

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND

Julia Gretšanaja

***Lsamp* geeni mõju hiirte sotsiaalse käitumisele**

Magistritöö (30 EAP)

Juhendajad: Indrek Heinla, MSc
Kersti Lilleväli, PhD
Riho Meier, MSc

Tartu 2015

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID.....	4
SISSEJUHATUS	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1.1 LAMP valk.....	6
1.2 Sotsiaalne käitumine närilistel	6
1.3 Sotsiaalne isolatsioon.....	7
1.4 <i>Lsamp</i> -i roll sotsiaalse ja emotsionaalse käitumise reguleerimisel	9
2. EKSPERIMENTAALOSA.....	10
2.1. Töö eesmärgid.....	10
2.2. Materjal ja meetodika.....	11
2.2.1. Loomad ja katse üldine ülesehitus.....	11
2.2.2. Käitumiskatsed	12
2.2.2.1 Tõstetud pluss-puur	12
2.2.2.2 Hele-tume puur	12
2.2.2.3 Sotsiaalne interaktsioon.....	13
2.2.2.4 Sotsiaalse eelistuse katse	13
2.2.3 Estruse faaside määramine	14
2.2.4 Statistiline analüüs.....	14
3. TULEMUSED	15
3.1. Tõstetud pluss-puur katse emastega	15
3.2 Emasloomade kehakaal.....	16
3.3. Tume-hele puuri katse emastega.....	16
3.4. Sotsiaalne interaktsioon emastel.....	18
3.5. Sotsiaalse eelistuse katse isastega	19
3.6 Estruse faasid	20
4. ARUTELU.....	23
KOKKUVÕTE	26
Summary	27
TÄNUSÕNAD.....	28
KASUTATUD KIRJANDUS.....	29
LISAD	34

Lisa 1.....	34
Lisa 2.....	35
Lisa 3.....	35
Lisa 4.....	37
Lisa 5.....	37
Lisa 6.....	38
LIHTLITSENTS.....	40

KASUTATUD LÜHENDID

129Sv – 129S6/SvEv Tac hiirelin

B6 – C57BL/6Bl hiirelin

BDNF – ajus toodetav närvikasvufaktor, (ingl *brain-derived neurotrophic factor*)

CORT - kortikosteron

IgLON – immunoglobuliin LON

IM – isolatsioonimajutus

GPI - glükosüülfosfatidüülinositol

HPA – hüpotalamus-hüpofüüs-adrenaal telg

LAMP – limbilise süsteemiga seotud membraanvalk, (ingl *limbic-system associated membrane protein*)

Lsamp – limbilise süsteemiga seotud membraanvalku kodeeriv geen

Ntm – Neurotrimin

OBCAM – opioide siduv raku adhesioonimolekul, (ingl *opioid-binding cell adhesion molecule*)

SM – standardmajutus

SISSEJUHATUS

Suhtlemine on elusorganismide põhiomadus. Liigikaaslaste vahelised sotsiaalsed interaktsioonid määravad sotsiaalsete võrgustike struktuuri ja stabiilsuse ning seeläbi mõjutavad indiviidi toimetulekut ja paljunemisedukust.

Paljusid psühhiaatrilisi haigusi iseloomustab sotsiaalse käitumise häirumine, muuhulgas on see oluliseks sümptomiks näiteks depressiooni, autismiga seotud häirete, bipolaarse häire, obsessiiv-kompulsiivse häire ja skisofreenia puhul. Hiiremudelite uuringud on suunatud aitamaks kindlaks teha neurobioloogilisi korrelaate ja mehhanisme, mis osalevad eespool loetletud häiretes.

Käesolevas töös uurime *Lsamp*-geeni mõju hiirte käitumisele. *Lsamp* kodeerib valku LAMP, rakuadhesiooni molekuli, mille kõrget ekspressiivsust täheldatakse areneva ja täiskasvanud aju limbilistes piirkondades. Alates esimesest valgu kirjeldusest on tehtud palju uuringuid selle geeni rolli uurimise nimel. Selgus, et *Lsamp* osaleb neuronite jätkete moodustumises ja kasvus. Vaatamata sellele, et neuroanatomiline organiseeritus ja sensomotoorne areng on *Lsamp* ^{-/-} puhul normis, näitasid loomkatsed käitumise ja ärevustaseme erinevusi *Lsamp* ^{-/-} ja *Lsamp* ^{+/+} loomade vahel. Samuti on hiljutised uuringud inimestel avastanud seoseid *Lsamp*-geeni ja enesetappude, paanika- ja bipolaarse häirete vahel.

Käesoleva töö eesmärk on uurida, kas *Lsamp* ^{-/-} hiirte sotsiaalne käitumine erineb *Lsamp* ^{+/+} hiirte omast, pöörates erilist tähelepanu emasloomade käitumisele, sest enamik *Lsamp* ^{-/-} uuringuid on varasemalt läbi viidud isaste hiirtega. Uurisime ka kasvukeskkonna mõju sotsiaalsele käitumisele, milleks viisime uuritavad hiired sotsiaalsesse isolatsiooni, mis on sotsiaalsetele liikidele tugev stressiallikas.

Uurimistöö eksperimentaalne osa teostati Tartu Ülikooli arstiteaduskonna bio - ja siirdemeditsiini instituudi füsioloogia osakonnas.

Märksõnad: *Lsamp*, sotsiaalne käitumine, isolatsioon

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 LAMP valk

LAMP valk (64 – 68kDa), mis on kodeeritud *Lsamp* geeni poolt, ekspresseerub imetajatel neuronite kehadel ja dendriitidel limbilise süsteemi kortikaalsetes ja subkortikaalsetes piirkondades, mis osalevad emotsionaalse käitumise, õppimisvõime, mälu ja keskse vegetatiivse süsteemi regulatsioonis (Levitt, 1984; Horton ja Levitt, 1998). LAMP on IgLON perekonna liige (lisaks LAMPile sinna kuuluvad Neurotrimin (Ntm), OBCAM (opioide siduv raku adhesioonimolekul) ja Kilon), samuti kuulub LAMP imuunglobuliinide (Ig) super perekonda. Valgu struktuur kosneb kolmest Ig domeenist ja glükofosfatidüülinositol (GPI) ankrust (Pimenta jt., 1995).

In vitro eksperimentaalsed manipulatsioonid LAMP valguga näitasid, et valk osaleb neuronite jätkete kasvu reguleerimises ja võib nii soodustada kui ka kui ka pidurdada neuronite jätkete kasvu (Gil jt., 2002). Esimene Ig domeen on vajalik ning piisav jätkete kasvuks, teine domeen pidurdab kasvu, kuid jätkete kasvu pidurdamiseks on vajalik terve valgu olemasolu. Uuemates uurimistöödes ei ole *Lsamp* *-/-* hiirtel avastatud olulisi muutusi aju anatoomilises struktuuris (Catania jt., 2008; Innos jt., 2011).

Rottide ja inimeste *Lsamp* DNA võrdlevad uuringud näitasid 94%-st sarnasust nukleotiidide tasemel, ning aminohapete järjestuste sarnasus oli 99%, mis viitab sellele, et valgu struktuur ja sellega seotud funktsionaalsed omadused on fülogeneetiliselt väga tugevalt konserveerunud (Pimenta jt., 1996).

1.2 Sotsiaalne käitumine närilistel

Sotsiaalne käitumine on elusorganismide põhiomaduseks ja seda määratletakse kui vastastikmõju sama liigi isendite vahel (Sokolowski jt., 2010). Sotsiaalsed oskused mängivad olulist rolli nii indiviidi kui liigi ellujäämisel. Mitmeid neuropsüühilisi häireid, nagu depressioon, autism, bipolaarne häire, obsessiiv-kompulsiivne häire ja skisofreenia iseloomustab sotsiaalse käitumise häirumine, mis muudab keeruliseks adekvaatse sotsiaalse kontakti loomise ja/või säilitamise. See rõhutab kahjustamata sotsiaalsete oskuste tähtsust (Landau ja Morre, 1991; Mueser jt., 1991, Mundy jt., 1986; Rapin ja Tuchman, 2008).

Närilised on sotsiaalsed loomad ning nad ilmutavad erinevat laadi sotsiaalset käitumist nii looduses kui ka vangistuses (Crawley jt., 2000). Laboritingimustes, kasutades spetsiaalselt välja töötatud

teste, uuritakse erinevaid sotsiaalse käitumise aspekte: uurimisaktiivsust, seksuaalset aktiivsust, vanemlikku käitumist, sotsiaalselt suhtlust, agressiivset käitumist.

Peamisteks teguriteks, mis mõjutavad käitumist, on geneetilised faktorid (hiireliin, sugu, geneetilised mutatsioonid). Erinevate hiireliinide sotsiaalse käitumise võrdlemine näitab suuri erinevusi erinevatesse liinidesse kuuluvate üksikisendite sotsiaalses ja emotsionaalses profiilis. Näiteks liinide 129Sv ja C57Bl/6 (B6) hiiri kasutatakse laboriuuringutes laialdaselt ja erinevad uuringud on näidanud, et nende kahe liini vahel esineb märkimisväärsed erinevusi käitumises. Cook N. ja Bolivar V. viisid läbi rea käitumuslikke katseid ja näitasid, et 129Sv hiirte ärevuse tase on kõrgem, samuti on selle liini hiired vähem aktiivsed: null puuri katses veetsid 129Sv hiired oluliselt vähem aega avatud alal, avarvälja katses oli nende läbitud vahemaa oluliselt väiksem kui B6 hiirtel (Cook ja Bolivar, 2002).

Uuriti isaste ja emaste käitumist ja leiti, et nende sotsiaalne käitumine ja emotsionaalne vastus on väga erinevad. An X. jt. uurisid mitmesuguseid käitumuslikke tavaid liini B6 emastel ja isastel ja leidsid, et erinevalt isastest on emased rohkem sotsiaalsed (An jt., 2011). Samuti on teada, et isased on territoriaalsed loomad ning käituvad agressiivselt teiste isaste suhtes, kes neile puuri pannakse. Samal ajal kalduvad emased olema sallivamad ja sotsialiseerumisele orienteeritud (Shlomit jt., 2013). Teatud tingimustel esineb siiski ka emastel agressiivsust, näiteks imetamisperioodil on nad agressiivsemad ja ründavad nende juurde pandud isendeid (Vom Saal jt., 1995).

Käitumisele avaldavad tugevat mõju keskkonnategurid nagu elamistingimused, toit, temperatuur, eraldatus, sotsiaalne seisund, millel on oluline mõju arengule ja füsioloogilistele funktsioonidele. Näiteks, sotsiaalne lüüasaamine võib vähendada glükokortikoidide retseptorite tundlikkust (Avitsur jt., 2001) ja suurendada tsentraalset monoamiini aktiivsust, mis võib kaasa aidata ärevuse tekkele (Audet jt., 2010; Keeney, 2006). Sotsiaalne lüüasaamine võib samuti vähendada BDNF-i (Berton jt., 2006) ja DeltaFosB (Vialou jt., 2010) taset mesolimbilistes ajupiirkondades ja neurogeneesi (Buwalda jt., 2010; Lagace jt., 2010), aidates sellega kaasa mäluhäirete ja depressioonilaadsete seisundite tekkimisele.

1.3 Sotsiaalne isolatsioon

Sotsiaalne isolatsiooni kui bioloogist nähtust iseloomustavad olulised muutused organismi kõigis neurofüsioloogilistes süsteemides (Hall, 1998). On teada, et üksik indiviid, kes on üles kasvanud piiratud sotsiaalsete kontaktide tingimustes, erineb liigikaaslastest oma kõrge tundlikkuse

poolest välistele ärritajatele, samuti emotsionaalse ebastabiilsuse, häiritud liikumis- ja kognitiivsete funktsioonide poolest (Glushenko, 2002). Noorukitel ilmneb see hüperaktiivsuse ja tähelepanuhäire sündroomina, kalduvusena antiasotsiaalsele käitumisele, konfliktsusele, alkoholi ja narkootiliste ainete kontrollimatule kasutamisele. Seega on väga oluline seda protsessi uurida.

Laborinäriiliste sotsiaalne isolatsioon on mudel, milles uuritakse käitumuslikke ja neurokeemilisi tagajärgi näriiliste sotsiaalse koostoime/interaktsioonide puudumisel. Paljud sümptomid, mis on esile kutsutud sotsiaalse isolatsiooniga, on sarnased depressiooni, skisofreenia ning ka ärevushäirete sümptomitega.

