

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOGIA INSTITUUT

Alternatiivseid signaalpeptiide omava LSAMP valgu rakulisest lokalisatsioonist

Magistritöö

(40 EAP)

Liisi Tarve

Juhendajad

Ph. D. Kersti Lilleväli

Ph. D. Tambet Tõnissoo

MSc Toomas Jagomäe

TARTU 2018

Infoleht

Alternatiivseid signaalpeptiide omava LSAMP valgu rakulisest lokalisatsioonist

Limbilise süsteemiga seotud membraanvalk (LSAMP) kuulub neuraalsete adhesioonimolekulide perekonda. *LSAMP* geeni struktuur on evolutsiooniliselt konserveerunud ning sisaldab kahte alternatiivset esimest eksonit (1a ja 1b), mis erinevad signaalpeptiidi kodeeriva järjestuse poolest. Eksonite evolutsiooniline konserveerumine viitab asjaolule, et alternatiivsed N-terminaalsed signaalpeptiidid võivad omada funktsionaalselt erinevaid rolle. Antud töö eesmärgiks on välja selgitada, kas alternatiivsed LSAMP N-terminaalsed signaaljärjestused muudavad valgu rakulist paiknemist ning kas FLAG-märgis rikub LSAMP liitkonstruktide antigeensust ja lokalisatsiooni. Immunohistokeemiliste analüüside tulemusena selgus, et LSAMP 1a lokalisatsioon on kontsentreerunud plasmamembraanile, samas 1b lokalisatsioon on peamiselt koondunud tsütoplasmaatilistesse vesiikulitesse. LSAMP 1a/1b-C-FLAG liitvalkude epitoop on ära tuntav anti-LSAMP antikeha poolt ning liitvalkude lokalisatsioon on sarnane natiivsete LSAMP 1a/1b valkude paiknemisele.

Märksõnad: limbilise süsteemiga seotud membraanvalk, LSAMP, alternatiivsed signaalpeptiidid, immunotsütokeemia, elektronmikroskoopia

CERCS kood: B470 Füsioloogia

Localization of human LSAMP protein harboring alternative N-terminal signal sequences

The limbic system-associated membrane protein LSAMP is a founding member of neural adhesion family. The genomic structure of *LSAMP* gene is evolutionarily conserved harboring two first exons (1a and 1b). Translated LSAMP from alternative first exons differ only in signal peptide coding sequence. Evolutionary conservation suggests that these N-terminal signal peptides may have functionally different roles. The aim of this thesis is to find out whether the FLAG-tag disrupts antigenicity and localization of fusion constructs and whether alternative N-terminal signal sequences of LSAMP alters the cellular localization of the mature protein. Immunocytochemistry of transfected cells reveals that the epitope of LSAMP fusion constructs is recognized by anti-LSAMP antibody and localization of fusion constructs mimic the expression of native protein. The localization of native and fusion LSAMP 1a is concentrated on the plasma membrane whereas 1b is mostly seen in cytoplasmic vesicles.

Keywords: limbic system-associated membrane protein, LSAMP, alternative signal peptides, immunocytochemistry, electronmicroscopy

CERCS code: B470 Physiology

Sisukord

Infoleht	2
Kasutatud lühendid	4
SISSEJUHATUS	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1.1. IgLON immunoglobuliinide perekond	6
1.1.1 LSAMP geen ja LSAMP valk	7
1.2 Signaalpeptiidid	9
2. EKSPERIMENTAALOSA	10
2.1. Töö eesmärk	10
2.2. Materjal ja meetodika	11
2.2.1 Plasmiidid, konstruktid	11
2.2.2 Rakuliinid ja söötmed	11
2.2.3 Transfektsioon	12
2.2.3.1 Transfektsioon TurboFecti reagentiga	13
2.2.3.2 Transfektsioon Lipofectamine 2000TM reagentiga	13
2.2.4 Immunotsütokeemia	14
2.2.5 Immunoelektronmikroskoopia	15
2.3. Tulemused	16
2.3.1 Transfektsiooni reaktsioonide optimeerimine	16
2.3.2 FLAG-märgis ei riku LSAMP valgu antigeensust	17
2.3.3 Natiivse LSAMP 1a/1b ja FLAG märgisega liitvalkude rakuline lokalisatsioon	18
2.4. Arutelu	22
KOKKUVÕTE	25
SUMMARY	26
TÄNUSÕNAD	28
KIRJANDUSE LOETELU	29
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	39
LIHTLITSENTS	40

