

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

ARENGUBIOLOOGIA ÕPPETOOL

Anett Lillemaa

***IgLON* perekonna geenide ekspressiooni võrdlev analüüs
vastündinud ja täiskasvanud hiire ajus**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Juhendajad:

PhD Kersti Lilleväli

PhD Tambet Tõnissoo

TARTU 2017

Infoleht:

***IgLON* perekonna geenide ekspressiooni võrdlev analüüs vastsündinud ja täiskasvanud hiire ajus.**

IgLON perekonna liikmed on adhesioonimolekulid, mis peamiselt ekspresseeruvad kesknärvisüsteemis. Nad vahendavad rakkudevahelisi interaktsioone, soodustades või inhibeerides raku kasvu.

Käesoleva töö eesmärk on kirjeldada IgLON perekonna liikmete promootor-spetsiifilist ekspressiooni vastsündinud hiire ajus ja seda võrrelda ekspressiooniga täiskasvanud hiire ajus.

Märksõnad: adhesioonimolekulid, IgLON, *in situ* hübridisatsioon, neuroloogia

CERCS kood: B350 Arengubioloogia, loomade kasv, ontogenees ja embrüoloogia

Expression of IgLON family members in early postnatal mouse brain and comparison with the expression in adult mouse brain.

IgLON is a family of adhesion molecules, that are mainly expressed in the brain. They facilitate cellular interactions through inhibiting or promoting cell growth and development.

In this study the objective is to describe the promotor-specific expression of IgLON family in early postnatal mouse brain and compare that to the expression in adult mouse.

Keywords: adhesion molecules, IgLON, *in situ* hybridization, neurology

CERCS code: B350 Developmental biology, growth of animals, ontogenesis, embryology.

Sisukord

Infoleht:.....	2
Sisukord.....	3
Kasutatud lühendid:.....	4
Sissejuhatus	5
1. Kirjanduse ülevaade	6
1.1 Adhesioonimolekulid.....	6
1.2. IgLON perekond.....	7
1.2.1 Lsamp.....	8
1.2.2 Opcml.....	11
1.2.3. Neurotrimiin.....	11
1.2.4 Negr1.....	12
1.2.5 Iglon5.....	12
2.1 Töö eesmärk.....	13
2.2 Materjal ja meetodika	13
2.2.1 Katseloomad.....	13
2.2.2 Ajukoe töötlemine.....	13
2.2.3 Kasutatud plasmiidid.....	13
2.2.4 RNA in vitro transkriptsioon.....	14
2.2.5 In situ hübridisatsioon.....	14
2.2.6 Mikroskoopia ja pilditöötlus	15
2.3 Tulemused ja arutelu.....	16
2.3.1 Lsamp 1a ekspressioon P0 ja täiskasvanud hiire ajus.....	16
2.3.2 Ntm 1a ekspressioon P0 ja täiskasvanud hiire ajus.....	18
2.3.3 Ntm 1b ekspressioon P0 ja täiskasvanud hiire ajus	19
2.3.4 Opcml 1a ekspressioon P0 ja täiskasvanud hiire ajus.....	20
2.3.5 Opcml 1b ekspressioon P0 ja täiskasvanud hiire ajus.....	22
Kokkuvõte.....	25
Summary.....	26
Kasutatud kirjandus	27
Kasutatud internetiaadressid:.....	34
Tänuavaldused	35

Kasutatud lühendid:

CAM- adhesioonimolekul (*cell adhesion molecule*)

DIG – Digoksin

GPI– glükosüül-fosfatidüül-inositol (*Glycosylphosphatidylinositol*)

Ig– immuunoglobuliin (*immunoglobulin*)

IgCAM– immuunoglobuliin raku adhesiooni molekul (*immunoglobulin cell adhesion molecule*)

IgLON– immuunoglobuliin LON (*immunoglobulin LSAMP QPCML NTM*)

Igln5- IgLON perekonna viies liige

IgSF– immuunoglobuliini superperekond/ülemperekond (*immunoglobulin superfamily*)

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

NCAM- neuroni adhesioonimolekul (*neuronal cell adhesion molecule*)

Negr1- neuroni kasvu regulaator (*neuronal growth regulator 1*)

Ntm- neurotrimiin

Opcml– opioide siduv raku adhesiooni molekul (*opioid-binding cell molecule-like proteine*)

P0- postnataalne arengupäev

REM- kiirete silmaliigutustega unefaas (*rapid eye movement*)

RBD- REM une käitumishäire (*REM sleep behaviour disorder*)

Sissejuhatus

Raku adhesioonimolekulid on valgud, mis asuvad raku pinnal ja osalevad raku ühendamises teiste rakkudega (rakk-rakk interaktsioonid) või rakuvälise maatriksiga (rakk-maatriks interaktsioonid). Käesolev töö keskendub IgLON perekonna valkudele, mis kuuluvad immunoglobuliinide superperekonda. IgLON perekonnas on viis liiget: *Lsamp*, *Neurotrimin*, *Opcml*, *Negr1* ja *Iglon5*. Geenidel *Lsamp*, *Neurotrimin*, *Opcml* on kaks alternatiivset promootorit ning esimest eksonit. IgLON perekonna valkude iseloomulikeks tunnuseks on kolm Ig domeeni ja plasmamembraanile kinnitumine GPI ankru vahendusel. GPI ankur lisatakse valgu karboksüülterminaalsesse osasse peale translatsiooni. Lisaks saavad valgud raku pinnal moodustada dimeere ehk Digloneid.

IgLON perekonna valgud ekspresseeruvad imetajatel peamiselt ajukoos ja limbilises süsteemis ning aitavad kaasa ajurakkude arengule. Limbiline süsteem on aju osa, mida seostatakse motivatsiooni ja emotsioonidega. Mutatsioonid IgLON geenides võivad kaasa tuua häireid aju arengus, mis omakorda võivad põhjustada vaimseid häireid.

Käesolevas uurimistöös kirjeldatakse vastsündinud hiirte ajudes IgLON adhesioonimolekulide perekonna geenide promootor-spetsiifilist ekspressiooni ja võrreldakse saadud tulemusi täiskasvanud hiire ajuga. Varasemalt on *Ntm 1a*, *Ntm 1b*, *Opcml 1a* ja *Opcml 1b* ekspresseerumist täiskasvanud ajus uurinud Kadri Seppa. *Lsamp 1a* ekspresseerumist uurisid Philips jt. (2015).

Antud töö koostati Tartu Ülikooli Meditsiiniteaduste valdkonna Bio-ja siirdemeditsiini instituudi Füsioloogia osakonnas.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1 Adhesioonimolekulid

Hulkaksed organismid vajavad efektiivseid mehhanisme rakkude omavaheliseks informatsiooni jagamiseks. See saavutatakse nii parakriinsete faktorite, hormoonide kui ka otseselt rakkudevahelise interaktisiooniga (Katz jt. 1991). Raku adhesioonimolekulid (CAM-d) on rakumembraaniga seotud glükoproteiinid, mis on olulised rakkude omavahelises äratundmises, adhesioonis ja migratsioonis (Homrich jt. 2015). Adhesioonil võivad tekkida kas põgusad või püsivad ühendused, millest võivad tuleneda erinevad efektid.

Adhesioonimolekulid mängivad kriitilist rolli närvisüsteemi arengus ja selle normaalsel toimimisel (Edelman 1983). CAM-id osalevad neurulatsioonil ja neuraalharja rakkude kujunemisel, neuronite ja gliiarakkude migratsiooni juhtimisel, aksoni kasvu suunamisel, sünapside stabiliseerimisel ja plastilisuse säilitamisel ning lisaks ka neuronite taastumises pärast vigastust. Adhesioonimolekulid reguleerivad aksoni kasvu läbi aksoni kasvukoonuse suunamise (Goldberg 2013). Kasvukoonus reageerib erinevatele adhesioonimolekulidele ümbritsevas ekstratsellulaarses maatriksis, võtab korruga vastu erinevaid signaale, mis kas soodustavad või inhibeerivad aksoni kasvu (Goodman 1996).

Struktuursete homoloogiate alusel jaotatakse adhesioonimolekulid nelja superperekonda: immuunoglobuliinid (Ig, *immunoglobulin*), kadheriinid, selektiinid ja integriinid (Homrich jt. 2015). Käesolevas töös käsitletakse immuunoglobuliinide ülemperekonda (IgSF, *immunoglobulin superfamily*) kuuluvat valguperekonda IgLON. Antud perekond kuulub ka immuunoglobuliinsete raku adhesioonimolekulide (IgCAM, *immunoglobulin cell adhesion molecule*) perekonda (Petruzzelli jt. 1999).

Immuunoglobuliini superperekonna adhesioonimolekulide üheks oluliseks tunnuseks on Ig domeenid. Need on spetsiifilised piirkonnad, mis koosnevad β -kiududest, mis omakorda moodustavad β -lehti (Williams ja Barclay 1988). Ig domeene on kolme tüüpi ja neid eristatakse aminohappelise järjestuse ja β -lehtede arvu järgi (Colman ja Filbin 2006). IgLON perekonna valkudel on kolm Ig domeeni (Reed jt. 2004). Perekonnale omase voltimis-mustri tõttu stabiliseerivad Ig domeene nii sissepoole suunatud hüdrofoobsed aminohapped kui ka

lehtede-vahelised disulfiidsidemed, mis muudavad need proteasoomide suhtes vastupidavaks ning rakuvälises keskkonnas stabiilseks (Colman ja Filbin 2006).

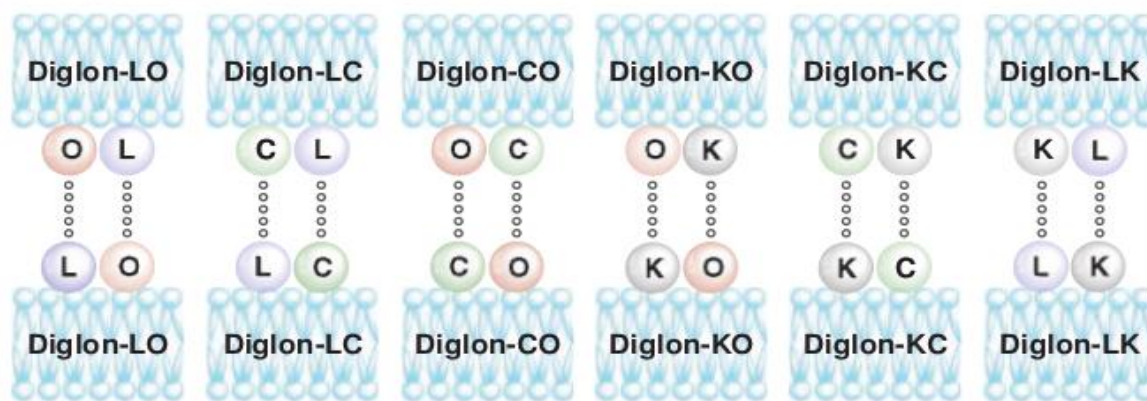
1.2. IgLON perekond

IgLON adhesioonimolekulide perekonda kuulub viis erinevat glükoproteiini:

1. limbilise süsteemiga seotud membraanivalk (*Lsamp*, *limbic-system-associated membrane protein*) (Levitt 1984);
2. opioide siduv raku adhesioonimolekul (*Opcml*, *opioid binding protein/cell adhesion molecule-like*) (Schofield jt. 1989);
3. neurotrimiin (*Ntm*, *neurotrimin*) (Struyk jt. 1995);
4. neuroni kasvu regulaator (*Negr1*, *neuronal growth regulator 1*) (Funatsu jt. 1999) ja
5. IgLON perekonna viies liige (*Iglon5*) (Sabater jt. 2014).