Varajased uuringud on näidanud, et sotsiaalne isolatsioon mõjutab neurogeneesi hippokampuses erinevatel näriiliste liikidel. Näiteks, isolatsioon peale emast eraldamist, vähendas hippokampuse rakkude proliferatsiooni, nende ellujäämise võimet ja neuronide diferentseerumist noortel isas hiirtel (Ibi jt., 2008). Samuti kutsus 3-nädalane sotsiaalne isolatsioon esile hippokampuse rakkude ellujäämise võimete vähenemise emastel rottidel (Westenbroek jt., 2004). Hiirtega tehtud katsed näitasid, et rakkude proliferatsioon ja ellujäämise võime *dentate gyrus*-es vähenes pikaajalise sotsiaalse isolatsiooni tagajärjel (Lieberwirth jt., 2012). Lisaks sellele vähendab pikaajaline sotsiaalne isolatsioon ka amügdala rakkude ellujäämise võimet ja mediaalse preoptilise ala rakkude proliferatsiooni (Lieberwirth jt., 2012). Kõik see viitab sellele, et häired, mida põhjustab sotsiaalne isolatsioon, ei piirdu ainult hipokampuse rakkude kahjustumisega.

Peale selle, et sotsiaalne isolatsioon mõjutab neuronite plastilisust, viib see ka depressioonilaadsete käitumuslik ilminguteni nagu näiteks motivatsiooni ja anhedoonia häired (Grippe jt., 2007, 2008; Pan jt., 2009; Wright jt., 1991, Becker jt., 2008), samuti indutseerib sotsiaalne isolatsioon anksiogeense vastuse, mis tõendab kõrgendatud ärevuse taset (Ferdman jt., 2007, Bridges ja Starkey, 2004) ja suurendab agressivsust (Matsumoto jt., 2005).

Uute neuronite teke ajus võib mängida suurt rolli kognitiivsetes ja käitumuslikes funktsioonides (Imayoshi jt., 2009). Näiteks uued haistmissibula neuronid aitavad kaasa indiviidide eristamisele (Mak ja Weiss, 2010), samal ajal on hippokampuse neuronid tähtsad ruumi mälu kujunemisel ja pikaajalisel säilitamisel, objektide eristamisel ja assotsiatiivse mälu formeerimisel (Clelland jt., 2009; Jessberger jt., 2009; Shors jt., 2001). Uued neuronid subventrikulaarses tsoonis on seotud emaliku käitumisega (Furuta ja Bridges, 2009). Uute neuronite kujunemine amügdalas on tähtis seksuaalse dimorfismi tekkimisel ja/või säilitamisel rottidel (Ahmed jt., 2008). Seega, on põhjust arvata, et neurogeneesi häired võivad kaasa aidata käitumusmuutustele, mis olid välja toodud sotsiaalse isolatsiooni korral, kuid otsest sidet nende vahel ei ole tõestatud. Näiteks hiirte

neurogeneesi inhibeerimine ei toonud esile ärevust või depressioonilaadset käituist (Santarelli jt., 2003; Balu ja Lucki, 2009).

Sotsiaalne isolatsioon võib viia häireteni hüpotalamus-hüpofüüs-adreenaal (HPA) teljes. Stress põhjustab tavaliselt suurenenud CORT-i tsirkuleerivaid tasemeid, mis võib viia struktuursete ja reguleerivate muudatusteni, soodustades häirete teket (Maniam jt., 2014).

1.4 *Lsamp*-i roll sotsiaalse ja emotsionaalse käitumise reguleerimisel

Uuringud närilistel näitavad, et kõrgeenenud LSAMP transkriptide tase mitmetes ajupiirkondades on seotud kõrgeenenud ärevuse tasemega. Pluss-puuri katsete tulemused rottidel näitasid, et madala aktiivsusega (kõrge ärevusega) rottidel on *Lsamp* geeni ekspressiooni tase 1,6 korda kõrgem kui kõrge aktiivsusega (madala ärevusega) rottidel (Nelovkov jt., 2003). Hiljem leidsid Nelovkov jt. kõrgeenenud LAMP-i taseme madala uurimusliku aktiivsusega rottide amügdalas (Nelovkov jt., 2006). Samuti täheldati rottide amügdalas kõrgeenenud *Lsamp* mRNA tase rottidel, kes puutusid kokku kassi lõhnaga, mis kutsub rottidel esile ärevuse (Köks jt., 2004).

Tööd *Lsamp* geeni *-/-* hiirtega – loodud on kaks erinevat *Lsamp -/-* liini (üks Catania jt., (2008), teine Tartu Ülikoolis) – tõestasid, et LAMP osaleb sotsiaalse ja emotsionaalse käitumise regulatsioonis. Nii viis Catania uurimusrühm läbi katsed *Lsamp -/-* hiirtega ja teatas, et hiirtel *Lsamp* geeni defitsiidiga on suurenenud aktiivsus uues keskkonnas, samuti suurenenud uudistav käitumine (Catania jt., 2008). Innos jt. poolt läbi viidud katsete tulemused näitavad väiksemat ärevust *Lsamp -/-* hiirtel (Innos jt., 2011).

Märkimisväärne kõrvalekaldumine sotsiaalses käitumises leiti isastel hiirtel: neil puudus vurrude pügamine. Vurrude pügamine on sotsiaalne käitumine, mis on omane eri hiireliinide nii isastele kui ka emastele ning on märk sotsiaalsest hierarhiast: domineeriv isend pügab allutatute vurrud (Strozik ja Festing, 1981). Vurrude pügamise puudumine *Lsamp -/-* isastel näitab häireid isastevahelises sotsiaalses käitumises.

Inimestel läbi viidud uuringud kinnitavad samuti *Lsamp*-i rolli sotsiaalse ja emotsionaalse käitumise reguleerimisel. Polümorfismid *Lsamp* geenis on seotud enesetappude (Must jt., 2008), paanika- (Koido jt., 2006) ja bipolaarse häirega (Behan jt., 2009).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Töö eesmärgid on:

1. Uurida, kas *Lsamp*^{-/-} hiirte sotsiaalne käitumine erineb *Lsamp*^{+/+} hiirte sotsiaalsest käitumisest. Pöörasime erilist tähelepanu emasloomadele.
2. Uurida, kas üksikmajutus mõjutab sotsiaalset käitumist ja milline on selle mõju *Lsamp*^{-/-} emastele hiirtele

2.2. Materjal ja meetoodika

2.2.1. Loomad ja katse üldine ülesehitus

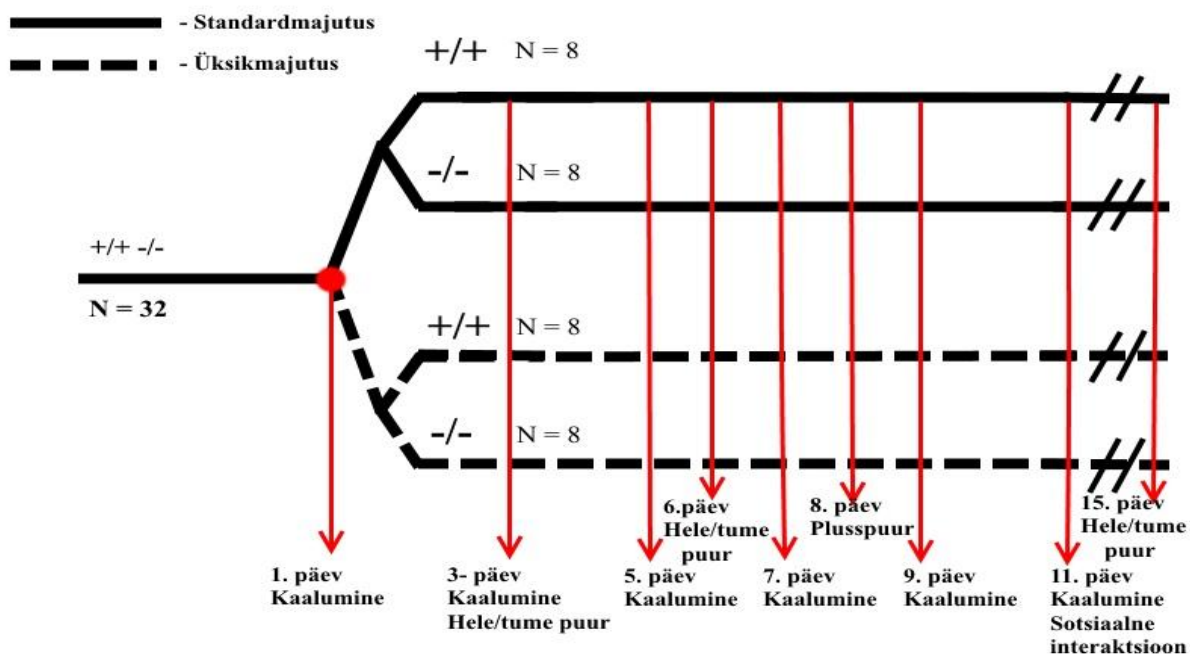
Katseloomade paljundamine toimus Tartu Ülikooli Bio-ja siirdemeditsiini instituudis füsioloogia osakonnas. Enne katsete algust hoiti loomi kaheksa kaupa 425 mm x 266 mm x 155 mm suurustes puurides koos allapanu ja pesamaterjaliga. Hiirtel oli vaba liigipääs toidule ja veele. Loomi hoiti 22°C juures 12-h/12-h valge/pime tsüklis. Katsed viidi läbi valgel ajal.

2.2.1.1. Emaste hiirtega tehtud katsed

Katsetes kasutati 5.-6. kuu vanuseid *Lsamp*^{-/-} ja *Lsamp*^{+/+} 129S6/SvEvTac×C57BL/6 geneetilise taustaga emaseid hiiri.

Katse alguses jagati hiired nelja gruppi: kaheksa looma kontroll grupist ja kaheksa *Lsamp*^{-/-} looma paigutati standardmajutusesse, ülejäänud 8 hiirt kontroll grupist ja 8 hiirt *Lsamp*^{-/-} paigutati üksikmajutusesse.

Katse käigus mõõdeti katseloomade kehakaalu ja viidi läbi sotsiaalse interaktsiooni, tume-hele puuri ja tõstetud pluss-puuri katsed.



Joonis 1. Ülevaade katse kavast.

2.2.1.2 Isaste hiirtega tehtud katsed

Katses kasutati 2. kuu vanuseid *Lsamp* *-/-* ja *Lsamp* *+/+* 129S6/SvEvTac×C57BL/6 geneetilise taustaga isaseid hiiri. Hiired jagati kahte gruppi: kaheksa *Lsamp* *+/+* looma ühes ja kaheksa *Lsamp* *-/-* looma teises. Nendega viidi läbi sotsiaalse eelistuse katse.

2.2.2. Käitumiskatsed

2.2.2.1 Tõstetud pluss-puur

Tõstetud pluss-puuri katse on kõige populaarsem katse ärevusreaktsioonide hindamiseks (Rodgers ja Dalvi, 1997; Crawley, 2007). Katse põhineb hiirte loomulikul vastumeelsusel avatud ja kõrgemal asetsevate alade suhtes ning nende loomulikul huvil uute keskkondade vastu. Kõrgenenud ärevusega loomad viibivad kauem aega suletud õlgades, kusjuures alanenud ärevusega loomad viibivad kauem aega avatud õlgades.

Plusspuur koosneb kahest vastastikku paiknevast suletud õlast (17.5 pikkus x 5cm laius), kahest vastastikku paiknevast avatud õlast (17.5 pikkus x 5cm laius) ja keskel paiknevast platvormist (5cm pikkus x 5cm laius). Suletud õla küljed on ümbritsetud 14 cm kõrguste seintega. Kogu pluss-puuri seade on tõstetud 30 cm kõrgusele.

Enne katse algust hoiti hiiri 60 min katseruumis, et nad kohaneksid uue olukorraga. Katse viidi läbi hämaras valguses (7 luksit). Hiir asetati platvormile nii, et pea oli suunatud suletud õla poole ja 5-min vältel registreeriti järgmised parameetrid: 1. avatud õlgadesse käikude arv, 2. avatud õlgades viibitud aeg, 3. suletud õlgadesse käikude arv, 4. avatud õlgade ja kõigi õlgade külastuste suhe, 5. avatud õlgadel pealangeamiste arvu. Pärast igat looma puhastati puur hoolikalt 70% etanoolilahusega ning seejärel kuivati paberrätikutega.

Ekspreiment filmiti hilisemaks analüüsiks.

2.2.2.2 Hele-tume puur

Hele-tume puur on tõstetud plusspuuri kõrval kõige laialdasemalt kasutatav katse ärevusreaktsioonide hindamiseks. Katse põhineb hiirte eelistusel tumedate ja suletud alade suhtes ning sellele vastanduval uudishimul avatud ja heledate alade suhtes.