Kasutatud lühendid

BSA - veise seerumi albumiin (*bovine serum albumine*)

EYFP - võimendatud kollaselt fluorestseeruv valk (*enhanced yellow fluorescent protein*)

FBS - veise loote seerum (*fetal bovine serum*)

GPI - glükosüül-fosfatidüül-inositol (*glycosylphosphatidylinositol*)

Ig - immunoglobuliin (*immunoglobulin*)

IgSF - immunoglobuliinide superperekkond (*immunoglobulin superfamily*)

IL6 - interleukiin 6 (*interleukin 6*)

IL15 - interleukiin 15 (*interleukin 15*)

L - leutsiin (*leucine*)

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

LSAMP 1a/1b - natiivne 1a/1b signaalpeptiide sisaldav LSAMP

LSAMP 1a/1b-C-FLAG - 1a/1b signaalpeptiide sisaldav FLAG-märgisega LSAMP liitkonstruktsioon

LSP - pikk signaalpeptiid (*long signal peptide*)

MCF7 - adenokartsinoomi kasvaja rakuliin (*human breast adenocarcinoma cell line*)

NEAA - asendatavad aminohapped (*non-essential amino acids*)

NEGR1 - neuraalne kasvufaktor 1 (*neuronal growth regulator 1*)

NTM - neurotrimiin (*neurotrimin*)

OPCLM - opioide seondav valk/raku adhesioonmolekul (*opioid-binding protein/cell adhesion molecule*)

P - proliin (*proline*)

PB - naatriumfosfaat puhver (*sodium phosphate buffer*)

PLP - paraformaldehüüd-lüsiin-periodaat (*periodate-lysine-paraformaldehyde*)

SH-SY5Y - neuroblastoomi kasvaja rakuliin (*neuroblastoma cell line*)

SPase - signaalpeptidaas (*signal peptidase*)

SRP - signaali ära tundev osake (*signal recognition particle*)

SSP - lühike signaalpeptiid (*short signal peptide*)

U-87 MG - glioblastoomi kasvaja rakuliin (*glioblastoma cell line*)

SISSEJUHATUS

Limbilise süsteemiga seotud membraanvalk (LSAMP) on immunoglobuliinide superperekonda kuuluv adhesioonimolekul, mis koosneb kolmest glükosüleeritud immunoglobuliini domeenist. LSAMP mängib olulist rolli neuronite neuriitide väljakasvus, aksonite suunamises ja sünapside arengus. On teada, et *Lsamp* geeni inaktiveerimine põhjustab hiirte käitumises märgatavaid muutusi. *Lsamp*-puudulikke hiiri iseloomustab vähenenud ärevus ja agressiivsus, hüperaktiivsus ja normaalse hierarhia puudumine. Inimese *LSAMP* geeni teatud polümorfisme seostatakse mitme olulise neuropsühhiaatrilise häirega nagu näiteks suitsidaalse käitumise, skisofreenia ja autismiga. *Post mortem* uuringute tulemusena on leitud skisofreenia patsientide dorsolateraalises prefrontaalkoores ning hipokampuses muutusi *LSAMP* geeni ekspressioonis.

LSAMP geen sisaldab kahte alternatiivset esimest eksonit ja promooterit (1a ja 1b). Promooterid on aktiivsed erinevates aju struktuurides: 1a on aktiivne limbilise süsteemi osades nagu hipokampus, 1b aga peamiselt sensoorses korteksis ja sensoorsetes tuumades. Transkriptide poolt kodeeritud LSAMP valgu isovormid erinevad vaid N-terminaalsete signaalpeptiidide poolest. Alternatiivsete eksonite evolutsiooniline konserveerumine viitab, et need alternatiivsed N-terminaalsed signaalpeptiidid võivad omada funktsionaalselt erinevaid rolle. Samas on seni teadmata, millises etapis, kus ja kas üldse signaalpeptiidi järjestus lõigatakse ning kas küpsete LSAMP valkude järjestused on identsed. Mõistmaks LSAMP valgu rolli, on oluline välja selgitada, kuidas mõjutavad alternatiivsed N-terminaalsed signaalpeptiidid LSAMP vahendatud signalisatsiooni ja regulatsiooni.