IgLON perekonna valgud kinnituvad plasmamembraanile GPI (glükosüülfosfatidüülinositol) ankrü vahendusel (McNamee jt. 2002). Perekonna adhesioonimolekulide üheks funktsiooniks on hipokampuse neuronite sünapside formeerumise regulatsioon (Hashimoto jt. 2009). Lisaks viitavad mitmed uuringud erinevate IgLON perekonna valkude rollile kasvajate allasurumises (Sellar jt. 2003; Ntougkos jt. 2005; Cui jt. 2008; Kresse jt. 2009). *Lsamp*, *Opcml* ja *Ntm* geenidel on kirjeldatud kaks alternatiivset promootorit (Levitt, 1984; Cui, 2008; Philips jt. 2015; Vanaveski jt. 2017) ning nii *Negr1-1* kui ka *Ntm-1* on näidatud lahustuvad isovormid (Gil jt. 1998; Marg jt. 1999). See viitab, et IgLON perekonna liikmed võivad lisaks adhesioonile omada veel muid funktsioone.

IgLON perekonna adhesioonimolekulid interakteeruvad perekonna siseselt homo- kui ka heterofiilselt (Akeel jt. 2010) ja on võimelised moodustama membraani pinnal dimeere ehk Digloneid (Reed jt. 2004). Varasemad uuringud viitavad, et IgLON valgud on homofiilsed adhesioonimolekulid (Gil jt. 1998). Nüüdseks on näidatud, et kõik IgLON-id interakteeruvad heterofiilselt perekonna sees ja on võimelised moodustama 6 erinevat Diglonit (Joonis 1.). Homodimeeride tekkimine on võimalik aga eelistatult tekivad heterodimeerid, kuna homofiilsed ühendused on nõrgemad kui heterofiilsed (Reed jt. 2004).



Joonis 1. Võimalikud Diglonid. Neljast IgLON-ist saab moodustuda 6 heterofiilset Diglonit: Diglon-LO (Lsamp ja Opcml), Diglon-LC (Lsamp ja CEPU-1(Ntm-i ortoloog)), Diglon-CO (CEPU-1 ja Opcml), Diglon-KO (Kilon(Negr1 ortoloog) ja Opcml), Diglon-KC (Kilon ja CEPU-1) ja Diglon LK (Lsamp ja Kilon) (Modifitseeritud Reed jt, 2004 järgi)

Maatriksi metalloproteasaasid on tsiingi endopeptidaasid, mis lõhuvad rakuvälises maatriksis ja rakkude pinnal erinevaid molekule. See toob kaasa molekulide komponentide degradatsiooni või siis bioloogiliselt aktiivsete fragmentide vabanemise maatriksisse. Sanz jt. (2015) avastasid, et IgLON-id on metalloproteinaasidele substraadiks. IgLON perekonna valgud sekreteeritakse küpsetelt ajukoore neuronitelt metalloproteinaasidest sõltuva proteolüüsiga. Valkude vabanemine neuronite pinnalt soodustab närvijätkete väljakasvu, kuna sellega kaovad eelnevalt adhesioonil tekkinud ja kasvu inhibeerinud signaalid. (Sanz jt. 2015)

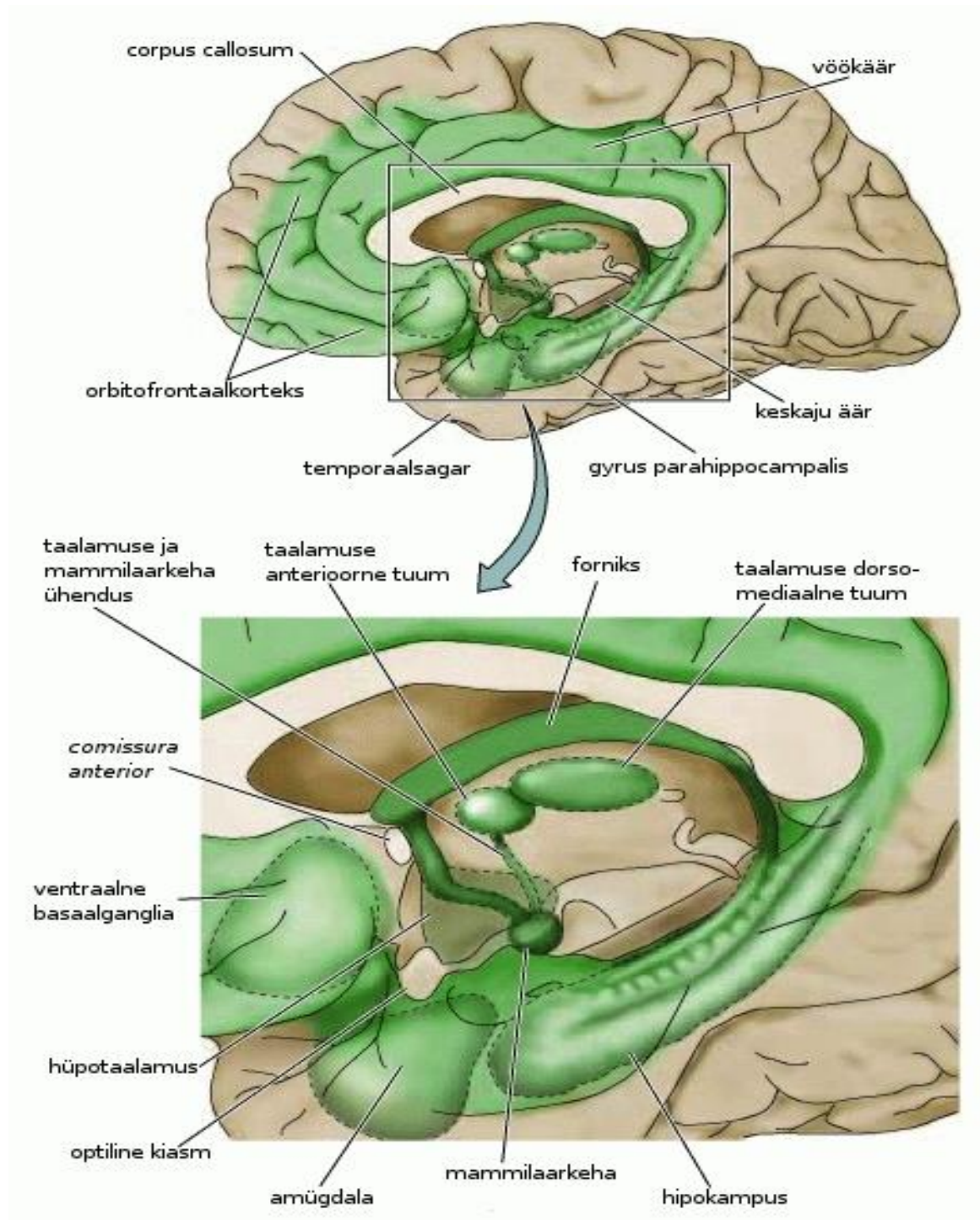
1.2.1 Lsamp

Esimesena avastati limbilise süsteemiga seostatud membraanvalk LSAMP. LSAMP-i molekulmass on 64- 68 kDa ja koosneb 338-st aminohappest. Valk on ekspresseeritud nii neuroni keha kui ka dendriitide pinnal (Levitt 1984) ning sel on näidatud kolme isovormi olemasolu (Pimenta ja Levitt 2004). LSAMP võib aksonite väljakasvu nii stimuleerida kui ka inhibeerida (Pimenta jt. 1995). LSAMP'i kodeeriva geeni kogupikkus on 2,28 Mbp, mille kodeeriv osa koosneb 11 eksonist, mis moodustab 99,65% kogu geeni pikkusest. Geen omab kahte alternatiivset promootorit – 1a ja 1b (Pimenta ja Levitt 2004). 1a promootor on aktiivsem limbilise süsteemi struktuurides, 1b seevastu on rohkem aktiivne sensoorsetes ja mootorsetes piirkondades (Philips jt. 2015).

Sünapside omadust aja jooksul muuta oma signaalide tugevust, vastavalt aktiivsuse

muutumisele, nimetatakse sünaptiliseks plastilisuseks. *Lsamp* suurendab sünaptoogeneesi hipokampuse neuronitel, omades rolli ka plastilisuses. Heinla jt. (2015) avastasid, et *Lsampi* puudumisel vähenes täiskasvanud hiire hipokampuse plastilisus.

Limbiline süsteem (Joonis 2) on aju piirkond mille suuresti moodustavad ajukoor ja selle all olevad struktuurid. Tähtsamad nendest on amügdala, hipokampus, hüpotaalamus, taalamus, fornix, vöökäär ning haistekoor. Limbiline süsteem on seotud peamiselt motivatsiooni ja emotsioonidega (Mogenson jt. 1980) ning otsuste tegemise ja käitumise regulatsiooniga, aga osaleb veel ka siseelundite talituse regulatsioonis (Gavrilov ja Tatarinov 1985). *Lsamp* on üks geenidest, mis avaldub tugevalt limbilises süsteemis (Philips jt. 2015) ja reguleerib neuronite arengut (Pimenta jt. 1995). Sellest saab järeldada, et kui struktuurides, mis reguleerivad käitumist ja emotsioone, tekivad vigase *Lsamp* geeni poolt põhjustatud anomaaliad, siis selle tagajärjel võib välja kujuneda vaimne haigus, näiteks depressioon. Strakowski jt. (2002) poolt teostatud limbilise süsteemi uuringud toetavad seda järeldust.



Joonis 2. Inimese limbiline süsteem. Rohelisega on välja toodud limbilise süsteemi põhistruktuurid (modifitseeritud Purves jt, 2001 järgi).

Hiirtel on näidatud, et LSAMP valgu puudumisel on hiire kohanemine uue keskkonnaga raskendatud ja loom on vähem tundlik isolatsioonist tingitud stressile (Innos jt. 2012). Inimesel seostatakse *Lsomp* geeni polümorfisme paanikahäire, suitsiidse käitumise ja skisofreeniaga (Must jt, 2008; Koido jt, 2012, Koido jt, 2014).