Seade koosneb puurist (40cm x 40cm x 35cm), mis oli jagatud kahte võrdse suurusega ossa: üks osa on tugevalt valgustatud (250 luksit), teine osa on hämar (2 luksit). Kambrid on eraldatud seinaga, mille keskel on väike ava (13cm x 5cm), mille kaudu on hiirel võimalus vabalt liikuda ühest kambrist teise.

Enne katse algust hoiti hiiri 60 min katseruumis, et nad kohaneksid uue olukorraga. Pärast seda paigutati hiir puuri tumedasse ossa. Loom võis vabalt liikuda kambrite vahel 10 minuti jooksul. Selle aja jooksul registreeriti järgnevad parameetrid: 1. heledasse alasse sisenemise latents, 2. heledasse alasse käikude arv, 3. tumedasse alasse käikude arv ja 4. heledas alas viibitud aeg. Pärast igat looma puhastati puuri hoolikalt 70% isopropanoolilahusega ning seejärel kuivati paberrätikutega.

2.2.2.3 Sotsiaalne interaktsioon

Sotsiaalse interaktsiooni katset kasutati selleks, et aru saada kuidas *Lsmp* $-/-$ ja üksikmajutusesse paigaldatud hiired käituvad ja reageerivad sotsiaalse partnerile 10-minutilise katse jooksul. Nagu ka eelmistel juhtudel, enne katse algust hoiti hiiri 60 min katseruumis. Pärast seda hoiti loomad 10 minuti jooksul üksikpuuris ning selle aja möödudes paigutati kaks sama genotüübiga hiirt erinevast majutuse keskkonnast uude üksikpuuri koos allapanuga. Paaride koostamisel lähtuti sellest, et hiirtel puuduks varasem kokkupuude teineteisega ning kehakaalu erinevus ei olnuks suurem kui 5%. Puuri peale asetati pleksiklaasist kaas ja katse salvestati videokaameraga. Eksperimendi läbiviimisel oli katseruumi valgustus 200 luksit. 10-minutilise jälgimisperioodi jooksul mõõdeti järgmised parameetrid: 1. genitaalpiirkonna nuusutamise aeg, 2. muude kehaosade nuusutamise aeg, 3. agressiivse käitumise episoodide arv ja 4. agressiivse käitumise kestvus..

2.2.2.4 Sotsiaalse eelistuse katse

Sotsiaalse eelistuse test võimaldab uurida hiirte sotsiaalset käitumist. Sotsiaalsus selles kontekstis tähendab hiirte instinktiivset kalduvust olla tihedas kontaktis oma liigikaaslasega.

Katses kasutati *Lsmp* $-/-$ ja *Lsmp* $+/+$ isaseid hiiri. Sotsiaalse eelistuse katse seade koosnes suurest puurist (45cm x 45cm x 45cm), mille kahte vastasnurka paigaldati kaks väikest traatvõrgust puuri (diameetriga 7cm). Selline puur toimib füüsilise barjäärina, takistades otsest kontakti loomade vahel, samaaegselt võimaldades sensoorsete interaktsioonide toimumist.

Katsele eelnenud päeval asetati hiired 30-minutiks suurde katsepuuri, et nad tutvuksid ja harjuksid uue keskkonnaga. Samal ajal olid mõlemad väikesed puurid tühjad. Katsepäeval paigutati ühte tühja puuri estruses emane hiir ja teise isane hiir. Oluline oli, et katseloomal puudus varasem kokkupuude

katses kasutatud stiimulloomadega. Seejärel pandi uuritav hiir seadmesse, kus ta võis vabalt liikuda 8 minuti jooksul. Et vältida asukoha mõju ja liigset stressi stiimulhiirtele vahetati stiimulhiiri ja nende asukohta puuris iga nelja katse järel. Katse salvestati videokaameraga ja kasutades Noldus EthoVision XT 8.0 programmi mõõdeti järgmised parameetrid: 1. emashiire juures viibitud aeg, 2. isashiire juures viibitud aeg ja 3. läbitud distantssi.

2.2.3 Estruse faaside määramine

Hiirtel koosneb estruse tsükkel neljast faasist: diestrusest, proestrusest, estrusest ja metestrusest. On näidatud, et isaste käitumine muutub vastavalt tsükli faasile. Käitumuslike erinevuste vältimiseks kasutati ainult sama estruse faasiga emasloomi.

Estruse faaside määramiseks kasutati tupe tsütoloogia meetodit. Pipett täideti 12 – 15 ul destilleeritud veega, ots viidi tuppe ja pesti läbi 1 – 2 korda. Võetud proov kanti alusklaasile ja lasti kuivada õhu käes 24 tunni jooksul. Pärast seda fikseeriti proov termiliselt, tõmmates katseklaas paar korda läbi leegi. Fikseeritud preparaat värviti 15 – 20 min jooksul 0,07% metüleensinisega (12-15ul) ja pesti destilleeritud veega.

Seejärel valmistatud preparaati uuriti 40-kordse suurendusega mikroskoobi all ning tehti sellest ka fotod. Faaside määramine põhineb leukotsüütide, sarvestunud epiteel rakkude ja tuumaga epiteel rakkude olemasolul ja vahekorral.

2.2.4 Statistiline analüüs

Graafikutel ja tabelites on tulemused esitatud keskmiste väärtuste ja nende standardveana (\pm SEM). Andmete analüüsimiseks kasutati programmi STATISTICA 10.0. Jooniste tegemiseks kasutati GraphPad Prism 4 versiooni. Tulemuste võrdlemiseks kasutati kahe faktorilist dispersioonanalüüsi ja korduvmõõtmistega ANOVA analüüsi. Positiivse peaefekti olemasolulul teostati eri gruppide tulemuste *post hoc* võrdlus Newman-Keuls testiga.

3. TULEMUSED

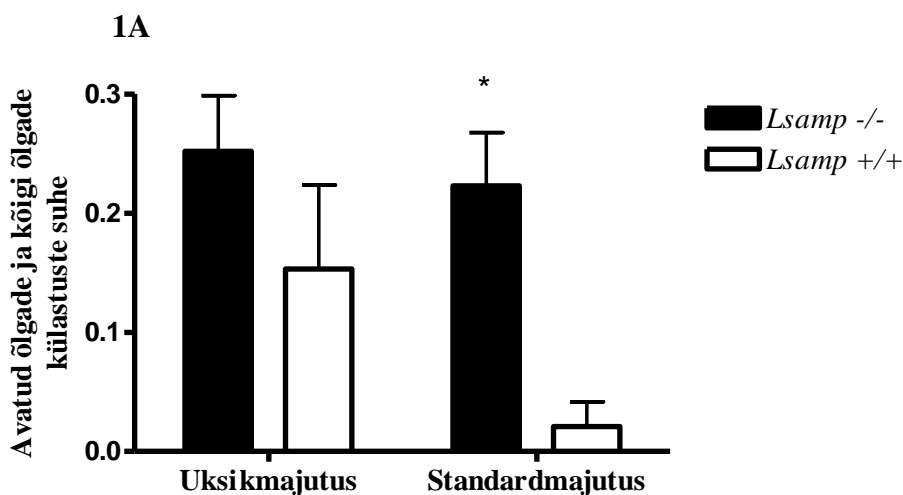
3.1. Tõstetud pluss-puur katse emastega

Tõstetud pluss-puuri katse tulemuste analüüs näitas, et *Lsamp*^{+/+} hiirtega võrreldes on *Lsamp*^{-/-} hiired madalama ärevusega.

Lsamp^{-/-} sisenesid rohkem nii suletud ($F_{(1, 28)}=5,7$; $p<0,05$; Lisa 3), kui ka avatud õlgadesse ($F_{(1, 28)}=19,2$; $p<0,001$; Lisa 3). Samuti esines genotüübi ja keskkonna efekt kaitsmata pealangetamiste puhul ($F_{(1, 28)}=6,4$; $p<0,05$; Lisa 3).

Lsamp^{-/-} loomadel oli oluliselt kõrgem avatud õlgade ja kõigi õlgade küllastuste suhe võrreldes *Lsamp*^{+/+} loomadega ($F_{(1, 28)}=9,4$; $p=0,01$; Joonis 1B). Tavatingimustes hoitud *Lsamp*^{-/-} hiirtel oli suhe kõrgem võrreldes sama tingimustes hoitud *Lsamp*^{+/+} loomadega. Analüüs ei näidanud genotüübi ega keskkonna efekti avatud õlgadel viibitud ajale.

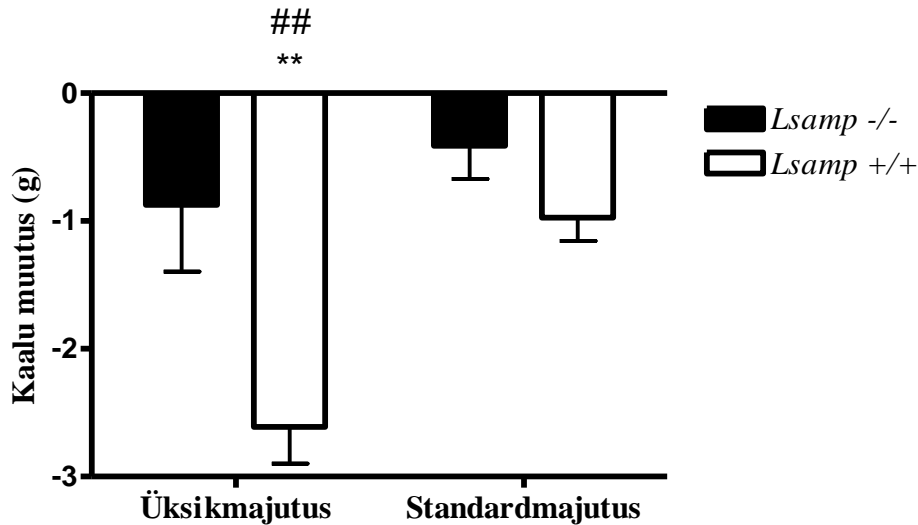
Ilmnes keskkonna tendents avatud õlgadesse sisenemistele ($F_{(1, 28)}=3,4$; $p=0,077$; Lisa 3).



Joonis 1. Keskkonna ja genotüübi toime hiirte käitumisele tõstetud pluss-puuris. N = 8 igas rühmas. Andmed on esitatud koos keskmise standardveaga (\pm SEM). * – $p < 0.05$: *Lsamp*^{-/-} võrreldes *Lsamp*^{+/+} hiirtega samades keskkonna tingimustes.

3.2 Emasloomade kehakaal

Ilmnes statistiliselt oluline genotüübi ($F_{(1,28)}=11,7$; $p<0.01$) ja keskkonna ($F_{(1,28)}=9,7$; $p<0.01$) efekt kehakaalu muutmise osas. Katse kolmandaks päevaks suurim kehakaalu muutus tuvastati üksikmajutuses hoitud *Lsamp* +/+ hiirtel. Samuti langetasid üksikmajutuses elavad *Lsamp* +/+ hiired rohkem kaalu võrreldes standardtingimustes elavate *Lsamp* +/+ hiirtega (Joonis 2).



Joonis 2. Kehakaalu muutus. Näitab kehakaalu muutust katse kolmandaks päevaks. N = 8 igas grupis. Andmed on esitatud koos keskmise standardveaga (\pm SEM).

** – $p < 0.01$: *Lsamp* +/+ võrreldes *Lsamp* -/- hiirtega samades keskkonna tingimustes.

– $p < 0.01$: *Lsamp* +/+ isolatsiooni keskkonnas võrreldes *Lsamp* +/+ hiirtega tavatingimustes.