Valgu funktsiooni mõistmiseks on esmalt oluline kindlaks määrata selle lokalisatsioon rakus. Sellest johtuvalt on antud magistritöö eesmärgiks välja selgitada alternatiivsetelt eksonitelt kodeeritud LSAMP valgu rakuline lokalisatsioon kolmes rakuliinis kasutades fluorestsents ja elektronmikroskoopia meetodeid. Magistritöö on koostatud Tartu Ülikooli Meditsiiniteaduste valdkonnas, Bio- ja siirdemeditsiini instituudis, füsioloogia osakonnas.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. IgLON immunoglobuliinide perekond

IgLON geeniperekonda kuulub viis neuraalset adhesioonimolekuli: LSAMP (*limbic system-associated membrane protein, IgLON3*), NTM (*neurotrimin, IgLON2*), OPCML (*opioid-binding protein/cell adhesion molecule, IgLON1*), NEGR1 (*KILON, IgLON4, neuronal growth regulator 1*) ja IgLON5 (Horton ja Levitt, 1988; Schoefield jt., 1989; Struyk jt., 1995; Funatsu jt., 1999; Sabater jt., 2014). Kõigile IgLON perekonna valkudele on iseloomulikud kolm tugevasti glükosüleeritud C2 tüüpi immunoglobuliini domeeni, 6-7 potentsiaalset glükosüleerimissaiti ja glükosüül-fosfatidüül-inositol (GPI) ankur (Eagleson jt., 2003; Itoh jt., 2008; Philips jt., 2014; Sanz jt., 2015). *LSAMP*, *OPCML* ja *NTM* omavad kahte alternatiivset promooterit ja esimest eksonit (1a ja 1b), mis funktsioneerivad erinevates aju piirkondades (Pimenta ja Levitt, 2004; Philips jt., 2014; Vanaveski jt., 2017). IgLON valgud moodustavad *in cis* perekonnasiseselt homo- ja heterofiilseid dimeere ning võtavad rakumembraanil *in trans* osa signaalkomplekside moodustumisest (Reed jt., 2004; McNamee jt., 2011). IgLON valkude vahel moodustuvatest interaktsioonidest on heterofiilne *cis* interaktsioon LSAMP ja NTM vahel üks sagedasemaid kombinatsioone (Reed jt., 2004).

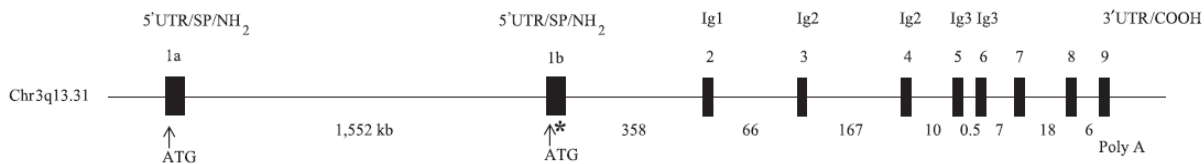
Kõik IgLON valgud on ekspresseeritud neuronites ja oligodendrotsüütides, välja arvatud NTM, mille ekspressioon on spetsiifiline vaid neuronitele (Sharma jt., 2015). NTM, OPCML, NEGR1 ja LSAMP reguleerivad neuriitide väljakasvu ja osalevad sünapside moodustumises (Gil jt., 2002; Hashimoto jt., 2009; Sugimoto jt., 2010; Akeel jt., 2011; Singh jt., 2018). Need neuraalsed adhesioonimolekulid võivad funktsioneerida ka mitte neuraalsetes organites ja kudedes kui tuumor-supressorid (Sellar jt., 2003; Ntougkos jt., 2005; Baroy jt., 2014). Osteosarkoomis on LSAMP valgu hulk tunduvalt madalam või puudub täielikult (Chen jt., 2003; Ntougkos jt., 2005; Kresse jt., 2009). OPCML ja NEGR1 ekspressioon on alla reguleeritud neerukasvajate ning seroosete ja endometrioidsete kasvajate korral (Ntougkos jt., 2005). LSAMP valk inhibeerib suure tõenäosusega kasvajarakkude jagunemist - mitmed uuringud on näidanud negatiivset korrelatsiooni LSAMP ekspressioonitaseme ja kasvajarakkude jagunemise vahel (Chen jt., 2003; Wang jt., 2008; Barøy jt., 2014).