1.2.2 Opcml

OPCML-i (opioide siduv raku adhesiooni molekul) molekulmass on 58 kDa ja valgus on 345 aminohapet (Sugimoto jt, 2012). Vastava geeni kodeeriv ala koosneb seitsmest eksonist ja sellel on 2 alternatiivset promootorit – 1a ja 1b. Cui jt. (2008) avastasid, et *Opcml 1a* on laialt ekspresseerunud peaaegu kõikides täiskasvanud ja loote kudedes, olles kõrgelt ekspresseerunud näiteks ajus, neerus ja suguorganites. *Opcml 1b* ekspressioon toimub kõikides loote kudedes peale platsenta. Täiskasvanud kudedes ekspressioon puudub või on väga nõrk (Cui jt. 2008). OPCML on seotud neuronaaalse plastilisusega, osaledes rakk-rakk ja rakk-maatriks interaktsioonides ning seeläbi neuronaaalsete juhteteede kujunemisel ja remodelleerimisel (Sugimoto jt, 2010).

OPCML osaleb lisaks neuronite arengule ka gliiarakkude arengus. Valgul on oluline roll astrotsüütide morfoloogia ja arengu kontrollimises. Valk on lokaliseerunud tüüp 1 ja tüüp 2 astrotsüütide peritsellulaarsetesse regioonidesse. *Opcml 1b* ekspresseerub peamiselt tüüp 1 astrotsüüdi kasvufaasis. (Sugimoto jt. 2010)

OPCML-l on näidatud ka kasvajaid allasuruvaid omadusi munasarja epiteeli rakkudes (Sellar jt, 2003). Hiljem näidati tuumorsupressori omadust ka näiteks kopsu- ja rinnavähil (Cui jt, 2008). Geeni *missense* mutatsioone on identifitseeritud paljudest vähirakkude liinidest, sealhulgas põie- ja verevähi liinidest (Sellar jt, 2003).

1.2.3. Neurotrimiin

Neurotrimiin ehk Ntm on neuroni raku pinna glükoproteiin molekulmassiga 51 kDa (Spaltmann ja Brummendorf 1996), mis osaleb homofiilsete mehhanismide kaudu neuriitide adhesioonil ja neuriitide väljakasvul (Sellar jt, 2003). Täpsemalt stimuleerib Ntm seljajuure ganglionis aksonite väljakasvu ning inhibeerib sama funktsiooni sümpaatilistes neuronites (Gil jt. 1998). Ntm on ekspresseerunud ka emaka silelihaskoes, kus ta on reguleeritud östrogeeni kaudu (Krizsan-Agbas jt. 2008). Ka Ntm-il on näidatud kasvajate allasurumises, kuigi vastupidiselt teistele liikmetele on *Ntm* ekspressioon kasvaja koes tõusnud (Ntougkos jt. 2005). *Ntm* omab 2 alternatiivset promootorit – 1a ja 1b.

1.2.4 Negr1

NEGR1 (neuraalne kasvu regulaator 1) valgu molekulmass on 46 kDa. Peamiselt on NEGR1 neuroni soma ja dendriitide pinnal (Funatsu jt, 1999). Valk reguleerib neuriitide väljakasvu otsaju neuronites (Marg jt. 1999) ja hipokampuse astrotsüütides (Schäfer jt. 2005). NEGR1 osaleb veel ka kehamassi regulatsioonis (Thorleifsson jt, 2009). Seda on näidatud nii täiskasvanudte (Willer jt. 2009) kui ka laste puhul (Zhao jt. 2009). Lisaks on näidatud NEGR1 rolli kasvajate allasurumises kesknärvisüsteemis (Takita jt, 2011) ja ka väljaspool neuraalkude (Kim jt, 2014).

1.2.5 Iglon5

IgLON perekonna viies liige on hiljuti avastatud *Iglon5* (Sabater jt, 2014) ning on näidatud, et *Iglon5* on ajus madalamalt ekspresseerunud kui teised IgLON-id (Vanaveski jt. 2017). IGLON5-e vastaseid antikehasid seostatakse erinevate unehäiretega, näiteks parasomnia (Brüggemann jt. 2016) ja uneapnoe (Leypoldt jt. 2015). Parasomnia alla kuuluvad magamishäired, kus patsient kogeb ebatavalist liikumist, käitumist või häirivaid unenägusid. Kõige tavalisem on REM (*rapid-eye-movement*) unehäire, mis võib kaasa tuua sünnukleinoopaatia (ebaloomulike alfa-sünnukleini agregaatide kuhjumist närvi- ja gliiarakkudesse) (Rye 2014).

2. Eksperimentaalosa

2.1 Töö eesmärk

Kirjeldada IgLON perekonna geenide (*Ntm*, *Opcml*, *Lsamp 1a*) promootor-spetsiifilist ekspressiooni vastsündinud hiire aju (P0) ja võrrelda neid tulemusi varasemalt kirjeldatud IgLON geenide ekspressiooniga täiskasvanud hiire aju.

2.2 Materjal ja meetodika

2.2.1 Katseloomad

Katseloomadena kasutati Sv129 ja C57BL/6J(C57) liinide ristamisel saadud segataustaga emaseid ja isaseid vastsündinud (P0) hiiri. Loomi hoiti standartsetes laboritingimustes 12 tunnise valguse/pimeduse tsükliga ning vabalt kättesaadava toidu ja joogiga.

2.2.2 Ajukoe töötlemine

Vastsündinud loomad ohverdati ja eemaldati peaaugud vastavat ekprtiisi ja luba (FELASA) omava isiku poolt. Ajud fikseeriti 4°C juures 4% PFA/PBS-s (paraformaldehüüd fosfaatpuhverdatud soolalahuses) ning krüoprotekteeriti 4% PFA/20% sahharoosi lahuses 4°C juures üleöö. Seejärel aju külmutati -80°C juures. Ajud lõigati krüomikrotoomiga (Microm Hm-560) 40 µm paksusteks koronaallõikudeks. Lõigud permeabiliseeriti 0.25% TritonX-100/PBS-s 30 minuti jooksul. Seejärel loksutati 5 minutit 5x SSC-s (pH 5) ja kanti prehübridisatsioonilahusesse (formamiid 50%, 5xSSC, pH 5). Edasi säilitati koeproove -20°C juures.

2.2.3 Kasutatud plasmiidid

RNA *in situ* hübridisatsiooni proovide tegemiseks kasutati pBS(KS+) plasmide, mille NotI ja Sall saitidese oli sisestatud 400-500 bp *Neuritrimiini*, *Opcml* ja *Lsampi* promootori

spetsiifilised amplikonid eelnevalt mainitud metsiktüüpi hiirte liinidelt.

2.2.4 RNA *in vitro* transkriptsioon

Ntm, *Lsamp* ja *Opcml* antisense RNA DIG-proovide süntees viidi läbi kogumahus 20 µl. *In vitro* transkriptsioon viidi läbi, kasutades 1 µg/ml DIG märgistatud nukleotiidide segu (Roche), transkriptsioonipuhvrit lõppkontsentratsiooniga 1x (Roche), 20U RNAasi inhibiitorit (Roche), 20U RNA polümeraasi T3 ja 1 µg lineariseeritud plasmidi. Transkriptsioon toimus 2 h jooksul 37°C juures ning selle õnnestumist kontrolliti 1% agarosgeeli geelelektrofooresil. Plasmidsest DNA-st vabanemiseks lisati lahusesse RNAasi vaba DNAas I (1 U/µl; Thermo Scientific) ning inkubeeriti 15 minuti jooksul 37°C juures. RNA sadestati üleöö -20°C juures LiCl ja etanooli lahusega. Sadenenud RNA tsentrifuugiti 10 minuti jooksul põhja 4 °C juures, võimsusel 13 000p/min (Eppendorf Centrifuge 5810 R). Seejärel pesti 70% etanooli lahusega. Sadestatud RNA lahustati 80 µl 50% formamiidi lahuses (kontsentratsioonid jäid vahemikku 125-276 ng/ µl). Proovid säilitati -20°C juures.

2.2.5 *In situ* hübridisatsioon

Lõike inkubeeriti prehübridisatsiooni lahuses (formamiid 50%, 5xSSC pH 5, 2% BR (Blocking Reagent; Roche)) 65°C juures 1.5 tunni jooksul.

Hübridiseerimiseks kuumutati RNA proove 5 minutit 85°C juures ja jahutati koheselt jääl, et lagundada sekundaarstruktuurid. Lõike inkubeeriti üleöö RNA prooviga segatud prehübridisatsioonilahuses (RNA 1µg/ml).

Hübridisatsioonilahuse eemaldamiseks pesti lõike 50% formamiidi, 5xSSC pH5 ja 1% SDS-i sisaldavas lahuses 30 minutit 65°C juures. Seejärel pesti lõike lahusega, mis sisaldas 50% formamiidi ja 2xSSC pH5, 30 minutit 60°C juures. Edasi pesti lõike TBST (25 mM Tris-HCl pH 7,5; 140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 0,1% Tween20) lahuses 3x 5 minutit ning inkubeeriti tund aega 2% *blocking reagent* (Roche)/TBST lahuses. Seejärel inkubeeriti lõike 4°C juures üleöö aluselise fosfataasiga (AP) konjugeeritud digoksygeniini vastase antikehaga (Anti-Dig Fab Fragments, Roche) (1:2000, lahustatuna 1% BR/TBST lahuses).

Järgneval päeval pesti lõike 3x 10 minutit TBST lahuses, seejärel 2x 10 minutit NTMT (100

mM Tris-HCl pH 9,5; 100 mM NaCl; 50 mM MgCl₂; 0,1% Tween20) lahuses. Lõikudele lisati värvumisreaktsiooni esilekutsumiseks aluselise fosfataasi substraati (BM Purple AP Substrate Roche 11442074001). Plaat kaeti fooliumiga, et kaitsta proove valguse eest. Värvumisreaktsioonil lasti toimuda kuni oli saavutatud piisav intensiivsus. Värvumisreaktsiooni lõpetamiseks pesti lõike PBS-s.

2.2.6 Mikroskoopia ja pilditöötlus

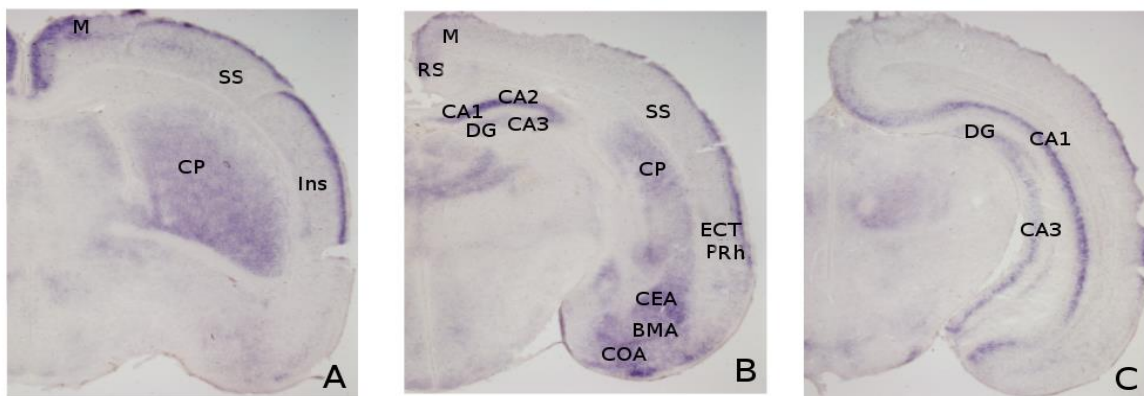
Preparaatide tegemiseks pesti lõike destilleeritud vees, viidi üle 0.5% želatiini ja sealt alusklaasile. Lõikudel lasti kuivada ja sulundati Pertexiga. Koelõike analüüsiti ja pildistati Olympus DP71 kaameraga ühendatud Olympus BX51 mikroskoobiga. Pildipaneelide valmistamiseks kasutati Adobe Photoshop arvutiprogrammi .