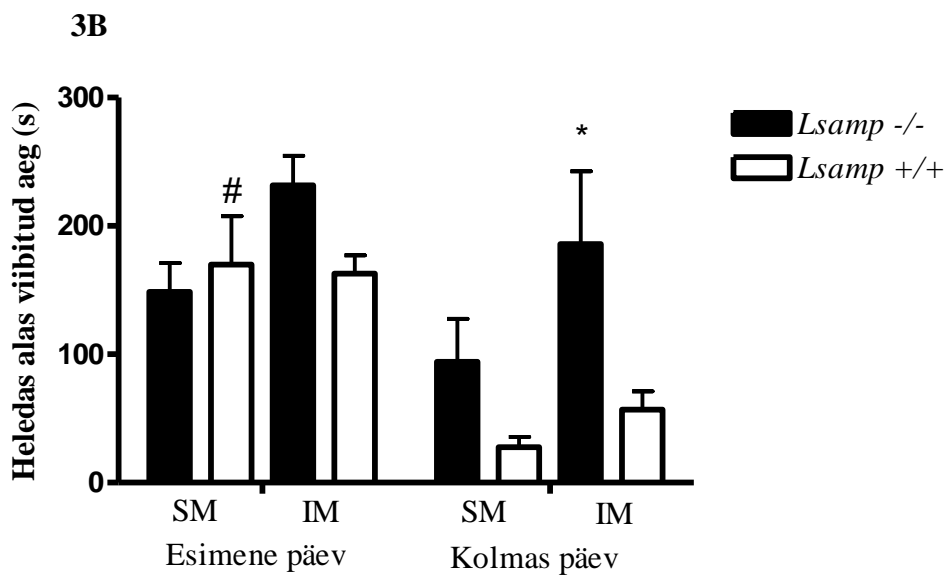
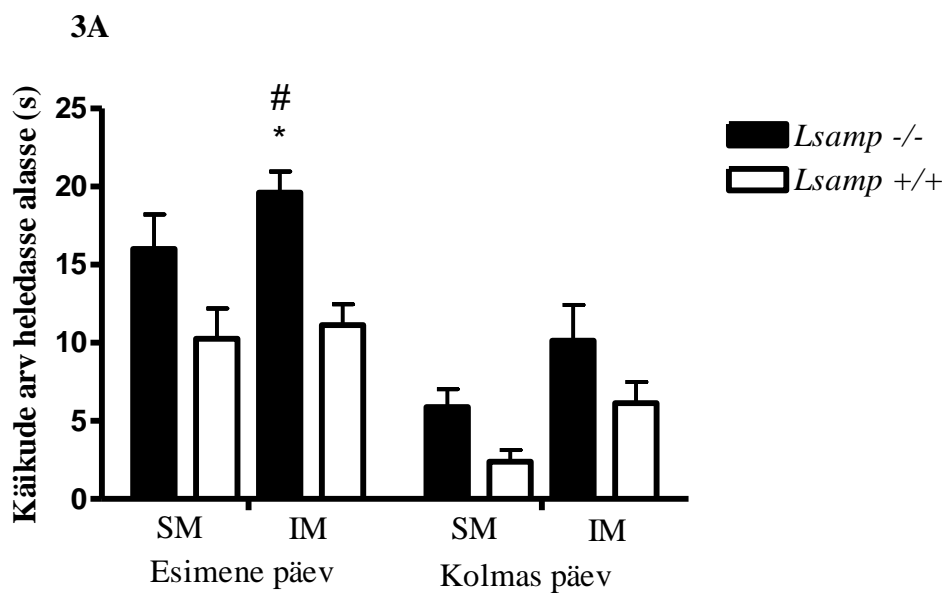
3.3. Tume-hele puuri katse emastega

Leiti, et võrreldes *Lsamp* +/+ hiirtega oli *Lsamp* -/- hiirtel käikude arv heledasse alasse esimesel katsepäeval oluliselt suurem ($F_{(1,28)}=20,1$; $p<0.01$; Joonis 3A). Isolatsioonis hoitud *Lsamp* -/- hiired käisid rohkem heledas alas võrreldes sama tingimustes hoitud *Lsamp* +/+ hiirtega.

Siin esines ka statistiliselt oluline keskkonna efekt ($F_{(1,28)}=6,7$; $p<0.05$; Joonis 3A). Üksikmajutuses hoitud loomad sisenesid rohkem heledasse alasse võrreldes standardmajutuses hoitud loomadega.

Esimesel katse päeval ei esinenud statistiliselt olulisi erinevusi heledas alas viibitud aja osas, kuid katse kolmandaks korraks viibisid *Lsamp* -/- hiired oluliselt kauem aega heledas alas võrreldes *Lsamp* +/+ hiirtega ($p<0,05$; Joonis 3B). Katse kolmandaks korraks langes oluliselt heledas alas viibitud aeg tavatingimustes hoitud *Lsamp* +/+ hiirtel.

Korduvmõõtmiline dispersioonanalüüs näitas, et ei genotüüp ega keskkond ei põhjusta olulisi erinevusi latentsis (Lisa).



Joonis 3. Hele-tume puuri katse tulemused. 3A. Käikude arv heledasse alasse. * – $p < 0.05$ *Lsamp* -/- võrreldes *Lsamp* +/+ hiirtega samades keskkonna tingimustes, # – $p < 0.05$ *Lsamp* -/- isolatsiooni keskkonnas esimesel päeval võrreldes *Lsamp* -/- hiirtega samades keskkonna tingimustes kolmandal päeval. 3B. Heledas alas viibitud aeg. * – $p < 0.05$

Lsamp *-/-* võrreldes *Lsamp* *+/+* hiirtega samades keskkonna tingimustes, # – $p < 0.05$ *Lsamp* *+/+* tavatingimustes komandal päeval võrreldes *Lsamp* *+/+* hiirtega samades keskkonna tingimustes esimesel päeval. C. Latents. N = 8 igas grupis. Andmed on esitatud koos keskmise standardveaga (\pm SEM).

IM – isolatsioonimajutus, SM – standardmajutus

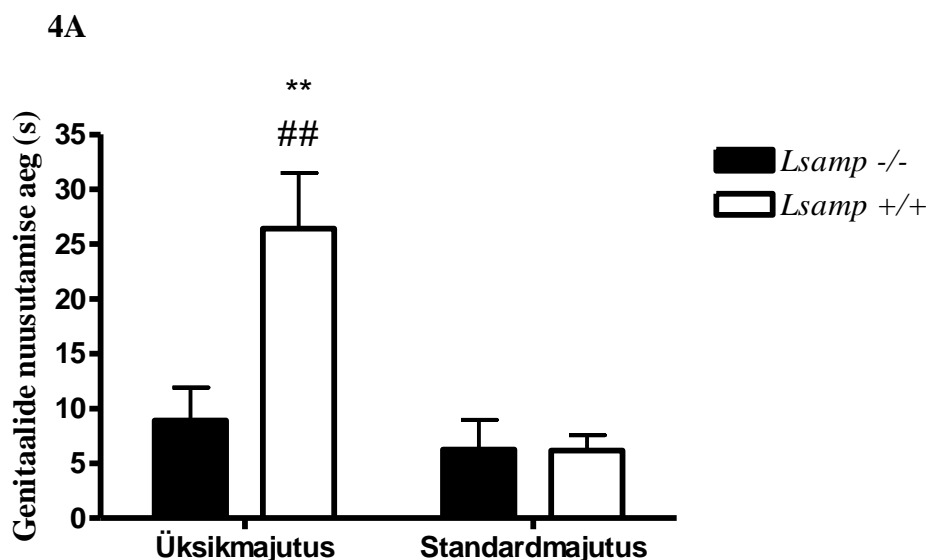
3.4. Sotsiaalne interaktsioon emastel

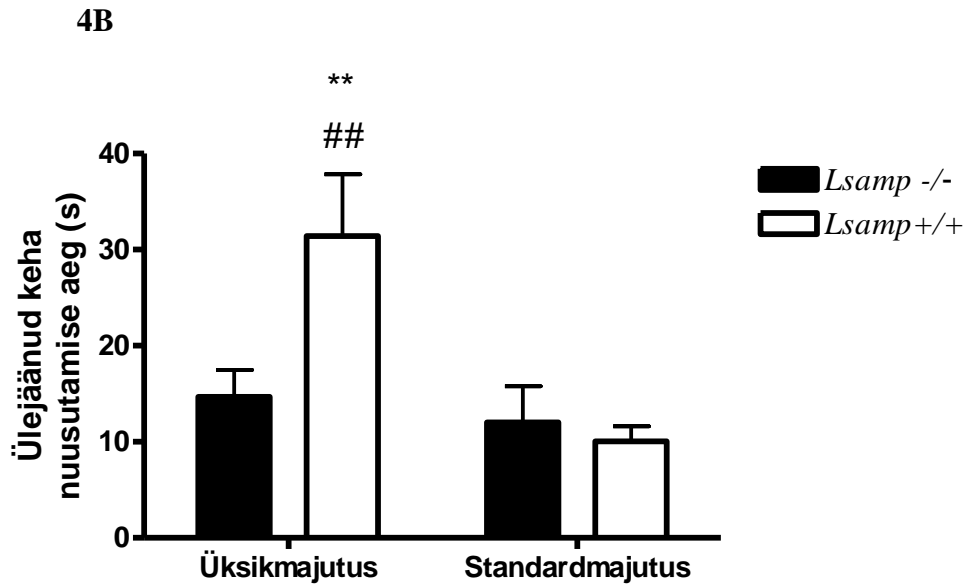
Sotsiaalse interaktsiooni tulemuste analüüsist selgus, et nii genotüüp kui ka keskkond mõjutavad olulisel määral loomade sotsiaalset käitumist.

Leiti, et genitaalide nuusutamise aeg sõltub genotüübist ($F_{(1,18)}=7,1$; $p<0,05$), keskkonnast ($F_{(1,18)}=12,3$; $p<0,01$) ja genotüübi x keskkonna interaktsioonist ($F_{(1,18)}=7,3$; $p<0,05$; Joonis 4A).

Isolatsioon pikendas genitaalide nuusutamise aega *Lsamp* *+/+* hiirtel ($p<0,01$).

Statistiliselt olulised erinevused ülejaanud kehaosade nuusutamise osas esinesid isolatsioonis ja standard tingimustes elavate hiirte vahel ($F_{(1,18)}=9,2$; $p<0,01$; Joonis 4B). Ilmnes keskkonna x genotüübi interaktsiooni efekt ($F_{(1,18)}=5,6$; $p<0,05$; Joonis 4B). Isolatsioonis hoitud *Lsamp* *+/+* hiired nuusutavad teisi keha osi oluliselt rohkem võrreldes tavatingimustes hoitud *Lsamp* *+/+* hiirtega ja isolatsioonis hoitud *Lsamp* *-/-* hiirtega. Agressiivset käitumist esines vaid ühel korral üksikmajutuses hoitud hiire puhul, tavatingimustes agressiivset käitumist ei esinenud.



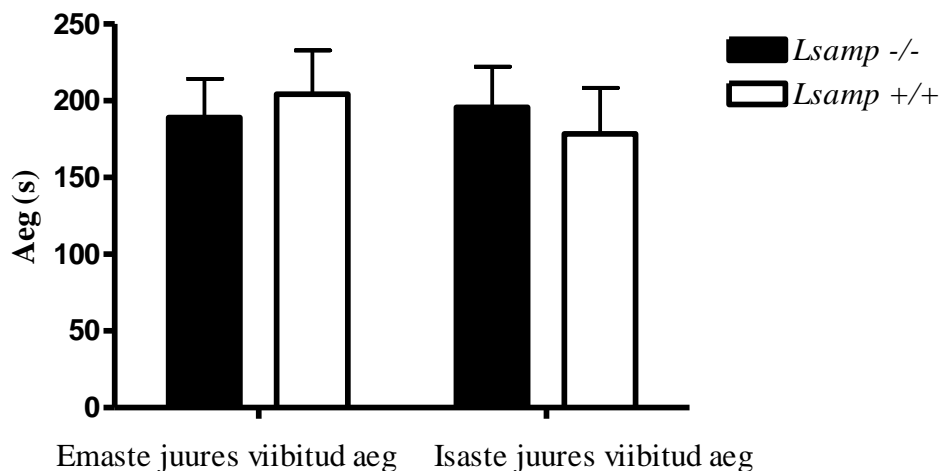


Joonis 4. Sotsiaalse interaktiooni katse tulemused emaste hiirtega. 4A. Genitaalide nuusutamine 4B. Mujalt nuusutamine. N = 22 (12 standard- ja üksikmajutuses hoitud *Lsamp*^{-/-} looma ja 10 standard- ja üksikmajutuses hoitud *Lsamp*^{+/+} looma). Andmed on esitatud koos keskmise standardveaga (\pm SEM).

** – $p < 0.01$ *Lsamp* +/+ võrreldes *Lsamp* -/- hiirtega samades keskkonna tingimustes
 ## – $p < 0.01$ *Lsamp* +/+ isolatsiooni keskkonnas võrreldes *Lsamp* +/+ hiirtega tavatingimustes.

3.5. Sotsiaalse eelistuse katse isastega

Katse tulemused ei näidanud erinevate katsegruppide vahel statistiliselt olulisi erinevusi emaste juures viibitud ajas ja isaste juures viibitud ajas (Joonis 5A, Joonis 5B).