IgLON perekonna geenide ajalis-ruumiline ekspressioonimuster imetaja embrüogeneesist täiskasvanueani viitab sellele, et IgLON perekonna valgud mängivad olulist rolli organismi arengus ning häired nende ekspressioonis kajastuvad mitmete haiguslike seisundite kujul (Hashimoto jt., 2009; Vanaveski jt., 2017). Varasematest uuringutest on teada, et LSAMP on seotud hiirte emotsionaalse ja sotsiaalse käitumise regulatsiooniga (Innos jt., 2011, 2012, 2013; Philips jt., 2014) ning inimesel seostatakse selle polümorfisme psühhiaatriliste haigustega nagu kliiniline depressioon, paanikahäire, skisofreenia ning suitsidaalne käitumine (Must jt., 2008; Behan jt., 2009; Koido jt., 2012, 2014). Lisaks on skisofreenia ja bipolaarse häirega patsientide frontaalses koos tuvastatud 20% kõrgem LSAMP valgu tase (Behan jt., 2009). Polümorfisme *Negr1* geenis seostatakse depressiooni ja rasvumisega, *NTM* geenis olevaid polümorfisme aga intelligentsusega (Melén jt., 2010; Pan jt., 2011; Hotta jt., 2011; Elks jt., 2012; Poveda jt., 2014; Hyde jt., 2016; Vanaveski jt., 2017). OPCML valgu üheks teadaolevaks funktsiooniks on alla suruda kasvajate arenemist (Cui jt., 2008; McKie jt., 2012). IgLON5 on seotud entsefalopaatiaga kaasnevate unehäirete, neurodegeneratsiooni ja autoimmuunsusega (Sabater jt., 2014; Leypoldt jt., 2015).

1.1.1 *LSAMP* geen ja *LSAMP* valk

Inimese *LSAMP* geen paikneb 3. kromosoomis (3q13.2) ning koosneb 11 eksonist (Joonis 1), mis paiknevad 2,2 Mb suurusel alal (Pimenta ja Levitt, 2004; Kresse jt., 2009). *LSAMP*-il on praeguseks kirjeldatud 7 erinevat transkripti (Ensembl). *LSAMP* geen sisaldab kahte alternatiivset esimest promooterit ja eksonit (1a ja 1b) (Joonis 1). Alternatiivsetelt transkriptidelt kodeeritud *LSAMP* isovormid erinevad ainult N-terminaalse signaaljärjestuse poolest. Kahe esimese eksoni vahele jääb 1,6 Mb suurune intron, mis on geeni ebahariliku suuruse põhjuseks (Pimenta jt., 1995; Pimenta jt., 1996; Pimenta ja Levitt, 2004). Esimesed eksonid paiknevad CpG saarekestes ning mõlema eksoni 5' regioonis esinevad GC-rikkad segmendid. Lisaks puudub klassikaline TATA element (*TATA box*), mis on raku adhesioonmolekule kodeerivate geenide promooteritele iseloomulikuks tunnuseks (Pimenta ja Levitt, 2004). Kahte promooterit sisaldav geenistruktuur on evolutsiooniliselt konserveerunud ning on lisaks inimesele kirjeldatud ka hiire ja kanas (Brümmendorf jt., 1997; Pimenta ja Levitt, 2004). Hiire *Lsmp* geeni alternatiivsed promooterid on aktiivsed erinevates aju struktuurides: 1a on aktiivne limbilise

süsteemi osades nagu hipokampus, 1b aga peamiselt sensoorse töötusega seotud primaarse korteksi piirkondades ja taalamuse sensoorsetes tuumades (Philips jt., 2014). LSAMP valgu lokalisatsiooni on kirjeldatud limbilise süsteemi kortikaalsetes ja subkortikaalsetes alades asuvate neuronite rakukehade pinnal ja dendriitides (Zacco jt., 1990; Pimenta ja Levitt, 2004).



