C. Klein, Greg A. Gerhardt, and Don M. Gash. (2002). "Chronic, controlled GDNF infusion promotes structural and functional recovery in advanced parkinsonian monkeys." *Brain* 125, no. 10: 2191-2201.
- Hanbury, Rose, Zao Dung Ling, Joanne Wu, and Jeffrey H. Kordower. (2003). "GFAP knockout mice have increased levels of GDNF that protect striatal neurons from metabolic and excitotoxic insults." *Journal of Comparative Neurology* 461, no. 3: 307-316.
- Hebert, Meleik A., CRAIG G. Van Horne, Barry J. Hoffer, and Greg A. Gerhardt. (1996). "Functional effects of GDNF in normal rat striatum: presynaptic studies using in vivo electrochemistry and microdialysis." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 279, no. 3: 1181-1190.
- Henderson, Christopher E., Heidi S. Phillips, Richard A. Pollock, Alun M. Davies, Corinne Lemeulle, Mark Armanini, L. Simmons, Barbara Moffet, and Richard A. Vandlen. (1994). "GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle." *Science* 266, no. 5187: 1062-1064.
- Hidalgo-Figueroa, María, Sonia Bonilla, Francisco Gutiérrez, Alberto Pascual, and José López-Barneo. (2012). "GDNF is predominantly expressed in the PV+ neostriatal interneuronal ensemble in normal mouse and after injury of the nigrostriatal pathway." *The Journal of Neuroscience* 32, no. 3: 864-872.
- Hoffer, Barry J., Alex Hoffman, Kate Bowenkamp, Peter Huettl, John Hudson, David Martin, Leu-Fen H. Lin, and Greg A. Gerhardt. (1994). "Glial cell line-derived neurotrophic factor reverses toxin-induced injury to midbrain dopaminergic neurons in vivo." *Neuroscience letters* 182, no. 1: 107-111.
- Janca, Aleksandar. (2002). "Parkinson's disease from WHO perspective and a public health point of view." *Parkinsonism & related disorders* 9.1: 3-6.

- Kawaguchi, Yasuo, Charles J. Wilson, Sarah J. Augood, and Piers C. Emson. (1995). "Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization." *Trends in neurosciences* 18, no. 12: 527-535.
- Kawaguchi, Yasuo, Hironobu Katsumaru, Toshio Kosaka, Claus W. Heizmann, and Kiyoshi Hama. (1987). "Fast spiking cells in rat hippocampus (CA₁ region) contain the calcium-binding protein parvalbumin." *Brain research* 416, no. 2: 369-374.
- Kearns, Cecilia M., and Don M. Gash. (1995). "GDNF protects nigral dopamine neurons against 6-hydroxydopamine in vivo." *Brain research* 672, no. 1: 104-111.
- Kimchi, Eyal Y., and Mark Laubach. (2009). "The dorsomedial striatum reflects response bias during learning." *The Journal of neuroscience* 29, no. 47: 14891-14902.
- Kirik, Deniz, Biljana Georgievska, and Anders Björklund. (2004). "Localized striatal delivery of GDNF as a treatment for Parkinson disease." *Nature neuroscience* 7, no. 2: 105-110.
- Kirik, Deniz, Biljana Georgievska, Carl Rosenblad, and Anders Björklund. (2001). "Delayed infusion of GDNF promotes recovery of motor function in the partial lesion model of Parkinson's disease." *European Journal of Neuroscience* 13, no. 8: 1589-1599.
- Koós, Tibor, and James M. Tepper. (1999). "Inhibitory control of neostriatal projection neurons by GABAergic interneurons." *Nature neuroscience* 2, no. 5: 467-472.
- Kordower, Jeffrey H. (2003). "In vivo gene delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor for Parkinson's disease." *Annals of neurology* 53, no. S3: S120-S134.
- Lang, Anthony E., Steven Gill, Nik K. Patel, Andres Lozano, John G. Nutt, Richard Penn, David J. Brooks *et al.*,. (2006). "Randomized controlled trial of intraputamenal glial cell line-derived neurotrophic factor infusion in Parkinson disease." *Annals of neurology* 59, no. 3: 459-466.
- Lapchak, Paul A., Don M. Gash, F. Collins, Dana Hilt, Paul J. Miller, and Dalia M. Araujo. (1997). "Pharmacological activities of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF): preclinical development and application to the treatment of Parkinson's disease." *Experimental neurology* 145, no. 2: 309-321.
- Le Moine, C., E. Normand, A. F. Guitteny, B. Fouque, R. Teoule, and B. Bloch. (1990). "Dopamine receptor gene expression by enkephalin neurons in rat forebrain." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87, no. 1: 230-234.
- Le Moine, C., E. Normand, and B. Bloch. (1991). "Phenotypical characterization of the rat striatal neurons expressing the D1 dopamine receptor gene." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88, no. 10: 4205-4209.
- Lin, Leu Fen, Daniel H. Doherty, Jack D. Lile, Susan Bektesh, and Frank Collins. (1993). "GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons." *Science* 260, no. 5111: 1130-1132.
- Lindvall, Olle, Anders Björklund, and Gunnar Skagerberg. (1983). "Dopamine-containing neurons in the spinal cord: Anatomy and some functional aspects." *Annals of neurology* 14, no. 3: 255-260.
- Love, Seth, Puneet Plaha, Nikunj K. Patel, Gary R. Hotton, David J. Brooks, and Steven S. Gill. (2005). "Glial cell line-derived neurotrophic factor induces neuronal sprouting in human brain." *Nature medicine* 11, no. 7: 703-704.