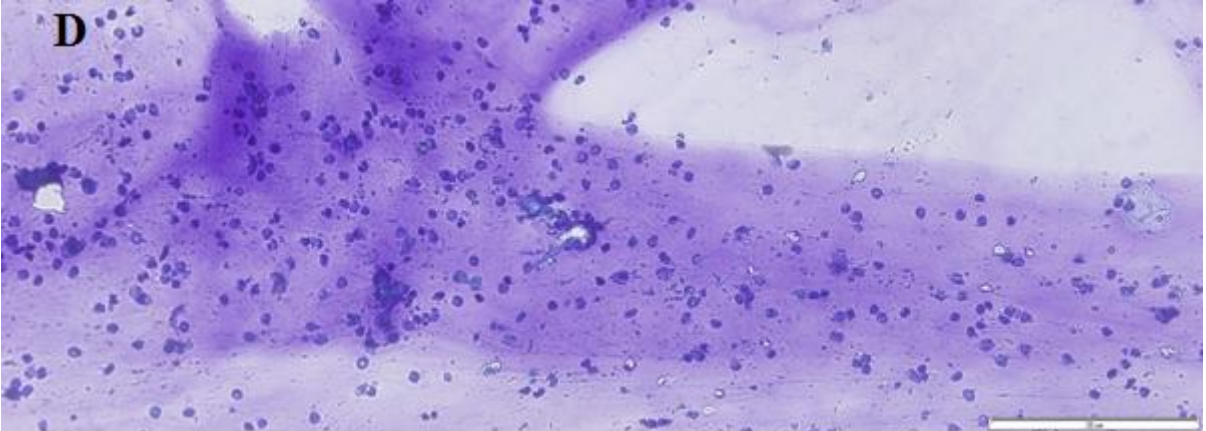
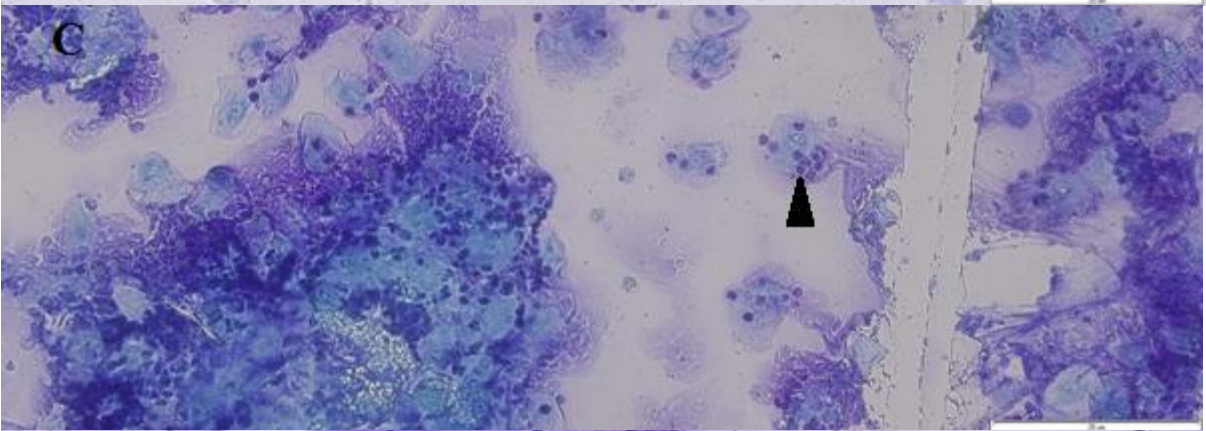
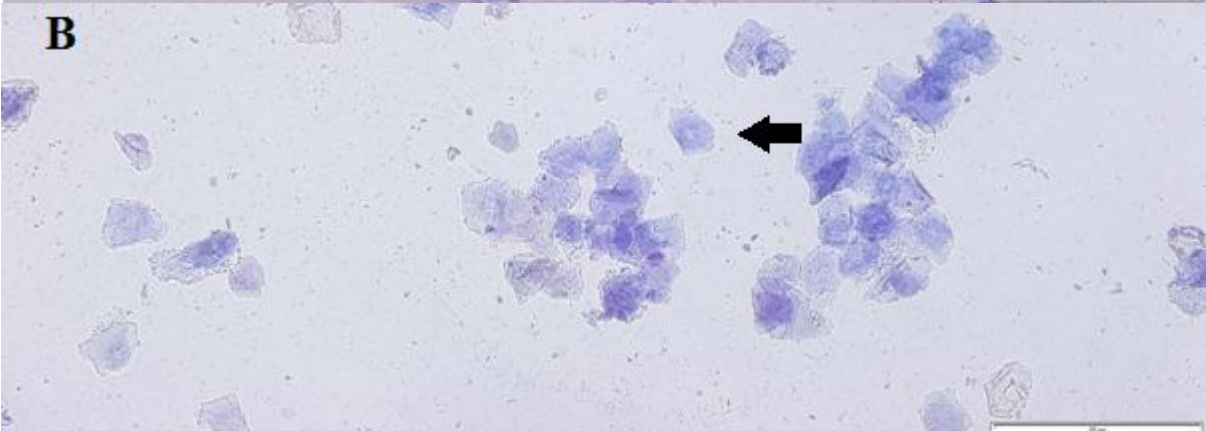
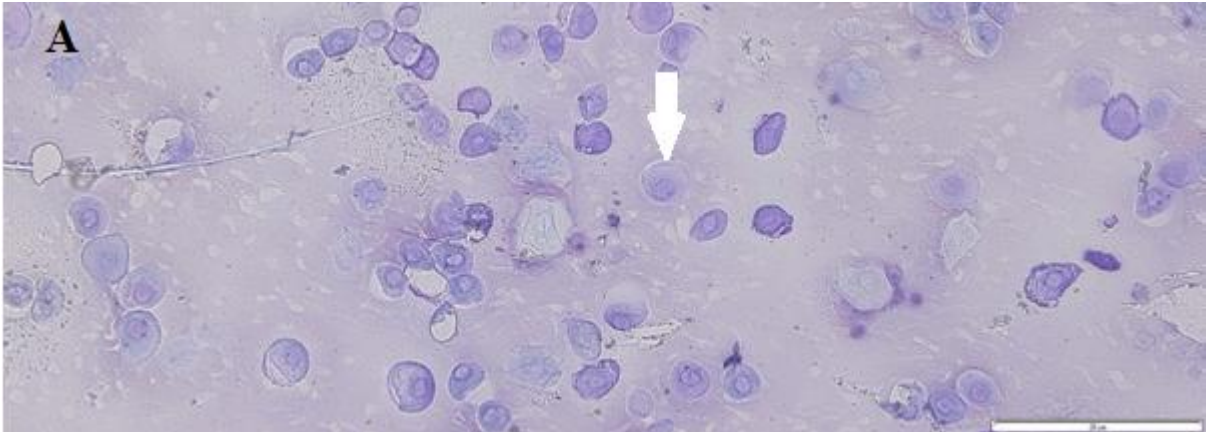
Joonis 5. Sotsiaalse eelistuse katse tulemused isaste hiirtega. A. Emaste juures viibitud aeg ja isaste juures viibitud aeg. Andmed on esitatud koos keskmise standardveaga (\pm SEM).

3.6 Estruse faasid

Estruse faaside määramiseks kasutati tupe tsütoloogia meetodit. Faasi selgitasime välja rakkude koostise analüüsi teel (Zenclussen jt., 2014).

Diestruse (Joonis. 7D) ajal võib näha vaid leukotsüüte koos mõne epiteelrakuga. Proestruse (Joonis 7A) ajal aga tuumadega epiteelrakke ning lisaks leukotsüütidele ka mõnda sarvestunud epiteelrakku.

Estruse (Joonis B) ajal leidub aga ainult sarvestunud rakke. Metestruse (Joonis 7C) perioodil esineb sarvestunud epiteelrakke koos leukotsüütidega.



Joonis 7. Estruse tsükli faasid. A. Proestrus, B. Estrus, C. Metestrus ja D. Diestrus. On tuvastatud kolm rakutüüpi: tuumaga epiteelirakud (valge nool), sarvestunud epiteelirakud (must nool) ja leukotsüüdid (must kolmnurk). Objektiivi suurendus 20x

4. ARUTELU

Käesolevas töös uurisime *Lsamp* -/- hiirte sotsiaalset käitumist pöörates erilist tähelepanu emasloomadele. Uurisime ka sotsiaalse isolatsiooni mõju nendele loomadele.

Sotsiaalse interaktsiooni katse tulemused tavatingimustes hoitud emastega ei tuvastanud statistiliselt olulisi erinevusi *Lsamp* +/+ ja *Lsamp* -/- hiirte käitumise vahel. Standardtingimustes kasvanud *Lsamp* -/- emaste käitumine oli sarnane *Lsamp* +/+ emaste käitumisega. See erineb varasemalt isasloomadega tehtud katsetest. Eelnevad uurimistööd *Lsamp* -/- ja *Lsamp* +/+ hiirtega on näidanud erinevusi standardsetesse oludesse paigutatud isasloomade käitumises (Innos jt., 2011). Näiteks olid seal *Lsamp* -/- hiired oluliselt vähem agressiivsed, mis ilmnis muuhulgas ka väiksemas huvis partneri genitaalide vastu.

Ainsaks mõõdetud erinevuseks sotsiaalse interaktsiooni katses tavatingimustes kasvanud *Lsamp* +/+ ja *Lsamp* -/- emasloomade vahel oli üks agressiivse käitumise juhtum *Lsamp* +/+ hiirte vahel. Üks võimalik seletus sellele episoodile võib olla partnerite kehakaalude erinevus, mis ületas soovitusliku 5% (sobivate vastaste puudumise tõttu antud paaris 9,7 %). Uurimised näitavad (White jt., 1969), et vaatamata sellele, et emasloomad on isastest tunduvalt vähem agressiivsed, võivad nad ikkagi käituda agressiivselt neist kaalult väiksemate emaste suhtes.

Ärevus võib osutada oluliseks teguriks, mis avaldab mõju sotsiaalsele käitumisele. Kõrge ärevuse tasemega hiired püüavad vältida uusi olukordi ja seeläbi ka vastastikuseid sotsiaalsid interaktsioone. Selle vastandina tunnevad madala ärevuse tasemega hiired aktiivselt huvi keskkonna ja seal leiduvate liigikaaslaste vastu (Crawley, 2007). Eelnevast lähtudes korraldasime rea katseid, et kindlaks määrata katseloomade ärevuse taset.

Pluss-puuri katses ilmnis genotüüpi efekt ja *Lsamp* -/- hiired käisid sagedamini avatud õlgades võrreldes *Lsamp* +/+ hiirtega. Need tulemused viitavad, et *Lsamp* -/- emashiirte ärevuse tase on madalam kui *Lsamp* +/+ hiirtel. Katse tulemused langevad kokku varem isasloomadega korraldatud analoogse katse tulemustega.

Tume-hele puuri katses ilmnis statistiliselt oluline genotüübi efekt avatud alas viibitud ajas.

Leidsime, et katse kolmandaks päevaks hakkasid *Lsamp* +/+ hiired oluliselt vähem aega heledas alas viibima. Heledas ruumis viibimise aja lühendamine võib *Lsamp* +/+ hiirtel olla seotud mitte kõrgema ärevuse tasemega vaid sellega, et hiired harjuvad viibima katsetingimustes. Tulemused

võivad viidata sellele, et *Lsamp* $-/-$ hiired on võimetus ohtlikus olukorras uudistamiskäitumist pidurdama.

Saadud tulemused ei toonud esile mingeid erinevusi tavatingimustes hoitud emasloomade käitumises. *Lsamp* $-/-$ emasloomade sotsiaalne käitumine ei ole häiritud; seda kinnitavad ka avaldamata tulemused *Lsamp* $-/-$ hiirte paljunemise ja lõimetishoole vallas. Üks võimalik seletus selle nähtuse puhul võib olla see, et ühe perekonna IgLON geeni puudumisel suureneb sama perekonna ülejäänud valkude süntees, mis võib kompenseerida ja maskeerida *Lsamp*-geeni puudumist.

Väga oluliseks eesmärgiks antud töö tegemisel oli välja selgitada, kas sotsiaalne isolatsioon mõjutab *Lsamp* $-/-$ ja *Lsamp* $+/+$ emaseid erinevalt. Leidsime, et isolatsioon suurendas kõigi sotsiaalse interaktsiooni katses mõõdetud parameetrite aega (partneri genitaalide ja muude kehaosade nuusutamine), samuti vähendas see katse kolmandaks päevaks oluliselt *Lsamp* $+/+$ hiirte kaalu, samal ajal kui nende parameetrite muutusi ei täheldatud *Lsamp* $-/-$ emastel.

Kui hinnata hiirte stressiseisundit kaalumutuste põhjal, siis võib oletada, et *Lsamp* $+/+$ emased, kes on paigutatud sotsiaalse isolatsiooni tingimustesse, on stressiseisundis, samas kui muutused elutingimustes ei mõjuta *Lsamp* $-/-$ hiirte füüsilist seisundit. Nende tulemuste põhjal võib järjeldada, et *Lsamp* $-/-$ emased on vähem tundlikud stressisituatsioonidele. See kajastub ka sotsiaalse interaktsiooni katse tulemustes, milles sotsiaalselt isoleeritud *Lsamp* $-/-$ hiirtel ei märgatud mingeid erinevusi, võrreldes nende *Lsamp* $-/-$ hiirte käitumisega, keda peeti tavatingimustes. Samal ajal sotsiaalse interaktsiooni suurenemine, mida meie täheldasime *Lsamp* $+/+$ emastel, on iseloomulik käitumine sotsiaalselt isoleeritud isendite puhul (Hilakivi jt., 1988).