2.3 Tulemused ja arutelu

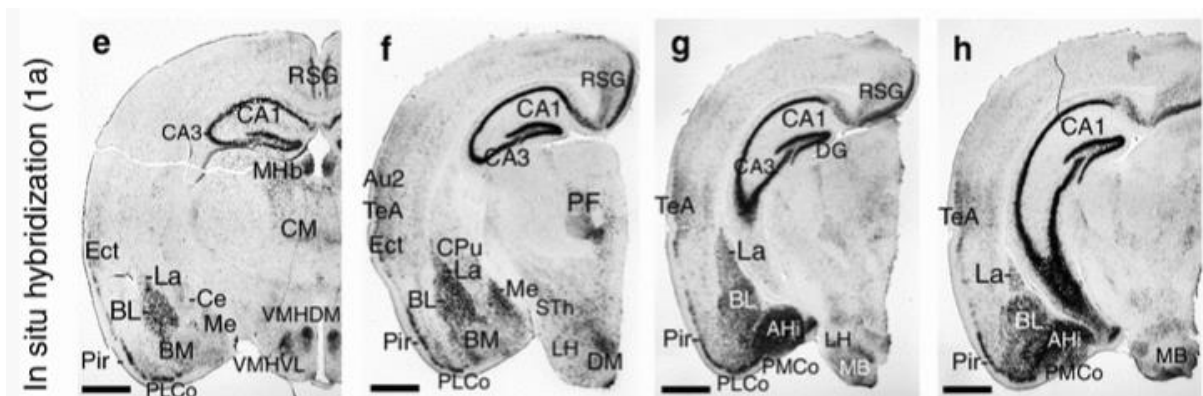
Käesolevas töös tuvastati IgLON perekonna geenide (*Ntm*, *Opcml*, *Lsamp*) ekspressioon RNA *in situ* hübridisatsiooniga P0 hiirte ajude koronaallõikudel ja võrreldi neid ekspressioonidega täiskasvanud ajus, mida on varasemalt enda bakalaureuse töös kirjeldanud Kadri Seppa (avaldamata andmed) ning *Lsamp-i* ekspresseerumist kirjeldasid Philips jt. (2015). Kõigil uuritud geenidel on 2 alternatiivset promootorit, käesolevas töös aga *Lsamp 1b* ekspressiooni ei uuritud, kuna seda ei ole võimalik uurida *in situ* hübridisatsiooniga.

2.3.1 *Lsamp 1a* ekspressioon P0 ja täiskasvanud hiire ajus

In situ hübridisatsiooni tulemusena leiti, et vastsündinud (P0) hiirel on *Lsamp 1a* ekspresseerunud peamiselt ajukoores, amügdalas ja Ammoni sarves (Joonis 3). Täiskasvanud hiire ajus on *Lsamp 1a* ekspresseerunud üldjoontes samades struktuurides (Philips jt 2015). P0 hiirel on *Lsamp 1a* kõrgemalt avaldunud motoorse ja sensoorse ajukoore välimises kihis (Joonis 3A). Täiskasvanud hiirel on *Lsamp 1a* ekspressioon tuvastatav mitmetes käitumuslikult tähtsates ajukoore osades nagu ajalise taju, auditoorses ja piriformaalses piirkonnas (Joonis 4e-h). Limbilisse süsteemi kuuluvas hipokampuse Ammoni sarves (CA) on *Lsamp 1a* avaldunud nii P0 kui ka täiskasvanud hiirel. Samas on täheldatav *Lsamp 1a* kõrgem ekspressioon Ammoni sarve CA1 ja CA2 piirkonnas võrrelduna CA3 ja hammaskääruga (Joonis 3B), erinevalt täiskasvanud loomade hippokampusest, kus sellist piirkonnast sõltuvat erinevust märgata ei ole (Joonis 4). Tähelepanuväärne on see, et uuritud geenidest (*Ntm*, *Opcml*, *Lsamp*) avaldus ainult *Lsamp 1a* P0 hiire hammaskäärus (täiskasvanud hiirel ekspresseerusid kõik uuritavad geenid). Lisaks on *Lsamp 1a* detekteeritav P0 hiire dorsaalses juttkehas (Joonis 3A), aga täiskasvanud ajus praktiliselt mitte (Joonis 4f). Samuti limbilisse süsteemi kuuluvas amügdalas e mandeltuumas on *Lsamp1a* tuvastatav mõlemas uuritud vanuses (Joonis 3B, Joonis 4).



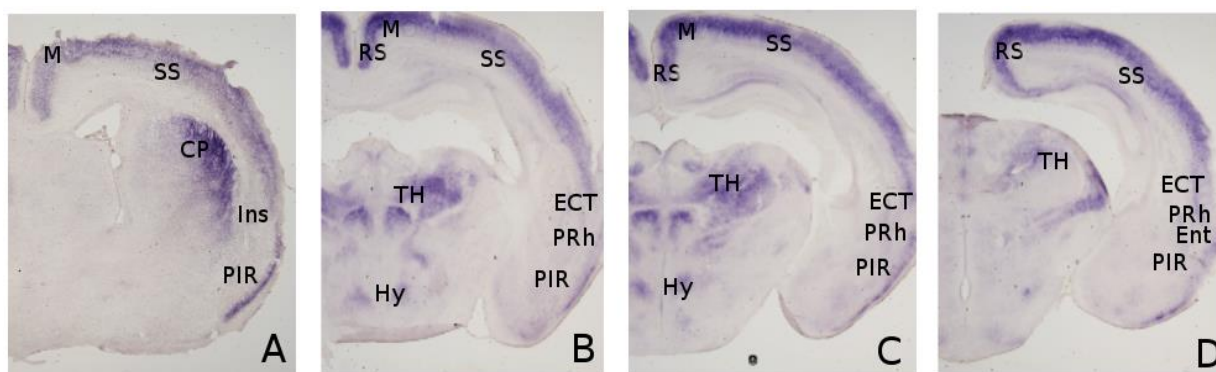
Joonis 3. *Lsamp 1a* ekspressioon vastsündinud hiire aju koronaallõikudel. Seeria ajaläbilõikeid A-C suunal anteroorne-posterioorne. Lühendid: Lühendid: BMA- basomediaalne amügdala tuum, CA1/2/3-hipokampuse *cornu ammonis* piirkonnad 1, 2 ja 3, CEA-tsentraalne amügdala tuum, COA-ajukoore amügdala tuum, CP-juttkeha (*caudoputamen*), DG-hammaskäär, ECT-*ectorhinal* piirkond, Ins- insulaarne piirkond, M-motoorne piirkond, PRh-*perirhinal* piirkond, RS-retrospleniaalne piirkond, SS-sensoorne piirkond.



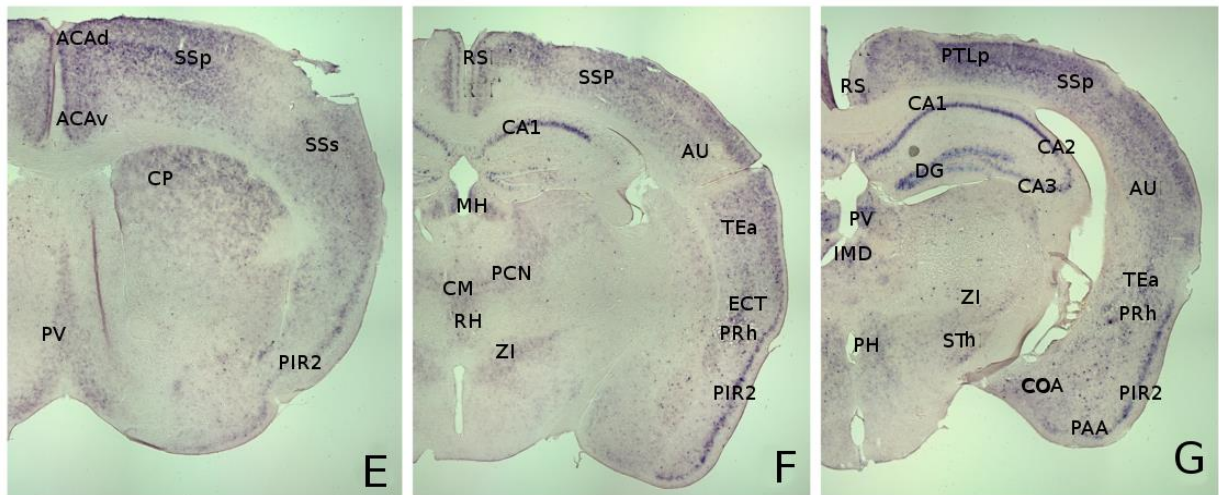
Joonis 4. *Lsamp 1a* ekspressioon täiskasvanud hiire aju koronaallõikudel (Philips jt. 2015). Seeria ajaläbilõikeid e-h suunal anteroorne-posterioorne. Lühendid: Ahi-amügdalohipokampuse piirkond, Arc-kaarjas hüpotalamuse tuum, Au2-sekundaarne auditoorne ajukoor, BL/BM-basolateraalne/basomediaalne amügdala tuum, CA1/CA3-Ammoni sarve (*cornu ammonis*) piirkonnad 1 ja 3, Ce-amügdala tsentraalne tuum, CM-talamuse tsentraalne mediaalne tuum, Cpu-juttkeha. DG-*dentate gyrus*, DM-dorsomediaalne hüpotalamuse tuum, Ect-*ectorhinal* ajukoor, La-lateraalne amügdala tuum, Mhb-mediaalne habenula, LH-Lateraalne hüpotalamuse piirkond, MB-mammillaarkeha, Me-kediaalne amügdala tuum, Pir-piriformaalne ajukoor, PF-parafastsikulaarne taalamuse tuum, PLCo/PMCo-posterolateraalne/posteromediaalne amügdala ajukoore tuum, RSG-retrospleniaalne ajukoor, Sth-subtaalamuse tuum, TeA-ajalise taju ajukoor, VMHDM/VMHVL-ventromediaalne taalamuse tuum, dorsomediaalne osa/ventrolateraalne osa. Mõõtkava on 1 mm.