Joonis 1. LSAMP geeni intron-ekson struktuur. Geen jaguneb 11-neks eksoniks (mustad ristkülikud). Eksonite vahel paiknevate intronite (sirgjoon) suurus on välja toodud kb-des (1000 aluspaari). Alternatiivsete esimeste eksonite (1a ja 1b) translatsiooni algussait (ATG) on tähistatud nooltega. Eksonid 2-6 kodeerivad immunoglobuliini domeene (Ig 1-3). Lühendid: 5'UTR - 5' mittetransleeritav ala; 3'UTR - 3' mittetransleeritav ala; SP - signaalpeptiid; NH₂ - valgu aminoterminus; COOH - valgu karboksüterminus (Pimenta ja Levitt, 2004).

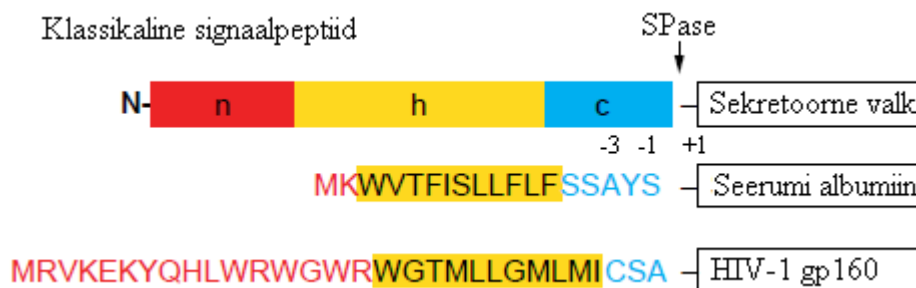
LSAMP geeni produktiks on 64 - 68 kDa suurune glükosüleeritud membraanivalk, mille järjestus on inimese ja närilise vahel evolutsiooniliselt konserveeritud omades vaid nelja aminohappelist erinevust (Pimenta jt, 1996). Valgu küpsedes lisatakse post-translatsiooniliste modifikatsioonide käigus GPI ankur, mille abil toimub kinnitumine plasmamembraanile (Low, 1989; Pimenta jt., 1996; Paulick ja Bertozzi, 2008). LSAMP valk sisaldab kolme C2 tüüpi immunoglobuliini (Ig) domeeni ning kuut konserveerunud tsüsteiini (Cys) jääki, mis sarnanevad immunoglobuliinides ja immunoglobuliini superperekonnas (IgSF) leiduvatele (Williams ja Barclay, 1988; Pimenta jt., 1996). LSAMP valgu esimene Ig (Ig I) domeen on vajalik hipokampuse neuronite neuriitide väljakasvuks (Pimenta jt., 1995; Eagleson jt., 2003). Teise Ig domeeni (Ig II) olulisus peitub võimes inhibeerida seljajuure ganglionite neuriitide väljakasvu. Erinevalt esimesest domeenist vajab Ig II inhibitoorse aktiivsuse avaldumiseks ka teiste Ig domeenide olemasolu. Kolmas Ig domeen (Ig III) ei mõjuta otseselt neuriitide väljakasvu ning selle funktsioon on teadmata (Eagleson jt., 2003). Kasvu moduleerimine on seotud LSAMP valgu bifunktsionaalse aktiivsusega - homofiilne dimeer mõjutab positiivselt neuriitide väljakasvamist, heterofiilne dimeer aga inhibeerib seda (Pimenta jt., 1995; Gil jt., 2002; Eagleson jt., 2003). Lisaks leidub LSAMP valgus seitse potentsiaalset N-glükosülatsioonisaiti ning selle hüdrofiilses tuumikosas

kaheksa potentsiaalset proteiinkinaas C ja viis kinaas II fosforülatsioonisaiti (Woodgett jt., 1986; Kuenzel jt., 1987; Pimenta jt., 1996; Itoh jt., 2008).