Edasistes uuringutes tuleks hoolikalt uurida CORT-i taset emaste sotsiaalse isolatsiooni algfaasis. Uuringud on näidanud, et stress põhjustab tavaliselt suurenenud CORT-i tsirkuleerivaid tasemeid. See omakorda võib viia neurogeneesi häireteni, kahjustades hipokampuse rakkude proliferatsiooni ja ellujäämise võimet, mis võimaldab organismil kohaneda väliskeskkonna probleemide ja väljakutsetega (Pereda-Perez, 2013). Innos ja kolleegid ei tuvastanud muutusi tsirkuleerivas CORT-i tasemes hiirtel (Innos jt., 2011). Nemad tegid katsed isashiirtega ning mõõtmised tehti vaid üks kord katse lõpus. CORT-i mõõtmistulemused aitaksid kinnitada *Lsamp* $-/-$ hiirte vähenenud tundlikkust stressiolukordades.

Selle töö käigus pidasime vajalikuks uurida ka *Lsamp* geeni mõju isasloomade sotsiaalsele eelistusele. Varem on Innos ja kolleegid teatanud häiretest isasloomade käitumises: *Lsamp* $-/-$ isasloomad nuusutasid sotsiaalse interaktsiooni katses isasloomade genitaale tunduvalt lühemat aega

kui *Lsamp* +/+ loomad. Emasloomadega läbi viidud sarnane katse ei näidanud erinevusi. Ka meie sotsiaalse eelistuse katse tulemused näitasid, et *Lsamp* -/- isasloomade käitumine ühtib *Lsamp* +/+ isasloomade omaga. Selle põhjuseks võib olla see, et sotsiaalse interaktsiooni ja sotsiaalse eelistuse katsetes uuritakse eri tüüpi käitumist. Innos jt. poolt läbiviidud katsetes uuriti sotsiaalse interaktsiooni käitumist. Tulemused näitasid, et *Lsamp* -/- isashiirtel on agonistlik käitumine vähenenud, mis põhjustab häireid sotsiaalses hierarhias. Meie poolt läbiviidud katsetes uuriti seksuaalset käitumist ja ei tuvastanud statistiliselt olulisi erinevusi *Lsamp* -/- ja *Lsamp* +/+ hiirte käitumises. Need tulemused viitavad, et *Lsamp* geen mõjutab eri tüüpi sotsiaalset käitumist erinevalt.

Lsamp geeni mõju seksuaalse käitumisele nõuab täiendavat uurimist. Edasistes uuringutes tuleks uurida isolatsiooni ja teiste stressorite mõju seksuaalse käitumisele. Meie töö tulemused näitasid, et isolatsiooni keskkonnas ilmnevad muutused käitumises *Lsamp* +/+ ja *Lsamp* -/- emaste hiirte vahel. Seega ei saa välistada, et isolatsioon viib muutusteni ka seksuaalses käitumises *Lsamp* +/+ ja *Lsamp* -/- isaste hiirte vahel.

KOKKUVÕTE

Käesoleva töö eesmärgiks on uurida, kas *Lsamp*^{-/-} emasloomade sotsiaalne käitumine erineb *Lsamp*^{+/+} emasloomade käitumisest ja milline on sotsiaalse isolatsiooni mõju emastele hiirtele. Me pidasime tähtsaks täiendada juba olemasolevaid isashiirte käitumise uurimiste tulemusi uue katse põhjal tehtud järeldustega ning tahtsime jõuda selgusele, kas *Lsamp* geen avaldab mõju nende sotsiaalsetele eelistustele.

Selgus, et tavatingimustes on *Lsamp*^{-/-} emaste sotsiaalne käitumine sarnane *Lsamp*^{+/+} emaste käitumisega. Kuna ärevus kuulub nende faktorite hulka, mis võivad käitumist mõjutada, viisime läbi katse eesmärgiga mõõta *Lsamp*^{-/-} ja *Lsamp*^{+/+} emasloomade ärevuse tasemeid. Katse tulemustele toetudes jõudsime ootuspäraselt järeldusele, et *Lsamp*^{-/-} emasloomade ärevuse tase on madalam kui *Lsamp*^{+/+} emasloomadel.

Sotsiaalse isolatsiooni mõju uurimisel hiirte käitumisele selgus, et isolatsioon tõstis *Lsamp*^{+/+} hiirtel kõigi mõõdetud parameetrite tulemusi sotsiaalse interaktsiooni katses, aga *Lsamp*^{-/-} emasloomade isoleerimine ei avaldanud nende käitumisele mõju. Antud tulemused koos katseloomade kaalu muutuste analüüsiga lubavad oletada, et *Lsamp*^{-/-} emasloomad on vähem tundlikud välismõjudest tingitud stressi suhtes.

Huvitavaid tulemusi saime siis, kui viisime läbi katse *Lsamp*^{-/-} ja *Lsamp*^{+/+} isasloomade sotsiaalsete eelistuste väljaselgitamiseks. Me ei märganud olulisi lahknevusi nende kahe grupi käitumises, mis on üllatav, sest varasemalt avaldatud tööd on viidanud sotsiaalse käitumise häiretele *Lsamp*^{-/-} isasloomadel.

Järgnevalt on välja toodud antud töö põhitulemused:

1. Tavatingimustes on *Lsamp*^{-/-} emaste hiirte sotsiaalne käitumine sarnane *Lsamp*^{+/+} emaste sotsiaalse käitumisega.
2. Isolatsioon põhjustab olulist kehakaalu langust *Lsamp*^{+/+} emaste hiirtel, kuid mitte *Lsamp*^{-/-} emaste hiirtel.
3. Isolatsioon põhjustab sotsiaalse interaktsiooni suurenemist *Lsamp*^{+/+} emaste hiirtel, samas muutused elutingimustes ei mõjuta *Lsamp*^{-/-} emaste sotsiaalset käitumist.
4. Tavatingimustes on *Lsamp*^{-/-} isaste hiirte seksuaalne käitumine sarnane *Lsamp*^{+/+} isaste käitumisega.

The effects of *Lsamp* gene on social behaviour in mice

Julia Gretšanaja

Summary

Social behaviour is fundamental characteristic of living organism. Certain neurological and psychiatric disorders, including schizophrenia, autism, Alzheimer's disease and bipolar disorder, are characterized by disruptions of social behaviors. Mouse models may provide a platform for understanding the neurological networks and mechanisms that are involved in neuropsychiatric disorders.

Lsamp gene encodes the limbic system-associated membrane protein (LAMP), a cell adhesion molecule found in limbic regions of developing and adult brain. LAMP mediates neuronal growth and synaptic formation. Studies in mice have shown that *Lsamp* is associated with anxiety, social behaviour and fear reaction. Also in human, *Lsamp* has been associated with schizophrenia, bipolar disorders and completed suicides.

The aim of this thesis was to study the effects of *Lsamp* gene on social behaviour in mice, paying special attention to female mice, as the majority of the previous research has primarily focused on male rodents. We also investigated the effects of isolation on phenotype of female mice. Social isolation is a stressful event for social species, which may produce alterations in social behaviour. We subjected *Lsamp* ^{-/-} male and female mice and their wild type littermates to the behavioural tests.

In the social interaction test group-housed *Lsamp* ^{-/-} female mice did not show any alterations in social behaviour. We further examined their anxiety levels, as it could be an important factor for deficits in social behaviour. Our results show that *Lsamp* ^{-/-} mice are less anxious than wild type mice. We also found that social isolation increases social interactions in wild type females but fails to do so in *Lsamp* ^{-/-} mice. In addition, social isolation led to decreased body weight in wild type mice particularly at the beginning of the isolation but does not affect *Lsamp* ^{-/-} females. In the social preference test with males we did not detect any differences among the different genotypes. Our results also demonstrate that *Lsamp* ^{-/-} mice are less sensitive to stressful conditions.

TÄNUSÕNAD

Ma tahan tänada oma juhendajat Indrek Heinlat suure abi eest, mis ta on osutanud mulle diplomitöö ettevalmistamisel ja kannatlikkuse ning valmisoleku eest pühendada oma aega minu probleemide arutamisele. Samuti tahan tänada Kersti Lilevälja abi ja nõuannete eest selle töö kirjutamisel. Minu tänu kuulub ka kõigile labori töötajatele nende abivalmis suhtumise eest mitmete probleemide lahendamisel.

KASUTATUD KIRJANDUS

Abramov U, Puussaar T, Raud S, Kurrikoff K, Vasar E (2008). Behavioural differences between C57BL/6 and 129S6/SvEv strains are reinforced by environmental enrichment. *Neuroscience Letters* 443. 223–227

An XL, Zou JX, Wu RY, Yang Y, Tai FD, Zeng SY, Jia R, Zhang X, Liu EQ, Broders H (2011). Strain and sex differences in anxiety-like and social behaviors in C57BL/6J and BALB/cJ mice. *Exp Anim.* 60(2):111-23.

Avitsur R, Stark JL, Sheridan JF (2001). Social stress induces glucocorticoid resistance in subordinate animals. *Horm Behav* 39(4): 247–257.

Audet MC, Anisman H (2010). Neuroendocrine and neurochemical impact of aggressive social interactions in submissive and dominant mice: implications for stress-related disorders. *Int J Neuropsychopharmacol* 13(3): 361–372.

Ahmed EI, Zehr JL, Schulz KM, Lorenz BH, Don Carlos LL, Sisk CL (2008). Pubertal hormones modulate the addition of new cells to sexually dimorphic brain regions. *Nat. Neurosci.* 11, 995–997.

Balu DT Lucki I (2009). Adult hippocampal neurogenesis: regulation, functional implications, and contribution to disease pathology. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 33, 232–252.

Becker C, Zeau B, Rivat C, Blugeot A, et al. (2008). Repeated social defeat-induced depressive-like behavioral and biological alterations in rats: involvement of cholecystokinin. *Molecular Psychiatry* 13, 1079–1092.

Behan AT, Byrne C, Dunn MJ, Cagney G, Cotter DR (2009). Proteomic analysis of membrane microdomain-associated proteins in the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia and bipolar disorder reveals alterations in LAMP, STXBP1 and BASP1 protein expression. *Mol Psychiatry*.14: 601–613.

Berton O, McClung CA, Dileone RJ, Krishnan V, Renthal W, et al. (2006). Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. *Science* 311: 864–868.

Bridges NJ, Starkey NJ (2004). Sex differences in Mongolian gerbils in four tests of anxiety. *Physiol. Behav.* 83, 119–127.

Buwalda B, van der Borgh K, Koolhaas JM, McEwen BS (2010). Testosterone decrease does not play a major role in the suppression of hippocampal cell proliferation following social defeat stress in rats. *Physiol Behav* 101(5): 719–725.

Catania EH, Pimenta A, Levitt P (2008). Genetic deletion of *Isamp* causes exaggerated behavioral activation in novel environments. *Behav Brain Res.* 188:380–390.

Clelland CD, Choi M, Romberg C, Clemenson Jr GD, Fragniere A, Tyers P, Jessberger S, Saksida LM, Barker RA, Gage FH, Bussey TJ (2009). A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. *Science* 325, 210–213.