2.3.2 *Ntm 1a* ekspressioon P0 ja täiskasvanud hiire ajus

In situ hübridisatsiooni tulemused näitasid, et *Ntm 1a* on ekspresseerunud nii vastsündinud kui ka täiskasvanud hiirel peamiselt ajukoores. Detailsem analüüs näitas, et *Ntm 1a* on P0 hiire ajus kõrgelt ekspresseerunud ajukoore esimestes kihtides, täiskasvanud seevastu on signaal vaadeldav üle terve ajukoore. Motoorses ja sensoorses ajukoores on geen sarnaselt ekspresseerunud mõlemas uuritud vanuses (Joonis 5, Joonis 6). Lisaks on *Ntm1* detekteeritav ka juttkehas (Joonis 5A). Vaheajusse kuuluvates hüpotaalamuses ja taalamuses on *Ntm 1a* signaal P0 ajus selgelt näha mitmetes tuumades (Joonis 5B-D). Täiskasvanud hiire ajus on esile tulnud ainult üksikud tuumad, näiteks intermediidorsaalne taalamuse tuum ja posterioorne hüpotalamuse tuum (Joonis 6G). *Ntm 1a* proovi P0 aju puhul on märkimisväärne, et see on ainuke juhused, kui mandelkehas geen ei ekspresseeru.



Joonis 5. *Ntm 1a* ekspressioon vastsündinud hiire aju koronaallõikudel. Seeria ajaläbilõikeid A-D suunal anteriorne-posterioorne. Lühendid: CP-juttkeha (*caudoputamen*), ECT-*entorhinal* piirkond, Ent-entorhinal ajukoor, Hy-hüpotaalamus, Ins-insulaarne piirkond, M-somatomotoorne ajukoor, PRh-*perirhinal* ajukoor, PIR-piriformaalne ajukoor, RS-retrospleniaalne ajukoor, SS- sensoorne ajukoor, TH-taalamus.

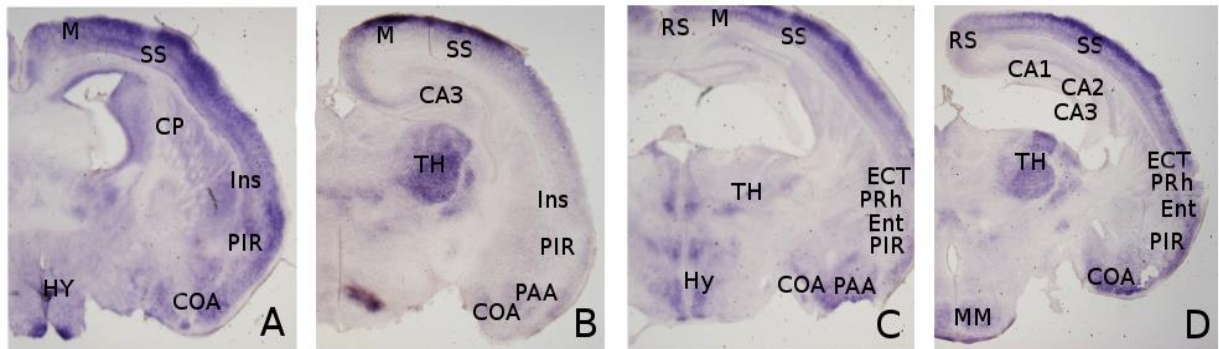


Joonis 6. *Ntm1a* ekspressioon täiskasvanud hiire aju koronaallõikudel (Kadri Seppa avaldamata tulemused). Seeria ajalõikudeid E-G suunal anteroorne-posteroorne. Lühendid: ACA-anteroorne tsingulumi ajukoor, Au- auditoorne ajukoor, CA1/2/3-cornu ammonis-e piirkonnad 1, 2 ja 3, CM-tsentraalne mediaalne nägemisköbrukese tuum, COA-amügdala piirkond ajukoos, CP-juttkeha (*caudoputamen*), DG-hammaskäär, ECT-ectorhinal ajukoor, IMD-intermediodorsaalne taalamuse tuum, MH-mediaalne habenula, PAA-piriformaalne-amügdala tuum, PCN-paratsentraalne tuum, PRh-perirhinal ajukoor, PH-posteroorne hüpotalamuse tuum, PIR2-piriformaalse piirkonna 2. kiht, PV-periventrikulaarne hüpotalamuse tuum, PV-paraventrikulaarne taalamuse tuum, RH-romboidne tuum, RS-retrospleniaalne ajukoor, SSp-primaarne sensoorne ajukoor, Sss-supplementaalne sensoorne ajukoor, STN-STh-subtalamuse tuum, ZI-zona incerta, TEa-ajalise taju ajukoor.

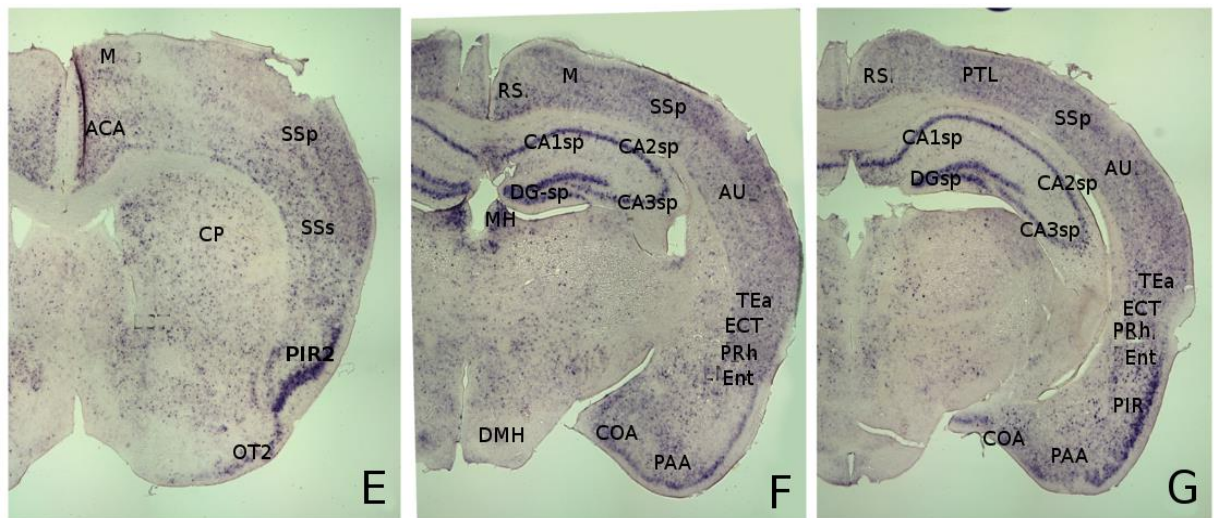
2.3.3 *Ntm 1b* ekspressioon P0 ja täiskasvanud hiire ajus

Sarnaselt eelnevatele tulemustele on ka *Ntm 1b* ekspresseerunud põhiliselt ajukoos. Vastsündinud (P0) hiire ajukoos (Joonis 7, Joonis 8) on *Ntm 1b* tugevalt avaldunud, samas kui täiskasvanud ajus on ajukoos vaadeldav ainult nõrk signaal. Ka hüpotaalamuse (Joonis 7C) ning taalamuse tuumad (Joonis 7B-D) on tugevalt esile tulnud ainult vastsündinud hiire ajus. Basaalganglionidest koosnevas juttkehas on *Ntm 1b* ekspresseerunud nii täiskasvanud kui ka vastsündinud hiire ajus (Joonis 7A, Joonis 8E). Sama saab jälgida ka mandelkeha tuumades (Joonis 7A-D, Joonis 8F-G). Täiskasvanud hiire ajus on *Ntm 1b* kõige tugevamini ekspresseerunud piriformi püramidaalses kihis (Joonis 8E,G), aga vastsündinud hiire ajus ei ole see avaldunud. Ka hipokampuse alla käiva Ammoni sarve CA1, 2 ja 3 piirkondade püramidaalses kihis ja hammaskääru granulrakkude kihis on näha *Ntm 1b* tugevat ekspressiooni ainult täiskasvanus (Joonis 8F,G) ja vastsündinus on jälgitav ainult nõrk

signaal.



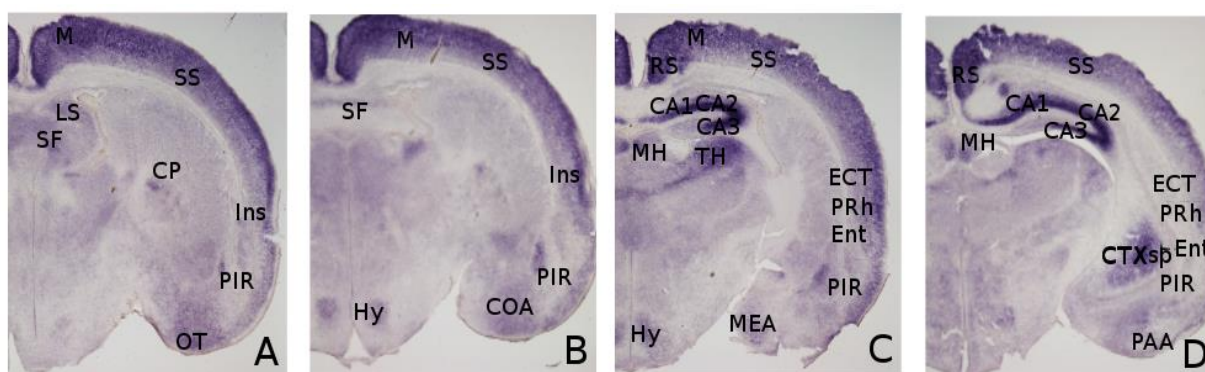
Joonis 7. *Ntm 1b* ekspressioon vastsündinud hiire aju koronaallõikudel. Seeria ajaläbilõikeid A-D suunal anterioorne-posterioorne. Lühendid: CA1/2/3sp-Ammoni sarves piirkonna 1, 2 ja 3 püramidaalne piirkond, COA-ajukoore amügdala tuum, CP-juttkeha (caudoputamen), ECT-ectorhinal ajukoor, Ent-entorhinal ajukoor, HY-hüpotalamus, Ins-insulaarne ajukoor, MM-mediaalne mammillaarne tuum, M-somatomotoorne ajukoor, PAA-piriformaalne-amügdala tuum, PRh-perirhinal ajukoor, PIR-piriformaalne ajukoor, RS-retrospleniaalne ajukoor, SS-sensoorne ajukoor, TH-talamus.