- Luk, K. C., and A. F. Sadikot. (2001). "GABA promotes survival but not proliferation of parvalbumin-immunoreactive interneurons in rodent neostriatum: an *in vivo* study with stereology." *Neuroscience* 104, no. 1: 93-103.
- Mallet, Nicolas, Bérangère Ballion, Catherine Le Moine, and François Gonon. (2006). "Cortical inputs and GABA interneurons imbalance projection neurons in the striatum of parkinsonian rats." *The Journal of neuroscience* 26, no. 14: 3875-3884.
- Mallet, Nicolas, Catherine Le Moine, Stéphane Charpier, and François Gonon. (2005). "Feedforward inhibition of projection neurons by fast-spiking GABA interneurons in the rat striatum *in vivo*." *The Journal of neuroscience* 25, no. 15: 3857-3869.
- Maswood, Navin, Richard Grondin, Zhiming Zhang, John A. Stanford, Stewart P. Surgener, Don M. Gash, and Greg A. Gerhardt. (2002). "Effects of chronic intraputaminal infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in aged Rhesus monkeys." *Neurobiology of aging* 23, no. 5: 881-889.
- Miller, Gary W., Jeffrey D. Erickson, Jeffrey T. Perez, Shannon N. Penland, Deborah C. Mash, David B. Rye, and Allan I. Levey. (1999). "Immunochemical analysis of vesicular monoamine transporter (VMAT2) protein in Parkinson's disease." *Experimental neurology* 156, no. 1: 138-148.
- Mínguez-Castellanos, Adolfo, Francisco Escamilla-Sevilla, Gary R. Hotton, Juan J. Toledo-Aral, Ángel Ortega-Moreno, Simón Méndez-Ferrer, José M. Martín-Linares *et al.*,. (2007). "Carotid body autotransplantation in Parkinson disease: a clinical and positron emission tomography study." *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 78, no. 8: 825-831.
- Moore, Mark W., Robert D. Klein, Isabel Fariñas, Hansjorg Sauer, Mark Armanini, Heidi Phillips, Louis F. Reichardt, Anne M. Ryan, Karen Carver-Moore, and Arnon Rosenthal. (1996). "Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF." *Nature* 382, no. 6586: 76-79.
- Mura, A., J. C. Linder, S. J. Young, and P. M. Groves. (2000). "Striatal cells containing aromatic L-amino acid decarboxylase: an immunohistochemical comparison with other classes of striatal neurons." *Neuroscience* 98, no. 3: 501-511.
- Nelson, Alexandra B., Nora Hammack, Cindy F. Yang, Nirao M. Shah, Rebecca P. Seal, and Anatol C. Kreitzer. (2014). "Striatal Cholinergic Interneurons Drive GABA Release from Dopamine Terminals." *Neuron* 82, no. 1: 63-70.
- Nevalaita, Liina, and Mart Saarma. (2008). "Splice variants of *gdnf* and uses thereof." U.S. Patent Application 12/739,715, filed October 24,.
- Obeso, Jose A., Maria Cruz Rodríguez-Oroz, Beatriz Benitez-Temino, Francisco J. Blesa, Jorge Guridi, Concepción Marin, and Manuel Rodriguez. (2008) "Functional organization of the basal ganglia: therapeutic implications for Parkinson's disease." *Movement Disorders* 23, no. S3: S548-S559.
- Olesen, J., and M. Leonardi. (2003). "The burden of brain diseases in Europe." *European Journal of Neurology* 10, no. 5: 471-477.
- Orth, Stephan R., Eberhard Ritz, and Clemens Suter-Crazzolara. (2000) "Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) is expressed in the human kidney and is a growth factor for human mesangial cells." *Nephrology Dialysis Transplantation* 15, no. 5: 589-595.