- Crawley JN (2000). *What's Wrong With My Mouse? Behavioral Phenotyping of Transgenic and Knockout Mice*. Wiley-Liss, John Wiley & Sons, Inc.; New York, NY.
- Crawley JN (2007). Mouse behavioral assays relevant to the symptoms of autism. *Brain Pathol.* 17, 448–459.
- Cook MN, Bolivar VJ, McFadyen MP, Flaherty L (2002). Behavioral differences among 129 substrains: implications for knockout and transgenic mice. *Behav Neurosci.* 116(4):600-11.
- Czéh B, Abumaria N, Rygula R, Fuchs E (2010). Quantitative changes in hippocampal microvasculature of chronically stressed rats: no effect of fluoxetine treatment. *Hippocampus* 20(1): 174–185.
- Eagleson KL, Pimenta AF, Burns MM, Fairfull LD, Cornuet PK, Zhang L, Levitt P (2003). Distinct domains of the limbic system-associated membrane protein (LAMP) mediate discrete effects on neurite outgrowth. *Molecular and Cellular Neuroscience.* 24:725–740.
- Ferdman N, Murmu RP, Bock J, Braun K, Leshem M (2007). Weaning age, social isolation, and gender, interact to determine adult explorative and social behavior, and dendritic and spine morphology in prefrontal cortex of rats. *Behav. Brain Res.* 180, 174–182.
- Furuta M, Bridges RS, (2009). Effects of maternal behavior induction and pup exposure on neurogenesis in adult, virgin female rats. *Brain Res. Bull.* 80, 408–413.
- Grippe AJ, Gerena D, Huang J, Kumar N, Shah M, Ughreja R, Carter CS (2007a). Social isolation induces behavioral and neuroendocrine disturbances relevant to depression in female and male prairie voles. *Psychoneuroendocrinology* 32, 966–980.
- Grippe AJ, Lamb DG, Carter CS, Porges SW (2007b). Social isolation disrupts autonomic regulation of the heart and influences negative affective behaviors. *Biol. Psychiatry* 62, 1162–1170.
- Grippe AJ, Wu KD, Hassan I, Carter CS (2008). Social isolation in prairie voles induces behaviors relevant to negative affect: toward the development of a rodent model focused on co-occurring depression and anxiety. *Depress. Anxiety* 25, E17–E26.
- Hall FS, Huang S, Fong GW, Pert A, Linnoila ML (1998). Effects of isolation-rearing on locomotion, anxiety and responses to ethanol in Fawn Hooded and Wistar rats. *Psychopharmacology.* 139:203–209.
- Hilakivi LA, Ota M, Lister RG (1989). Effect of isolation on brain monoamines and the behavior of mice in tests of exploration, locomotion, anxiety and behavioral 'despair'. *Pharmacol Biochem Behav* 33: 371–374.
- Horton HL, Levitt PA (1998). Unique membrane protein is expressed on early developing limbic system axons and cortical targets. *J Neurosci.* 8: 4653–4661
- Ibi D, Takuma K, Koike H, Mizoguchi H, Tsuritani K, Kuwahara Y, Kamei H, Nagai T, Yoneda Y, Nabeshima T, Yamada K (2008). Social isolation rearing-induced impairment of the hippocampal

neurogenesis is associated with deficits in spatial memory and emotion-related behaviors in juvenile mice. *J. Neurochem.* 105, 921–932.

Imayoshi I, Sakamoto M, Ohtsuka T, Kageyama R (2009). Continuous neurogenesis in the adult brain. *Dev. Growth Differ.* 51, 379–386.

Innos J, Philips MA, Leidmaa E, Heinla I, Raud S, Reemann P, Plaas M, Nurk K, Kurrikoff K, Matto V, Visnapuu T, Mardi P, Kõks S, Vasar E (2011). Lower anxiety and a decrease in agonistic behaviour in *Lsmp*-deficient mice. *Behav Brain Res.* 2011 217(1):21-31.

Jacobson-Pick S, Audet MC, McQuaid RJ, Kalvapalle R, Anisman H (2013). Social Agonistic Distress in Male and Female Mice: Changes of Behavior and Brain Monoamine Functioning in Relation to Acute and Chronic Challenges. *PLOS* DOI: 10.1371/journal.pone.0060133

Jessberger S, Clark RE, Broadbent NJ, Clemenson Jr GD, Consiglio A, Lie DC, Squire LR, Gage FH (2009). Dentate gyrus-specific knockdown of adult neurogenesis impairs spatial and object recognition memory in adult rats. *Learn. Mem.* 16, 147–154.

Keeney A, Jessop DS, Harbuz MS, Marsden CA, Hogg S, et al. (2006) Differential effects of acute and chronic social defeat stress on hypothalamic-pituitary-adrenal axis function and hippocampal serotonin release in mice. *J Neuroendocrinol* 18(5): 330–338.

Keller F, Rimvall K, Barbe MF, Levitt P (1989). A membrane glycoprotein associated with the limbic system mediates the formation of the septo-hippocampal pathway in vitro. *Neuron.* 3:551–61.

Koido K, Koks S, Must A, Reimets A, Maron E, Shlik J, et al. (2006): Association analysis of limbic system-associated membrane protein gene polymorphisms in mood and anxiety disorders. *Eur Neuropsychopharmacol* 16(suppl 1):S9.

Kõks S, Luuk H, Nelovkov A, Areda T, Vasar E (2004). A screen for genes induced in the amygdaloid area during cat odor exposure. *Genes Brain Behav.* 3(2):80-9.

Lagace DC, Donovan MH, DeCarolis NA, Farnbauch LA, Malhotra S, et al. (2010) Adult hippocampal neurogenesis is functionally important for stress-induced social avoidance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(9): 4436–4441.

Landau Steven, Moore Lisa A (1991). Social skill deficits in children with attention-deficit hyperactivity disorder. *School Psych Rev.* 20:235–251.

Levitt P (1984). A monoclonal antibody to limbic system neurons. *Science.* 223: 299–301.

Lieberwirth C, Liu Y, Jia X, Wang Z (2012). Social isolation impairs adult neurogenesis in the limbic system and alters behaviors in female prairie voles. *Hormones and Behavior* 62 357–366

Lijam N, Paylor R, McDonald MP, Crawley JN, Deng CX, Herrup K, et al (1997). Social interaction and sensorimotor gating abnormalities in mice lacking *Dvl1*. *Cell.* 90:895–905.

- Loo PL van, Zutphen LF van, Baumans V (2003). Male management: Coping with aggression problems in male laboratory mice. *Lab Anim.* 37(4):300-313.
- Mak GK, Weiss S (2010). Paternal recognition of adult offspring mediated by newly generated CNS neurons. *Nat. Neurosci.* 13, 753–758.
- Maron E, Koido K, Must A, Reimets A, Koks S, Vasar E, et al (2006). Association study of limbic system-associated membrane protein gene polymorphisms in panic disorder. *Eur Neuropsychopharmacol* 16:459–460.
- Matsumoto K, Pinna G, Puia G, Guidotti A, Costa E (2005). Social isolation stress-induced aggression in mice: a model to study the pharmacology of neurosteroidogenesis. *Stress.* 8:85–93.
- Mueser KT, Bellack AS, Douglas MS, Morrison RL (1991). Prevalence and stability of social skill deficits in schizophrenia. *Schizophr Res.* 5:167–176.
- Mundy P, Sigman MD, Ungerer J, Sherman T (1986). Defining the social deficits of autism: The contribution of non-verbal communication measures. *J Child Psychol Psychiatry.* 27:657–669.
- Must A, Tasa G, Lang A, Vasar E, Kõks S, Maron E, et al (2008) Association of limbic system-associated membrane protein (LSAMP) to male completed suicide, *BMC Med. Genet.* 9 34.
- Nelovkov A, Philips MA, Kõks S, Vasar E (2003). Rats with low exploratory activity in the elevated plus-maze have the increased expression of limbic system-associated membrane protein gene in the periaqueductal grey. *Neurosci Lett.* 352:179–82.
- Nelovkov A, Areda T, Innos J, Kõks S, Vasar E (2006). Rats displaying distinct exploratory activity also have different expression patterns of gammaaminobutyric acid- and cholecystokinin-related genes in brain regions. *Brain Res.* 1100:21–31.
- Pan Y, Liu Y, Young KA, Zhang Z, Wang Z (2009). Post-weaning social isolation alters anxiety-related behavior and neurochemical gene expression in the brain of male prairie voles. *Neurosci. Lett.* 454, 67–71.
- Pereda-Perez I, Popovic N, Otalora BB, Popovic M, Madrid JA, Rol M.A, et al. (2013). Long-term social isolation in the adulthood results in CA1 shrinkage and cognitive impairment. *Neurobiol. Learn. Mem.* 106, 31–39.
- Pimenta AF, Zhukareva V, Barbe MF, Reinoso BS, Grimley C, Henzel W et al (1995). The limbic system-associated membrane protein is an Ig superfamily member that mediates selective neuronal growth and axon targeting. *Neuron.* 15: 287–297
- Pimenta AF, Fischer I, Levitt P (1996). cDNA cloning and structural analysis of the human limbic-system-associated membrane protein (LAMP) *Gene.* 170:189–95.
- Qiu S, Champagne DL, Peters M, Catania EH, Weeber EJ, Levitt P and Pimenta AU (2010). Loss of limbic system-associated membrane protein leads to reduced hippocampal mineralocorticoid

receptor expression, impaired synaptic plasticity, and spatial memory deficit. *Biological Psychiatry* 68(2): 197-204

Rapin I, Tuchman RF (2008). Autism: definition, neurobiology, screening, diagnosis. *Pediatr Clin North Am.* 55:1129–1146.

Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, et al (2003). Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 301, 805–809.

Shors TJ, Miesegaes G, Beylin A, Zhao M, Rydel T, Gould E (2001). Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature* 410, 372–376.

Strozik E & Festing MFW (1981). Whisker trimming in mice. *Laboratory Anim*'lls 15, 309-312.
Vialou V, Robison AJ, Laplant QC, Covington HE 3rd, Dietz DM, et al (2010). DeltaFosB in brain reward circuits mediates resilience to stress and antidepressant responses. *Nat Neurosci* 13(6): 745–752.

Vom Saal FS, Franks P, Boechler M, Palanza P, Parmigiani S (1995). Nest defense and survival of offspring in highly aggressive wild Canadian female house mice. *Physiology & Behavior* Volume 58, Issue 4, Pages 669–678

Westenbroek C, Den Boer JA, Veenhuis M, Ter Horst GJ (2004). Chronic stress and social housing differentially affect neurogenesis in male and female rats. *Brain Res. Bull.* 64, 303–308.

White M, Mayo S and Edwards DA (1969). Fighting in female mice as a function of the size of opponent. *Psychon Sci.* 16:14 – 15

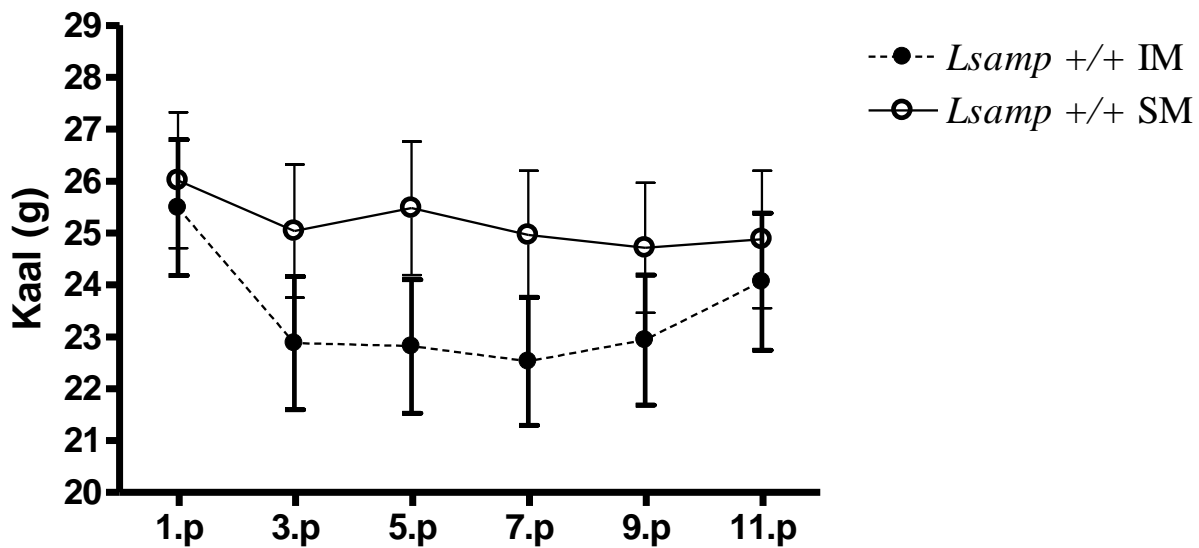
Wright IK, Upton N, Marsden CA (1991). Resocialisation of isolation-reared rats does not alter their anxiogenic profile on the elevated X-maze model of anxiety. *Physiol. Behav.* 50, 1129–1132.

Zenclussen ML, Casalis PA, Jensen F, Woidacki K, Zenclussen AC (2014). Hormonal Fluctuations during the Estrous Cycle Modulate Heme Oxygenase-1 Expression in the Uterus. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 13;5:32.