1.2 Signaalpeptiidid

Sekreteeritavad ja membraansed valgud kannavad oma N-terminaalses osas signaaljärjestust, mille ülesandeks on suunata sünteesitav valk endoplasmaatilisse retiikulumi (ER). Selle järjestuse tunneb ära signaali ära tundev osake (*SRP, signal recognition particle*). SRP seondumine signaalpeptiidiga peatab translatsiooni. Järgnevalt seondub SRP endoplasmaatilise retiikulumi membraanis paikneva SRP retseptoriga, mis omakorda põhjustab signaalpeptiidi seostumist translookoniga. Translatsioon jätkub ning signaaljärjestus eemaldatakse signaalpeptidaasi (*SPase, signal peptidase*) abil (Meyer jt., 1982; Gilmore jt., 1982; Walter ja Lingappa, 1986; Walter, 1994). Signaalpeptidaasi poolt lõigatud signaalpeptiid vabaneb translokatsioonisaadist lipiidsesse kaksikkihti ning kinnitub sarnaselt integraalsele membraanvalgule ER membraani. Kui signaalpeptiidil puudub edasine funktsioon, see lagundatakse. Samuti võib see funktsioneerida intergraalse membraanvalgu või sekretoorse valguna. Viimase puhul vabaneb signaalpeptiid kas tsütosooli või ER lumenisse (Lyko jt., 1995; Martoglio ja Dobberstein, 1998; Kapp jt., 2000; Lemberg jt., 2001).

Signaalpeptiid on tavaliselt 16-30 aminohappe pikkune ja koosneb kolmest struktuursest osast: hüdrofoobne keskosa ehk h-regioon (5-15 hüdrofoobset aminohapet), hüdrofiilne positiivse laenguga N-terminaalne regioon (1-5 aminohapet) ja laenguta C-terminaalne regioon (3-7 polaarseid aminohapet). Signaalpeptiidi C-terminaalses osas asub signaalpeptidaasi lõikesait (Joonis 2) (von Heijne, 1983).



Joonis 2. Klassikalise signaalpeptiidi struktuur. Kolmeosaline ülesehitus koosneb hüdrofiilsest N-terminaalsest n-regioonist (punane), keskmisest hüdrofoobsest h-regioonist (kollane) ja C-terminaalsest c-regioonist (sinine).

Signaalpeptidaasi (SPase) lõikesaidist (nool) vasakule jääb signaalpeptiidi viimane aminohape (-1), paremale transleeritud valgu esimene aminohape (+1). Kahe näitena on toodud seerumi albumiini ja inimese immuunpuudulikkuse viiruse tüüp 1 ümbrise glükoproteiin 160 (HIV-1 gp 160) signaalpeptiidi järjestused (Martoglio ja Dobberstein, 1998).

Signaalpeptiidid mängivad rolli valgu lokalisatsiooni, interaktsioonipartnerite ning kokkuvõttes ka valgu funktsiooni määramises (Davis jt., 2006). Kirjanduses on näidatud, et alternatiivsete signaalpeptiidide kasutamine muudab valgu lokalisatsiooni. Inimese interleukiin 15 (IL15) eksisteerib vähemalt kahe isovormina. Üks neist omab 21 aminohappe pikkust lühikest signaalpeptiidi (*SSP, short signal peptide*), teine 48 aminohappe pikkust pikka signaalpeptiidi (*LSP, long signal peptide*). Lühikese signaalpeptiidiga IL15 isovorm ei sisene ER-i ning seda ei sekreteerita. See isovorm lokaliseerub hajusalt tüstoplasmas ja tuumas. Pika signaalpeptiidiga IL15 seevastu siseneb ER-i ja sekreteeritakse. SSP reguleerib küpse valgu saatust reguleerides intratsellulaarset liiklemist. LSP aga reguleerib translatsiooni kiirust ning suunab valgu sekretoorsesse ratta (Tagaya jt., 1997; Kurys jt., 2000). Samuti võib signaalpeptiid omada täiesti omaette funktsiooni. Hiljuti on näidatud, et G-valk seoselise retseptori (*corticotrophin-releasing factor receptor type a2*) puhul jääb signaalpeptiidi järjestus lõikamata, mis moodustab küpses valgus iseseisva N-terminaalse domeeni (pesudo signaalpeptiid). Selle funktsioonideks on reguleerida retseptorite homodimerisatsiooni ning valgu hulka rakumembraanil (Gilbert jt., 2017).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärk

Kuna antud töö moodustab osa suuremast projektist, mis hõlmab neuraalse adhesioonimolekuli LSAMP FLAG-liitkonstruktid ko-immunosadestamist ja sellele järgnevat mass-spektromeetrilist analüüsi, siis sellest lähtuvalt on töö eesmärkideks:

- välja selgitada, kas FLAG-märgis muudab LSAMP liitkonstruktid (LSAMP 1a/1b-C-FLAG) valgu antigeensust ja lokalisatsiooni;

- välja selgitada alternatiivseid (1a ja 1b) N-terminaalseid signaalpeptiide omavate LSAMP valkude rakuline lokaliseerimine kolmes erinevas rakuliinis.

2.2. Materjal ja meetodika

2.2.1 Plasmiidid, konstruktid

Alternatiivsetelt 1a ja 1b eksonitelt kodeeritud inimese natiivne LSAMP (LSAMP 1a/1b) ning FLAG-märgisega (aminohappeline järjestus: DYKDDDDK) (Sigma Aldrich) liitkonstruktid (LSAMP 1a/1b-C-FLAG) olid eelnevalt kloonitud Bio- ja siirdemeditsiini instituudis imetaja ekspressiooni vektorisse pCI (Joonis 3). Transfektsiooni efektiivsuse kontrollimiseks kasutati kollaselt fluorestseeruvat valku kodeerivat plasmidi pEYFP-N1 (Clontech).

a

LSAMP 1a	1	M R T Y W L H S V W V L G F F L S L F S L Q G	↓	LPVRSVDFNRTDNI	38
LSAMP 1b	1	M V R R V Q P D R K Q L P L V L L R L L C L L P T G L P	↓	LPVRSVDFNRTDNI	43

b

LSAMP 1a/1b	291/294	NKLGVTNASLVLF	- - - - -	PGSVRGIN	*	GSISLAVP	325/328
LSAMP 1a/1b-C-FLAG	291/294	NKLGVTNASLVLF	<u>P S R D Y K D D D K K S T</u>	PGSVRGIN	*	GSISLAVP	339/342

Joonis 3. Disainitud natiivne ja FLAG-märgisega inimese LSAMP valgu järjestus. (a) LSAMP N-terminaalne signaalpeptiidi järjestus (rasvaselt) ja ennustatud lõikamiskoht (nool). (b) Natiivse ja liitkonstrukti (LSAMP 1a/1b-C-FLAG) C-terminaalne osa. Ennustatud glükosüül-fosfatidüül-inositol ankrulõikamiskoht on märgistatud tärniga. Allajoonitud fragment tähistab natiivsele valgule lisatud järjestust ning rasvases kirjas on toodud FLAG-märgis. Numbrid esindavad esimest ja viimast aminohapet järjestuses. Signaalpeptiidi lõikamiskohad on ennustatud SignalP4.1 tarkvara (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) abil.

2.2.2 Rakuliinid ja söötmed

Eksperimentides kasutati kolme epiteelilise morfoloogiaga immortaliseeritud inimese kasvaja rakuliini:

1. SH-SY5Y - neuroblastoomi kasvajakud (European Collection of Authenticated Cell Cultures, kataloogi number 94030304)
2. U-87 MG - glioblastoomi kasvajakud (European Collection of Authenticated Cell Cultures, kataloogi number 89081402)

3. MCF7 - adenokartsinoomi kasvajakud (American Type Culture Collection, HTB--22TM)

SH-SY5Y rakke kasvatati EMEM (Sigma Aldrich, *Eagle's Minimum Essential Medium*) : Ham`s F12 (Sigma Aldrich) (1:1) söötmes, mis sisaldas 15% veise loote seerumit (Sigma Aldrich, FBS, *fetal bovine serum*), 2 mM glutamiini (Sigma Aldrich), 1x asendatavate aminohapete lahust (Sigma Aldrich, NEAA, *100x non essential amino acids*) ning 1x penitsilliin-streptomütsiini (Sigma Aldrich, *Pen-Strep 100x*,) (lõppkontsentratsioonid).