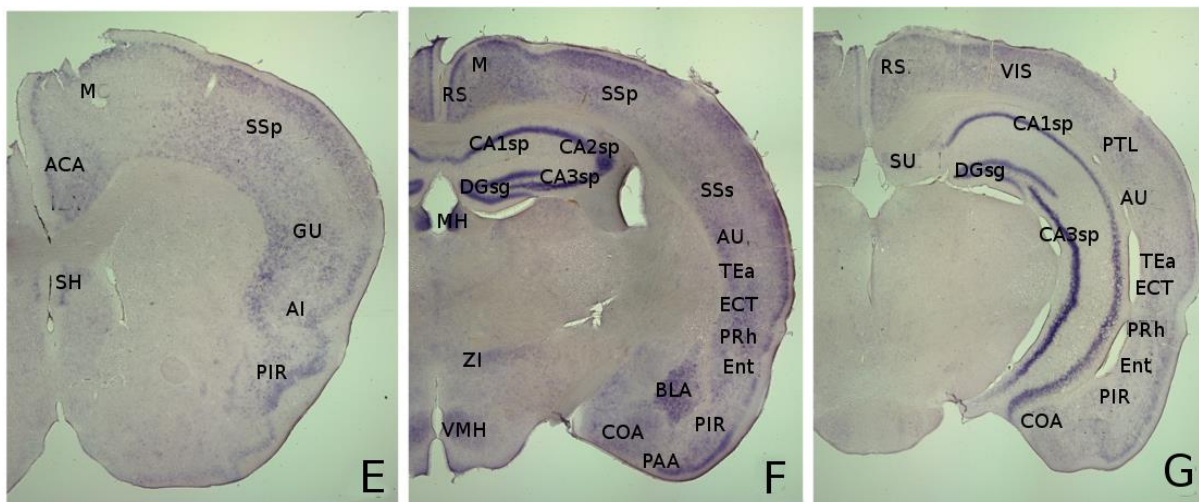
Joonis 8. *Ntm1b* ekspressioon täiskasvanud hiire aju koronaallõikudel (Kadri Seppa avaldamata tulemused). Seeria ajaläbilõikeid E-G suunal anterioorne-posterioorne. Lühendid: ACA- anterioorne tsingulumi ajukoor, Au- auditoorne ajukoor, CA1/2/3sp-cornu ammonis-s piirkonna 1, 2 ja 3 püramidaalne piirkond, COA-amügdala piirkond ajukoores, CP- juttkeha (*caudoputamen*), DG-sp – hammaskääru granulaarsete rakkude kiht, DMH-dorsomediaalne hüpotalamuse nukleus, ECT- ectorhinal ajukoor, Ent-entorhinal ajukoor, MH-mediaalne habenula, M- motoorne ajukoor, OT2-haistmisköbrukese 2. kiht, PAA-piriformaalne-amügdala tuum, PRh-perirhinal ajukoor, PIR-piriformaalne ajukoor, PTL-posterioorne parietaalne ajukoor, RS-retrospleniaalne ajukoor, SSp-primaarne sensoorne ajukoor, SSs-supplementaalne sensoorne ajukoor, TEa-ajalise taju ajukoor.

2.3.4 *Opcml 1a* ekspressioon P0 ja täiskasvanud hiire aju

Opcml 1a ekspresseerub nii täiskasvanud kui ka vastsündinud hiire aju peamiselt ajukoos. Vastsündinud hiire aju on geen avaldunud tugevamalt retrospleniaalses ja insulaarses ajukoos. Motoorses ja sensoorses ajukoore piirkonnas (Joonis 9, Joonis 10) on signaal vaadeldav mõlemas vanuses hiire ajudes. Sama saab väita ka Ammoni sarve CA 1, 2 ja 3 piirkonna (Joonis 9C,D) kohta. Koos hammaskääruga on need täiskasvanud aju ainukesed piirkonnad, kus *Opcml 1a* tugevalt ekspresseerunud. Lisaks sellele on mõlemas vanuses signaal jälgitav ka *medial habenula*-s (Joonis 9C, Joonis 10F). Juttkehas seevastu on *Opcml 1a* ekspresseerunud ainult P0 aju (Joonis 9A) ja sealgi on signaal nõrk. Amügdalas jällegi on *Opcml 1a* ekspresseerunud nii täiskasvanud kui ka vastsündinud hiire aju (Joonis 9B-D, Joonis 10F). Taalamuses on geen P0 aju tugevalt ekspresseerunud aga täiskasvanud aju ei ole see märgatav. Seevastu taalamusega samasse kompleksi kuuluv hüpotalamuses on signaal jälgitav nii täiskasvanud kui ka vastsündinud hiire aju.



Joonis 9. *Opcml 1a* ekspressioon vastsündinud hiire aju koronaallõikudel. Seeria ajaläbilõikeid A-D suunal anterioorne-posterioorne. Lühendid: CA1/2/3--*cornu ammonis*-e piirkonnad 1, 2 ja 3, COA-amügdala piirkond ajukoos, CP-juttkeha (*caudoputamen*), CTXsp-ajukoore subplaat, ECT- *ectorhinal* piirkond, Ent-*entorhinal* ajukoor, HY-hüpotalamus, Ins-insulaarne ajukoor, LS-lateraalne vaheseina tuum, MEA-mediaalne amügdala tuum, MH- mediaalne habenula, M-somatomotoorne ajukoor, OT-haistmisköbruke, PAA-piriformaalne-amügdala tuum, PIR-piriformaalne ajukoor, RS-retrospleniaalne ajukoor, Sf-*septofimbrial* tuum, SS-sensoorne ajukoor, TH-talamus.

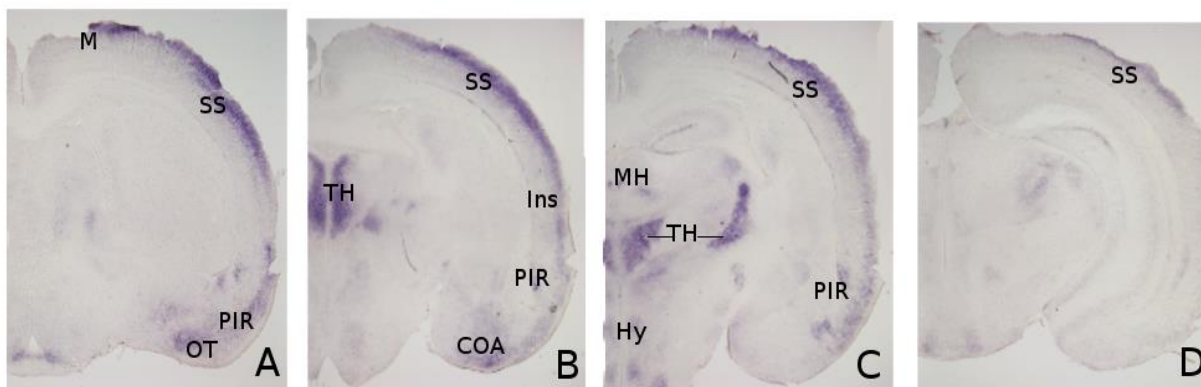


Joonis 10. *Opcml 1a* ekspressioon täiskasvanud hiire aju koronaallõikudel (Kadri Seppa avaldamata tulemused). Seeria ajalabilõikeid E-G suunal anteriorne-posterioorne. Lühendid: ACA- anteriorne tsingulumi ajukoore, AI-agranulaarne insulaarne ajukoore, Au-auditorne ajukoore, BLA CA1/2/3sp-cornu ammonis-s piirkonna 1, 2 ja 3 püramidaalne piirkond, COA-amügdala piirkond ajukoores, Dgsg-hammaskääru granulaarsete rakkude kiht, ECT- *ectorhinal* ajukoore, Ent-*entorhinal* ajukoore, GU-maitsmismeelise ajukoore, MH-mediaalne habenula, M-somatotoorne ajukoore, PAA-piriformaalne-amügdala tuum, PRh-*perirhinal* ajukoore, PIR-piriformaalne ajukoore, PTL-posterioorne parietaalne ajukoore, RS-retrospleniaalne ajukoore, SH-septohipokampuse tuum, SSp-primaarne sensoorne ajukoore, SSs-suplementaalne sensoorne ajukoore, Su-*subiculum*, ZI-*zona incerta*, TEa-ajalise taju ajukoore, VIS-visuaalse taju ajukoore, VMH-ventromediaalne hüpotalamuse tuum.

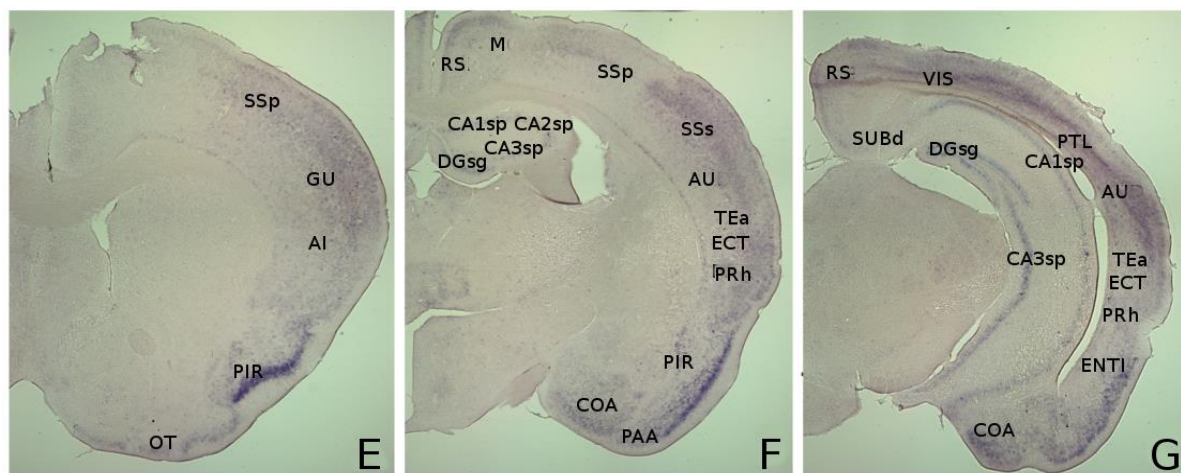
2.3.5 *Opcml 1b* ekspressioon P0 ja täiskasvanud hiire ajus

Opcml 1b on nii täiskasvanud kui ka P0 ajus ekspresseerunud palju vähemates piirkondades, kui *Opcml 1a*, kuigi P0 ajus on võrreldes täiskasvanuga siiski ekspressioon toimunud tunduvalt rohkemates struktuurides. Kuna see on olnud nii ka eelnevalt uuritud proovide kohta siis selle alusel võib väita, et IgLON-id ekspresseeruvad varases postnataalses ajus kõrgemalt kui täiskasvanud ajus. P0 ajus on *Opcml 1b* ekspresseerunud ainult motoorses ja sensoorses ajukoore piirkonnas (Joonis 11A-C), hüpotaalamuse tuumades (Joonis 11C), taalamuse tuumades (Joonis 11B,C). Täiskasvanud hiire aju anteriorises piirkonnas on *Opcml 1b* õrnalt ekspresseerunud sensoorses ajukoore osas (Joonis 12E). Signaal ei ole vaadeldav taalamuse ja hüpotaalamuse tuumades. Anterioorses aju piirkonnas on värvunud ajukoore retrospleniaalse, visuaalse, auditoorse ja *ectorhinal*-i esimesed kolm kihti (Joonis 12G).

Tugevasti on geen ekspresseerunud ainult piriformi püramidaalses kihis (Joonis 12E, F), kus on ka P0 aju *Opcml 1b* ekspresseerunud, kuigi madalalt.