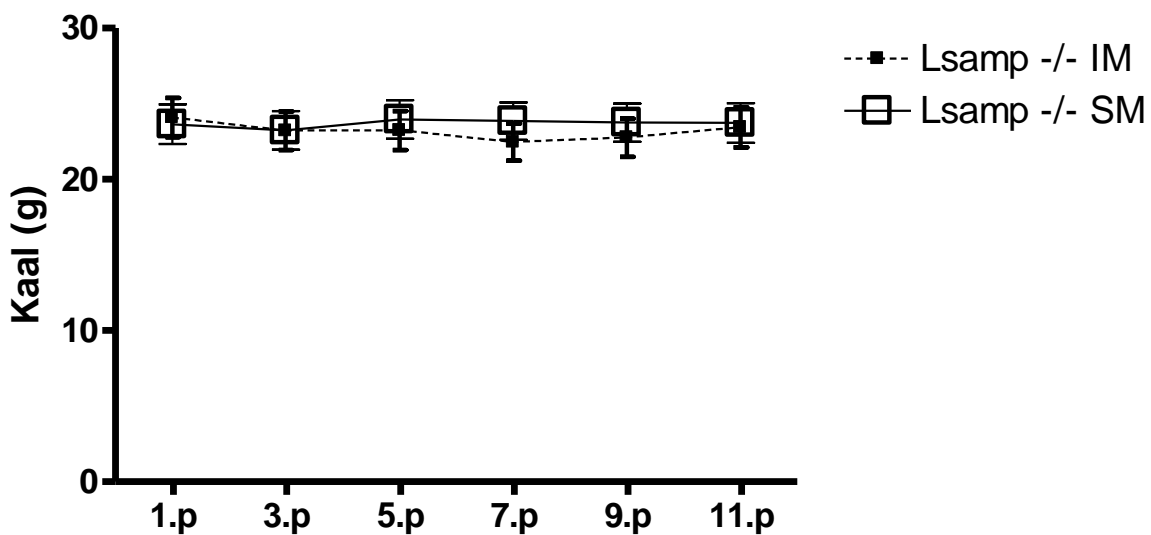
LISAD

Lisa 1

1A



1B



Joonis 6. Kehakaalu muutused. A. On näidatud *Lsamp* +/+ emashiirte kehakaalu muutused. B. On näidatud *Lsamp* -/- emashiirte kehakaalu muutused. IM – isolatsioonimajutus, SM – standardmajutus.

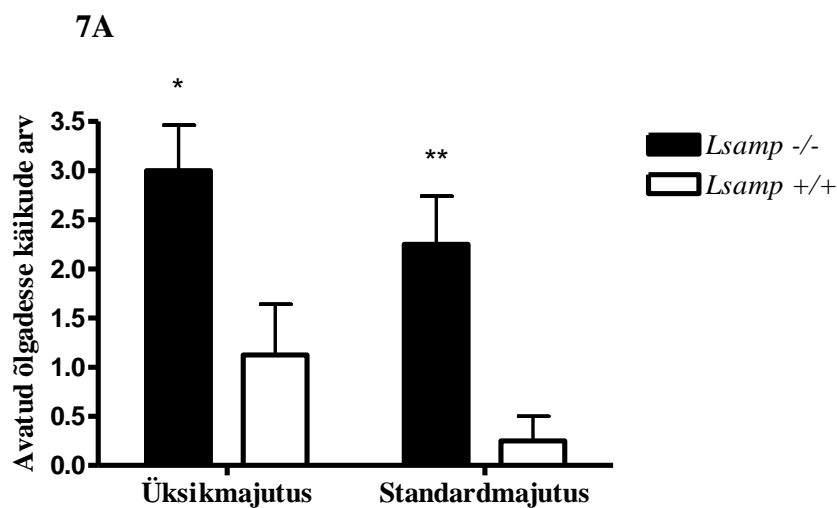
Lisa 2.

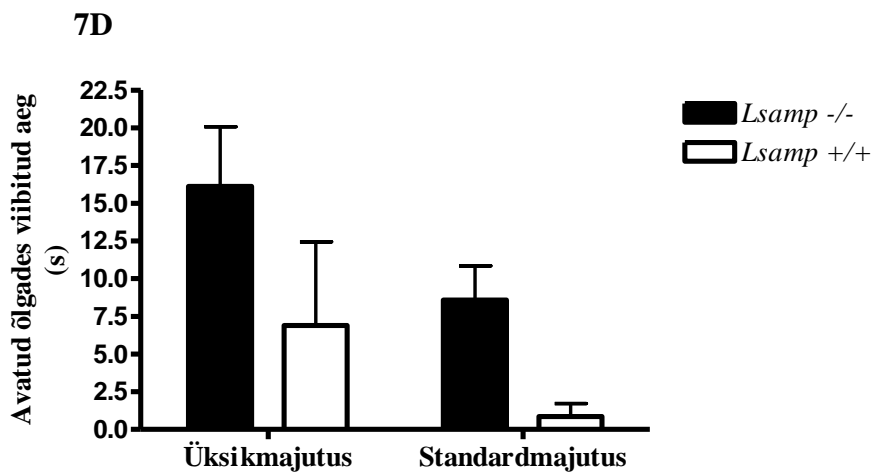
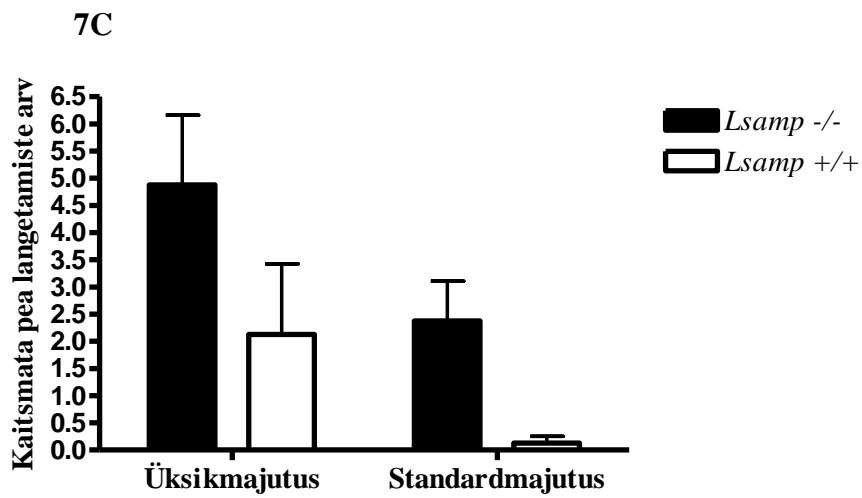
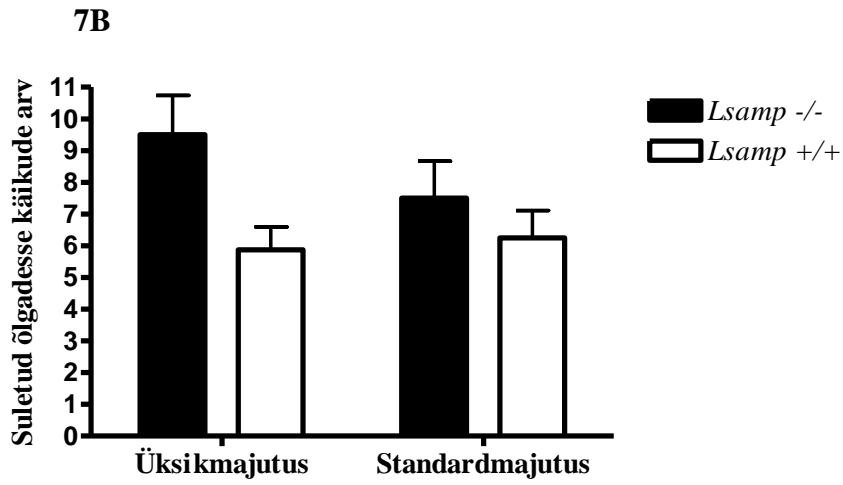
Tabel 1. Tõstetud pluss-puuri katse tulemused. Andmed on esitatud koos keskmise standardveaga (\pm SEM).

	Standartmajutus		Üksikmajutus		Kahefaktoriline ANOVA		
	Lsamp -/-	Lsamp +/+	Lsamp -/-	Lsamp +/+	g	k	g x k
Avatud õlgadesse sisenemiste arv	2,25 \pm 0,49	0,25 \pm 0,25	3,0 \pm 0,46	1,13 \pm 0,52	p<0,01	m.o.	m.o.
Suletud õlgadesse sisenemiste arv	7,5 \pm 1,16	6,25 \pm 0,86	9,5 \pm 1,23	5,87 \pm 0,72	p<0,05	m.o.	m.o.
Avatud õlgade ja kõigi õlgade küllastuste suh	0,22 \pm 0,04	0,02 \pm 0,02	0,25 \pm 0,05	0,15 \pm 0,07	p< 0,01	m.o.	m.o.
Kaitsmata pealangetamiste arv	2,37 \pm 0,73	0,13 \pm 0,13	4,87 \pm 1,28	2,13 \pm 1,3	p<0,05	m.o.	m.o.
Avatud õlgadel veedetud aeg (s)	8,58 \pm 2,26	0,86 \pm 0,86	16,12 \pm 3,95	27,31 \pm 20,9	m.o.	m.o.	m.o.

g – genotüübi mõju, k – keskkonna mõju, g x k – genotüübi ja keskkonna interaktsioon, m.o. – mitteoluline

Lisa 3.





Joonis 7. B Tõstetud pluss-puuri katse tulemused. A. Avatud õlgadesse käikude arvud. B. Suletud õlgadesse käikude arvud. C. Kaitsmata pealangetamiste arv. D. Avatud õlgades viibitud aeg. Andmed on esitatud koos keskmise standardveaga (\pm SEM).

* – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$

Lisa 4.

Tabel 2. Sotsiaalse interaktsiooni tulemused. Andmed on esitatud koos keskmise standardveaga (\pm SEM).

	Standartmajutus		Üksikmajutus		Kahefaktoriline ANOVA		
	Lsamp -/-	Lsamp +/+	Lsamp -/-	Lsamp +/+	g	k	g x k
Genitaalide nuusutamise aeg (s)	6,25 \pm 2,71	6,17 \pm 1,4	8,9 \pm 3,01	26,42 \pm 5,08	p<0,05	p<0,01	p<0,05
Muude kehaosade nuusutamise aeg (s)	12,01 \pm 3,77	10,04 \pm 1,59	14,70 \pm 2,8	31,42 \pm 6,44	m.o.	p<0,01	p<0,05

g – genotüübi mõju, k – keskkonna mõju, g x k – genotüübi ja keskkonna interaktsioon, m.o. – mitteoluline

Lisa 5.

Tabel 3. Isaste hiirtega sotsiaalse eelistuse katse tulemused. Andmed on esitatud koos keskmise standardveaga (\pm SEM).

	Standartmajutus		Ühefaktoriline ANOVA
	Lsamp -/-	Lsamp +/+	genotüübi mõju
Emaste juures viibitud aeg (s)	189,05 \pm 25,16	204,19 \pm 28,65	m.o.
Isaste juures viibitud aeg (s)	195,69 \pm 26,5	178,54 \pm 29,91	m.o.

m.o. – mitteoluline

Lisa 6.

Joonis 4. Tume – hele puuri katse tulemused. Andmed on esitatud koos keskmise standardveaga (\pm SEM).

	Standartmajutus		Üksikmajutus		Korduvmõõtmistega ANOVA						
	Lsamp -/-	Lsamp+/+	Lsamp -/-	Lsamp+/+	g	k	g * k	katse päev	katse päev * g	katse päev * h	katse päev * g * h
Katse №1. Käikude arv heledasse alasse	16,0 \pm 2,22	10,25 \pm 1,95	19,62 \pm 1,34	11,13 \pm 1,34	p<0,01	p<0,05	m.o.	p<0,01	p<0,01	m.o.	m.o.
Katse №2. Käikude arv heledasse alasse	5,88 \pm 1,16	2,38 \pm 0,75	10,13 \pm 2,29	6,13 \pm 1,36							
Katse №1. Heledas alas viibitud aeg (s)	148,57 \pm 22,47	169,81 \pm 37,87	231,70 \pm 22,97	162,80 \pm 14,31	p<0,05	p<0,05	m.o.	p<0,01	m.o.	m.o.	m.o.
Katse №2. Heledas alas viibitud aeg (s)	94,22 \pm 33,33	27,7 \pm 7,80	185,94 \pm 56,75	56,90 \pm 14,23							
Katse №1. Latents (s)	7,87 \pm 1,39	19,48 \pm 8,39	4,51 \pm 0,7	33,12 \pm 18,93	p<0,05	m.o.	m.o.	m.o.	m.o.	m.o.	m.o.
Katse №2. Latents (s)	3,16 \pm 0,53	96,36 \pm 72,54	6,7 \pm 2,5	52,58 \pm 30,49							

g – genotüübi mõju, k – keskkonna mõju, g * k – genotüübi ja keskkonna interaktsioon, m.o. – mitteoluline

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Julia Gretšanaja

(sünnikuupäev: 23.06.1990)

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

Lsamp geeni mõju hiirte sotsiaalse käitumisele

mille juhendajad on MSc Indrek Heinla, PhD Kersti Lilleväli ja MSc Riho Meier,

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 01.01.2020 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, 26.05.2015