- Palfi, Stephane, Liza Leventhal, Yaping Chu, Shuang Y. Ma, Marina Emborg, Roy Bakay, Nicole Déglon, Philippe Hantraye, Patrick Aebischer, and Jeffrey H. Kordower. (2002). "Lentivirally delivered glial cell line-derived neurotrophic factor increases the number of striatal dopaminergic neurons in primate models of nigrostriatal degeneration." *The Journal of neuroscience* 22, no. 12: 4942-4954.
- Pascual, Alberto, María Hidalgo-Figueroa, José I. Piruat, C. Oscar Pintado, Raquel Gómez-Díaz, and José López-Barneo. (2008) "Absolute requirement of GDNF for adult catecholaminergic neuron survival." *Nature neuroscience* 11, no. 7: 755-761.
- Pichel, José G., Liya Shen, Hui Z. Sheng, Ann-Charlotte Granholm, John Drago, Alexander Grinberg, Eric J. Lee *et al.*,. (1996). "Defects in enteric innervation and kidney development in mice lacking GDNF. *Nature* 382: 73-76.
- Pothos, Emmanuel N., Viviana Davila, and David Sulzer. (1998). "Presynaptic recording of quanta from midbrain dopamine neurons and modulation of the quantal size." *The Journal of neuroscience* 18, no. 11: 4106-4118.
- Rosenblad, C., A. Martinez-Serrano, and A. Björklund. (1996). "Glial cell line-derived neurotrophic factor increases survival, growth and function of intrastriatal fetal nigral dopaminergic grafts." *Neuroscience* 75, no. 4: 979-985.
- Rosenblad, C., A. Martinez-Serrano, and A. Björklund. (1997) "Intrastriatal glial cell line-derived neurotrophic factor promotes sprouting of spared nigrostriatal dopaminergic afferents and induces recovery of function in a rat model of Parkinson's disease." *Neuroscience* 82, no. 1: 129-137.
- Saavedra, Ana, Graça Baltazar, and Emília P. Duarte. (2008). "Driving GDNF expression: the green and the red traffic lights." *Progress in neurobiology* 86, no. 3: 186-215.
- Sánchez, Marina P., Inmaculada Silos-Santiago, Jonas Frisé, Bin He, Sergio A. Lira, and Mariano Barbacid. (1996). "Renal agenesis and the absence of enteric neurons in mice lacking GDNF." *Nature* 382: 70-73.
- Sato, Kenta, Ryuji Kaji, Sadayuki Matsumoto, Shinji Nagahiro, and Satoshi Goto. (2007). "Compartmental loss of striatal medium spiny neurons in multiple system atrophy of parkinsonian type." *Movement Disorders* 22, no. 16: 2365-2370.
- Slaght, Seán J., Tamar Paz, Mario Chavez, Jean-Michel Deniau, Séverine Mahon, and Stéphane Charpier. (2004). "On the activity of the corticostriatal networks during spike-and-wave discharges in a genetic model of absence epilepsy." *The Journal of neuroscience* 24, no. 30: 6816-6825.
- Slevin, John T., Greg A. Gerhardt, Charles D. Smith, Don M. Gash, Richard Kryscio, and Byron Young. (2005) "Improvement of bilateral motor functions in patients with Parkinson disease through the unilateral intraputamina infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor." *Journal of neurosurgery* 102, no. 2: 216-222.
- Strömberg, Ingrid, Lars Björklund, Maria Johansson, Andreas Tomac, Frank Collins, Lars Olson, Barry Hoffer, and Christian Humpel. (1993). "Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Is Expressed in the Developing but Not Adult Striatum and Stimulates Developing Dopamine Neurons *in Vivo*." *Experimental neurology* 124, no. 2: 401-412.