Joonis 11. *Opcml 1b* ekspressioon vastündinud hiire aju koronaallõikudel. Seeria ajalõikeid A-D suunal anterioorne-posterioorne. Lühendid: COA-amügdala piirkond ajukoores, HY-hüpotalamus, Ins-insulaarne ajukoore, MH-mediaalne habenula, M-somatotoorne ajukoore, OT-haistisköbuke, PIR-piriformaalne ajukoore, SS-sensoorne ajukoore, TH-talamus.



Joonis 12. *Opcml 1b* ekspressioon täiskasvanud hiire aju koronaallõikudel (Kadri Seppa avaldamata tulemused). Seeria ajalõikeid E-G suunal anterioorne-posterioorne. Lühendid: AI-agranulaarne insulaarne piirkond, AUD-auditoorne piirkond, CA1/2/3sp-Ammoni sarves piirkonna 1, 2 ja 3 püramidaalne piirkond, COA-amügdala piirkond ajukoores, Dgsg- hammaskäärü granulaarsete rakkude kiht, ECT- *ectorhinal* piirkond, GU-maitsemisele piirkond, MO-somatotoorne piirkond, OT-haistisköbuke, PAA-piriformaalne-amügdala tuum, PERI-*perirhinal* piirkond, PIR-piriformaalne (pirnikujuline) piirkond, PTL-posterioorne parietaalne piirkond, RSP-retrospleniaalne piirkond, SSp-primaarne sensoorne piirkond, SSp-primaarne sensoorne piirkond, SSs-suplementaalne sensoorne piirkond, SUBd- *subiculum*, TEa-ajalise taju piirkond, VIS-visuaalse taju piirkond.

Kokkuvõtvalt saab väita, et kõik uuritud geenid avaldusid motoorses ja sensoorses ajukoore piirkonnas. Ammoni sarves, mis moodustab koos hammaskääruga hipokampuse, olid ekspresseerunud kõik geenid. P0 ajus hüpotaalamuse tuumades on avaldunud *Ntm 1a* ning *1b*, *Opcml 1a* ja *1b*. Täiskasvanud ajus olid *Opcml 1a*, *Ntm 1a* ja *1b* ekspresseerunud ainult mõnes üksikus tuumas, näiteks *Opcml 1a* oli ekspresseerunud ainult ventromediaalses hüpotalamuse tuumas. Teiste uuritud geenide puhul hüpotaalamuses ekspressiooni ei tuvastatud. Taalamuses, mis on edastab meeleorganitest tulevat infot ajukoode, ekspresseerusid P0 ajus ainult *Opcml 1b*, täiskasvanud ajus ainult *Ntm 1a*. Juttkehas ekspresseerusid samuti enamik uuritud geenidest, välja arvatud *Opcml*, mis täiskasvanu ajus ei avaldunud. Mediaalses habenulas avaldusid P0 ajus ainult *Opcml 1a* ja *1b*, täiskasvanud ajus ei ekspresseerunud ainult *Opcml 1b*.

Siiani on iga geeni puhul selgelt näha, et IgLON-ide ekspressioon muutub elu jooksul. Vastsündinud ajus ei ole kõik struktuurid veel välja arenenud ja adhesioonimolekulide üks eesmärke on reguleerida neuronite väljakasvu ja reguleerida närvisüsteemi arengut (Colman ja Filbin 1999). Täiskasvanud ajus on IgLON-idel tõenäoliselt fikseeriv funktsioon.

See töö ei sisalda *Negr1* ja *Iglon5* ekspressiooni analüüsi. Edasi peaks uurima *Negr1* ja *Iglon5* avaldumist varases postnataalses ajus ja neid võrdlema ekspressiooniga täiskasvanud hiire ajus. Vanaveski jt. (2017) uurisid ka IgLON perekonna avaldumist väljaspool aju, mille tulemusel avastati avaldumine ka väljaspool närvisüsteemi. Edasi peaks uurima ka vastsündinud närvisüsteemist väljajäävaid kudesid ja neid võrdlema täiskasvanuga. Selle tulemusel võidakse avastada varem teadmatuid IgLON perekonna funktsioone.

Kokkuvõte

Adhesioonimolekulid on raku membraaniga seotud glükoproteiinid, mis on olulised rakkude diferentseerumisel, migratsioonil ja adhesioonil (Homrich jt. 2015). IgLON on perekond adhesioonimolekule, mis põhiliselt ekspresseeruvad ajus (Colman ja Filbin 1999). Täpne funktsioon ei ole hetkel teada, aga IgLON-eid seostatakse vaimsete häitega (Koido jt. 2012). Lisaks võivad nad käituda kui tuumorsupressorid (Sellar jt. 2003; Reed jt. 2004; Ntougas jt. 2005; Cui jt. 2008; Kresse jt. 2009), reguleerida hipokampuse neuronites sünapside formeerumist (Hashimoto jt. 2009) ja kontrollida aksonite või neuritide väljakasvu (Gil jt. 1998; Marg jt. 1999, Schäfer jt. 2005).

Käesoleva töö eesmärk oli selgitada IgLON perekonna geenide ekspressiooni mustreid vastsündinud hiire ajus ning võrrelda saadud andmeid eelnevalt teadaolevate ekspressioonidega täiskasvanud hiire ajus. Töö eksperimentaalses viidi läbi vastsündinud hiirte ajude koronaallõikudel *in situ* hübriidsatsioon *Lsamp 1a*, *Opcml 1a*, *Opcml 1b*, *Ntm 1a* ja *Ntm 1b* transkripte äratundvate proovidega.

Tulemustest selgus, et P0 hiire ajus olid eelnimetatud geenid ekspresseerunud kõrgemalt, kui täiskasvanud ajus. Nii P0 kui ka täiskasvanud hiirte ajudes olid geenid peamiselt ekspresseerunud ajukooses. *Ntm 1a* on peamiselt ekspresseerunud motoorses, sensoorses ja auditoorses ajukooses ning nägemisköbrukese tuumades. *Ntm 1b* on peale ajukoore avaldunud veel ka hipokampuse ja hüpotaalamuse tuumades. *Opcml 1a* on ekspresseerunud nii täiskasvanud kui ka vastsündinud hiire aju hipokampuses. *Opcml 1b* on noore hiire ajus ekspresseerunud hüpotaalamuse tuumades, täiskasvanud hiire ajus toimub ekspressioon ainult ajukooses ja hipokampuses.

Edasi peaks uurima *Igln5* ekspressiooni vastsündinud hiire ajus ja võrdlema seda avaldumisega täiskasvanud hiire ajus. Veel peaks edasi uurima IgLON geenide ekspresseerumist ka närvisüsteemist väljajäävates kudedes ja neid võrdlema täiskasvanuga. Selle tulemusel võidakse avastada varem teadmatuid IgLON perekonna funktsioone.

Expression of IgLON family members in early postnatal mouse brain and comparison with the expression in adult mouse brain.

Anett Lillemaa

Summary

Adhesion molecules are cell surface glycoproteins participating in cell differentiation, migration, adhesion, and recognition (Homrich et al., 2015). IgLON is a family of adhesion molecules, that are mainly expressed in the central nervous system (Colman and Filbin 1999). The exact purpose of these adhesion molecules is not yet known, but it had been discovered, that they may act as tumor suppressors (Sellar et al., 2003; Reed et al., 2004; Ntougas et al., 2005; Cui et al., 2008; Kresse et al., 2009), regulate synaptic formation in hippocampal nuclei (Hashimoto et al., 2009) and regulate neurite outgrowth (Gil et al., 1998; Marg et al., 1999, Schäfer et al., 2005).

Purpose of this work was to examine the expression patterns of IgLON family members in the newborn mouse brain. Experimental part covered *in situ* hybridization with *Lsamp 1a*, *Opcml 1a*, *Opcml 1b*, *Ntm 1a* ja *Ntm 1b* probes on early postnatal mouse coronal brain sections.

Comparison of the expression in adult and early postnatal brains revealed that the genes were expressed more highly in P0 brain. The promoter specific expressions were mainly detected in cerebral cortex. *Ntm 1a* is expressed in thalamus nuclei, *Ntm 1b* is expressed in hippocampal area and hypothalamus nuclei. *Opcml 1a* is expressed in hippocampus of adult and newborn mice. *Opcml 1b* is expressed in hippocampus. *Opcml 1b* is expressed in hypothalamus nuclei in newborn mice, nothing is expressed in adult mouse brain.

Based on this thesis there should be further analysis conducted on the expression of the *Iglon5* gene in early postnatal brain and compare it to the expression in mature mouse brain. Furthermore we should examine the expression of IgLON family members outside of the nervous tissue in early postnatal mice and compare the results to previous studies.

Kasutatud kirjandus

Akeel, M., McNamee, M. J., Youssef, S., Moss, D. (2010). DIgLONs inhibit initiation of neurite outgrowth from forebrain neurons via an IgLON-containing receptor complex. *Brain Research* 1374: 27-35.

Brüggemann, N., Wandinger, K., Gaig, C., Sprenger, A., Junghanns, K., Helmchen, C., Münchau, A. (2016). Dystonia, lower limb stiffness, and upward gaze palsy in a patient with IgLON5 antibodies. *Movement Disorders* 31(5):762–764

Cui, Y., Ying, Y., van Hasselt, A., Ng, K. ... Tao, Q. (2008). OPCML Is a Broad Tumor Suppressor for Multiple Carcinomas and Lymphomas with Frequently Epigenetic Inactivation. *PLoS ONE* 3(9): 10.1371

Edelman, G. M. 1983. Cell adhesion molecules. *Science* 219(4584):450-457

Funatsu, N., Mijata, S., Kumanogoh, H., Shigeta, M., Hamada, K., Endo, Y., Sokawa, Y., Maekawa, S. (1999). Glycosylphosphatidylinositol-anchored Protein (Kilon), a Member of the IgLON Cell Adhesion Molecule Family. 274:8224-8230

Gil, O. D., Zanazzi, G., Struyk, A. F., Saizer, J. L. (1998). Neurotrimin Mediates Bifunctional Effects on Neurite Outgrowth via Homophilic and Heterophilic Interactions. *The Journal of Neuroscience* 18(22):9312-9325

Goldberg, J. L. (2013) How does an axon grow?. *Genes & Dev.* 17:941-958

Goodman, C. S. 1996. Mechanics and molecules that control growth cone guidance. *Annu. Rev. Neurosci.* 19:341–77

Hashimoto, T., Maekawa, S., Miyata, S. (2009). IgLON cell adhesion molecules regulate synaptogenesis in hippocampal neurons . Wiley InterScience 27: 496–498.

Heinla, I., Leidmaa, E., Kongi, ... Philips. M.-A. (2015). Gene expression patterns and environmental enrichment-induced effects in the hippocampi of mice suggest importance of *Lsamp* in plasticity. Front. Neurosci. 9: 205.