- Tomac, A., E. Lindqvist, L-FH Lin, S. O. Ögren, D. Young, B. J. Hoffer, and L. Olson. (1995a). "Protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system by GDNF in vivo." 335-339.
- Tomac, Andreas, Johan Widenfalk, L. F. Lin, Tadahiko Kohno, Ted Ebendal, Barry J. Hoffer, and Lars Olson. (1995b). "Retrograde axonal transport of glial cell line-derived neurotrophic factor in the adult nigrostriatal system suggests a trophic role in the adult." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92, no. 18: 8274-8278.
- Tritsch, Nicolas X., Jun B. Ding, and Bernardo L. Sabatini. (2012). "Dopaminergic neurons inhibit striatal output through non-canonical release of GABA." *Nature* 490, no. 7419: 262-266.
- Trupp, Miles, Mikael Rydén, Henrik Jörnvall, Hiroshi Funakoshi, Tönis Timmusk, Ernest Arenas, and Carlos F. Ibáñez. (1995). "Peripheral expression and biological activities of GDNF, a new neurotrophic factor for avian and mammalian peripheral neurons." *The Journal of cell biology* 130, no. 1: 137-148.
- Trupp, Miles, Natale Belluardo, Hiroshi Funakoshi, and Carlos F. Ibáñez. (1997). "Complementary and overlapping expression of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), c-ret proto-oncogene, and GDNF receptor- α indicates multiple mechanisms of trophic actions in the adult rat CNS." *The Journal of neuroscience* 17, no. 10: 3554-3567.
- Tseng, Kuei Y., Fernando Kasanetz, Lucila Kargieman, Luis A. Riquelme, and M. Gustavo Murer. (2001). "Cortical slow oscillatory activity is reflected in the membrane potential and spike trains of striatal neurons in rats with chronic nigrostriatal lesions." *The Journal of Neuroscience* 21, no. 16: 6430-6439.
- West, Anthony R., and Anthony A. Grace. (2002). "Opposite Influences of Endogenous Dopamine D1 and D2 Receptor Activation on Activity States and Electrophysiological Properties of Striatal Neurons: Studies Combining In Vivo Intracellular Recordings and Reverse Microdialysis." *The Journal of neuroscience* 22, no. 1: 294-304.
- Voorn, Pieter, Louk JMJ Vanderschuren, Henk J. Groenewegen, Trevor W. Robbins, and Cyriel Pennartz. (2004). "Putting a spin on the dorsal-ventral divide of the striatum." *Trends in neurosciences* 27, no. 8: 468-474.
- Voorn, Pieter, Louk JMJ Vanderschuren, Henk J. Groenewegen, Trevor W. Robbins, and Cyriel Pennartz. (2004). "Putting a spin on the dorsal-ventral divide of the striatum." *Trends in neurosciences* 27, no. 8: 468-474.
- Wu, Ying, and André Parent. (2000). "Striatal interneurons expressing calretinin, parvalbumin or NADPH-diaphorase: a comparative study in the rat, monkey and human." *Brain research* 863, no. 1: 182-191.
- Xiao, Hengyi, Ken-ichi Isobe, and Kazutoshi Kiuchi. (2002). "Glial cell line-derived neurotrophic factor up-regulates the expression of tyrosine hydroxylase gene in human neuroblastoma cell lines." *Journal of neurochemistry* 82, no. 4: 801-808.
- Xu, Kui, and Dean E. Dluzen. (2000). "The Effect of GDNF on Nigrostriatal Dopaminergic Function in Response to a Two-Pulse K⁺ Stimulation." *Experimental neurology* 166, no. 2: 450-457.
- Yamamoto, M., G. Sobue, K. Yamamoto, and T. Mitsuma. (1996). "Expression of mRNAs for neurotrophic factors (NGF, BDNF, NT-3, and GDNF) and their receptors (p75 NGFR,

TrkA, TrkB, and TrkC) in the adult human peripheral nervous system and nonneural tissues." *Neurochemical research* 21, no. 8: 929-938.

Yanagisawa, Nobuo. (2006). "Natural history of Parkinson's disease: From dopamine to multiple system involvement." *Parkinsonism & Related Disorders* 12: S40-S46.

Yurek, David M. (1998). "Glial cell line-derived neurotrophic factor improves survival of dopaminergic neurons in transplants of fetal ventral mesencephalic tissue." *Experimental neurology* 153, no. 2: 195-202.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Mari-Anne Härma

(sünnikuupäev): 22.03.1988

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

Endogeense GDNF-i mõju dopamiini neuronitele

mille juhendaja on PhD Jaan-Olle Andressoo, PhD Viljar Jaks

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

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates 1.06.2016 kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

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

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

Tartus, 26.05.2014