Homrich, M., Gotthard, I., Wobst, H., Diestel, S. (2015). Cell Adhesion Molecules and Ubiquitination—Functions and Significance. Biology 5(1), 1

Innos, J., Philips, M.-A., Raud, S., Lilleväli, K., Küks, S., Vasar, E. 2012. Genetic deletion of *Lsamp* causes exaggerated behavioral activation in novel environments. Behavioural Brain Research 228(1):74–81

Katz, A. M., Rosenthal, D., Sauder, D. N. (1991). Cell Adhesion Molecules: Structure, Function, and Implication in a Variety of Cutaneous and Other Pathologic Conditions. International Journal of Dermatology 30 (3): 153-160.

Kim, H., Hwang, J.-S., Lee, B., Hong, J., Lee, S. (2014). Newly Identified Cancer-Associated Role of Human Neuronal Growth Regulator 1 (NEGR1). J Cancer. 5(7): 598–608

Koido, K., Janno, S., Traks, T., Parksepp, M., Ljubajev, Ü., Veiksaar, P., Must, A., Shlik, J., Vasar, V., Vasar, E. (2014). Associations between polymorphisms of *LSAMP* gene and schizophrenia. Psychiatry Research 205(3):797–798

Koido, K., Traks, T., Balõtshev, R., Eller, T., Must, A., Koks, S., Maron, E., Tõru, I., Shlik, J., Vasar, V., Vasar, E. (2012). Associations between *LSAMP* gene polymorphisms and major depressive disorder and panic disorder. Translational Psychiatry 2, e152

Kresse, S. H., Ohnstad, H. O., Paulsen, E. B., Bjerkehagen, B., Szuhai, K., Serra, M., Schaefer, K.-L., Myklebost, O., Meza-Zepeda, L. A. 2009. *LSAMP*, a novel candidate tumor suppressor gene in human osteosarcomas, identified by array comparative genomic hybridization. *Genes chromosomes and cancer* 48(8):679–693

Krizsan-Agbas D., Pedchenko T., Smith, P. G. 2009. Neurotrimin is an estrogen-regulated determinant of peripheral sympathetic innervation. *J Neurosci Res.* 86(14): 3086–3095.

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

Leyboldt, F. Armangue, T. Dalmau, J. 2015. Autoimmune encephalopathies. *The Year in Neurology and Psychiatry* 1338:94–114

Marg, A., Sirim, P., Spaltmann, F., Plagge, A., Kauselmann, G., Buck, F., Rathjen, F. G., Brümmendorf, T. 1999. Neurotractin, a novel neurite outgrowth-promoting Ig-like protein that interacts with CEPU-1 and LAMP. *J. Cell Biol.* 145:865–876

McNamee, C. J., Reed, J. E., Howard, M. R., Lodge, A. P., Moss, D. J. (2002). Promotion of neuronal cell adhesion by members of the IgLON family occurs in the absence of either support or modification of neurite outgrowth. *Journal of Neurochemistry* 80(6):941-948

Mogenson, G. J., Jones, D. L., Yim, C. Y. 1980. From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system. *Progress in Neurobiology* 14:69-97

Must, A., Tasa. ., Lang, A., Vasar, E., Kõks, S., Maron, E., Väli, M.. (2008). Association of limbic system-associated membrane protein (*LSAMP*) to male completed suicide. *BMC Med Genet* 9:34.

Ntougkos, E., Rush, R., Scott, D., Frankenberg, T., Gabra, H., Smyth, J. F., Sellar, G. C. 2005. The IgLON Family in Epithelial Ovarian Cancer: Expression Profiles and Clinicopathologic Correlates. *Clinical cancer research* 11(16):5764-5768.

Petruzzelli, L. , Takami, M., Humes, H. D. (1999). Structure and function of cell adhesion molecules. *The American Journal of Medicine* 106(4): 467-476.

Philips, M.-A., Lilleväli, K., Heinla, I., Luuk, H., Hundahl, C. A., Kongi, K., Vanaveski, T., Tekko, T., Innos, J., Vasar, E. (2015). *Lsamp* is implicated in the regulation of emotional and social behavior by use of alternative promoters in the brain. *Brain structure and function* 220(3):1381-1393

Pimenta, A. F., Levitt, P (2004). Characterization of the genomic structure of the mouse limbic system-associated membrane protein (*Lsamp*) gene. *Genomics* 83(5):790-801

Pimenta, A. F., Zhukareva, V., Barbe, M. F., Reinoso, B. S., Grimley, C., Henzel, W., Fischer, I., Levitt, P. 1995. The limbic system-associated membrane protein is an Ig superfamily member that mediates selective neuronal growth and axon targeting. *Neuron* 15:287–297

Reed, J., McNamee, C., Rackstraw, S., Jenkins, J., Moss, D. (2004). Diglons are heterodimeric proteins composed of IgLON subunits, and Diglon-CO inhibits neurite outgrowth from cerebellar granule cells. *J Cell Sci.* 117: 3961-3973.

Rye, D. (2014). Paralysis lost: a new cause for a common parasomnia? *The Lancet Neurology* 13(6):531-532

Sabater, L., Gaig, C., Gelpi, E., ... Graus, F. (2014). A novel NREM and REM parasomnia

with sleep breathing disorder associated with antibodies against IgLON5: a case series, pathological features, and characterization of the antigen. *Lancet Neurol.* 13(6): 575–586

Sanz, R., Ferraro, G. B., Fournier, A. E. 2015. IgLON Cell Adhesion Molecules Are Shed from the Cell Surface of Cortical Neurons to Promote Neuronal Growth. *Journal of Biological Chemistry* 290:4330-4342.

Schofield, P.R., McFarland, K.C., Hayflick, J.S., Wilcox, J.N., Cho, T.M., Roy, S., Lee, N.M., Loh, H.H., Seeburg, P.H. (1989). Molecular characterization of a new immunoglobulin superfamily protein with potential roles in opioid binding and cell contact. *The EMBO journal* 8: 489-495.

Schäfer, M., Bräuer, A. U., Savaskan, N. E., Rathjen, F. G., Brummendorf, T. (2005). Neurotractin/kilon promotes neurite outgrowth and is expressed on reactive astrocytes after entorhinal cortex lesion. *Molecular and Cellular Neuroscience* 29(4):580–590

Sellar, G. C., Watt, K. P., Rabiasz, G. J., S... Gabra, H. (2003). OPCML at 11q25 is epigenetically inactivated and has tumor-suppressor function in epithelial ovarian cancer. *Nature Genetics* 34:337 – 343

Seppa, K. 2015. *Neurotrimini* ja *Obcam* geenide alternatiivsete promootorite 1a ja 1b poolt algatatud transkriptsiooni kirjeldamine hiire ajus

Spaltmann, F., Brummendorf, T. (1996). CEPU-1, a Novel Immunoglobulin Superfamily Molecule, Is Expressed by Developing Cerebellar Purkinje Cells. *The Journal of Neuroscience* 76(5):1770-1 779

Strakowski, S. M., Adler, C. M., DelBello, M. P. 2002. Volumetric MRI studies of mood disorders: do they distinguish unipolar and bipolar disorder? *Bipolar Disord* 4:80-88.

Struyk, A.F., Canoll, P.D., Wolfgang, M.J., Rosen, C.L., Deustachio, P., Salzer, J.L. (1995). Cloning of Neurotrimin defines a new subfamily of differentially expressed neural cell-adhesion molecules. *The Journal of Neuroscience* 15: 2141-2156.

Sugimoto, C., Maekawa, S., Miyata, S. (2010). OPCML, an immunoglobulin superfamily cell adhesion molecule, regulates morphology and proliferation of cerebral astrocytes. *Jornal of Neurochemistry* 112(3):818-828

Sugimoto, C., Maekawa, S., Miyata, S. (2012). Overexpression of IgLON cell adhesion molecules changes proliferation and cell size of cortical astrocytes. *Cell Biochemistry and Function* 30(5):400-405

Takita, J., Chen, Y., Okubo, J., Sanada, M., Adachi, M., Ohki, K., Nishimura, R., Hanada, R., Igarashi, T., Hayashi, Y., Ogawa, S. (2011). Aberrations of NEGR1 on 1p31 and MYEOV on 11q13 in neuroblastoma. *Cancer Sci*, 102(9): 1645-1650

Thorleifsson, G., Walters, D. F. Gudbjartsson, V. Steinthorsdottir, P. Sulem, A. Helgadottir (2009). Genome-wide association yields new sequence variants at seven loci that associate with measures of obesity. *Nat. Genet.* 41:18–24.

Vanaveski, T., Singh, K., Narvik, J., Eskla, K,-L., Visnapuu, T., Heinla, I., Jayaram, M., Innos, J., Lilleväli, K., Philips, M.-A., Vasar, E. (2017). Promoter-Specific Expression and Genomic Structure of IgLON Family Genes in Mouse. *Fron Neurosci.* 11: 38.

Willer, C.J., Speliotes, E.K., Loos, R.J. jt (2009). Six new loci associated with body mass index highlight a neuronal influence on body weight regulation. *Nat. Genet.* 41 (1): 24–34.

Williams, A. F., Barclay, A. N. 1988. *The Immunoglobulin Superfamily—Domains for Cell*

Surface Recognition. Annual Review of Immunology 6:381-405

Zhao, J., Bradfield, J.P., Li, M., Wang, K., Zhang, H., Kim, C.E., Annaiah, K., Glessner, J.T., Thomas, K., Garris, M., Frackelton, E.C., Otieno, F.G., Shaner, J.L., Smith, R.M., Chiavacci, R.M., Berkowitz, R.I., Hakonarson, H., Grant, S.F.A. (2009). The role of obesity-associated loci identified in genome-wide association studies in the determination of pediatric BMI. *Obesity (Silver Spring)* 17(12):2254-7

Kasutatud raamatud:

Colman R.D. ja Filbin T. M. (2006). *Cell adhesion molecules*, lk. 111-121.

Gavrilov, L. ja Tatarinov, V. (1985). *Anatoomia*, lk 287-303

Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D. jt. (2001). *Neuroscience* 2nd ed. Sunderland (MA): Sinauer Associates.

Kasutatud internetiaadressid:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

<http://www.genenames.org/>

<http://www.brain-map.org/>

Tänuavaldused

Sooviksin eelkõige tänada oma juhendajat Kersti Lillevälja abi, nõuannete, huvitava teema ja kannatliku juhendamise eest. Tänan Tambet Tõnissood juhendamise eest. Suur tänu Toomas Jagomäele, kelle abi kirjutamisel oli hindamatu. Tänan Katyayani Singh-d, kes aitas mind tulemuste piltidega. Tänu väärrib ka Triin Tekko, kes abistas laboritöös.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Anett Lillemaa (sünnikuupäev: 17.12.1992)

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

„IgLON perekonna liikmete ekspressioon vastündinud hiire ajus ja selle võrdlus ekspressiooniga täiskasvanud hiire ajus”,

mille juhendajateks on Kersti Lilleväli ja Tambet Tõnissoo,

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 30.08.2020 kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

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

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

Tartus, 25.08.2017