U-87 MG rakke kasvatati EMEM söötmes, mis sisaldas 10% FBS-i, 2 mM glutamiini, 1x asendatavate aminohapete lahust, 1 mM naatriumpüruvaati (Sigma Aldrich, *sodium pyruvate solution*) ning 1x penitsilliin-streptomütsiini (lõppkontsentratsioonid).

MCF7 rakke kasvatati EMEM söötmes, mis sisaldas 10% FBS-i ning 1x penitsilliin-streptomütsiini (lõppkontsentratsioonid).

Kui rakud olid saavutanud 70-80% konfluentsuse, jaotati need suhtele 1:3. Rakke pesti 5 ml fosfaatpuhvriga (Sigma Aldrich, PBS, *phosphate buffered saline* pH7.4), lisati 1 ml trüpsiini (Sigma Aldrich, *trypsin*) ja inkubeeriti toatemperatuuril, kuni kinnitunud rakud eemaldusid 10 cm läbimõõduga koekultuuri tassilt (Falcon) (1-2 min). Trüpsiini inaktiveerimiseks lisati tassile 6 ml seerumiga söödet, kogu suspensioon kanti 50 ml tuubi ning tsentrifuugiti 200 rpm juures 5 min (Eppendorf Centrifuge 5810 R). Põhja tsentrifuugitud rakkudel eemaldatud sööde asendati 3 ml uue söötmega, rakud suspendeeriti söötmes üles ning kanti 10 cm koekultuuri tassidele, kuhu oli eelnevalt lisatud 7 ml söödet. Rakke kasvatati 37°C juures 5% CO₂ keskkonnas (Sanyo O₂/CO₂ Incubator).

2.2.3 Transfektsioon

Transfektsioonile eelneval päeval külvati MCF7, SH-SY5Y ja U87 MG rakud 8 mm diameetriga klaasidele, mis olid omakorda asetatud 24-kannuga koekultuuri plaadi (Thermo Scientific) põhja. Plaaditud rakkude hulk sai valitud nii, et eksperimendi alustamise ajaks oleksid need saavutanud 70-80% konfluentsuse. Konfluentsus ja plaaditud rakkude hulk määrati nii mikroskoobiga vaatlemisel kui ka rakuloendurit (EVE Automatic Cell Counter, NanoEnTek) kasutades.

Transfektsioon viidi läbi tootjapoolset protokoll järgides, v.a reagenti ja rakkudesse viidava plasmiidse DNA kogused, mida vähendati poole võrra. Koguseid vähendati, sest protokollis antud kogused olid toksilised ning põhjustasid rakkude surma. Transfektsiooni efektiivsuse kontrollimiseks kasutati kollaselt fluorestseeruvat valku EYFP (*enhanced yellow fluorescent protein*) kodeerivat plasmidi pEYFP-N1 (Clontech). pEYFP-N1 transfeeeriti glioblastoomi, neuroblastoomi ja adenokartsinoomi rakkudesse kasutades sama kontsentratsiooni, mida LSAMP konstruktide puhul. EYFP-d ekspresseerivate rakkude hulk tuvastati fluoretsentsmikroskoobi abil.

2.2.3.1 Transfektsioon TurboFecti reagentiga

Transfektsioon viidi läbi seerumi- ja antibiootikumivabas söötmes kasutades TurboFect reagenti (Thermo Scientific, *TurboFect transfection reagent*). 1 µg LSAMP konstrukte sisaldavat plasmiidset DNA-d lahustati 100 µl-is söötmes, kuhu lisati 1,7 µl TurboFecti reagenti ning antud segu inkubeeriti toatemperatuuril 20 min. Rakkudel olev sööde eemaldati ning neile kanti peale 1 ml seerumi- ja antibiootikumivaba söödet. 100 µl TurboFecti ja DNA komplekside segu tilgutati rakkudele ning inkubeeriti 37°C juures 5% CO₂ keskkonnas 5-6 h. Inkubeerimisaja möödudes asendati transfektsioonisegu sisaldav sööde antibiootikume ja seerumit sisaldava kasvusöötmega. Natiivse LSMAP 1a/1b ja LSAMP 1a/1b-C-FLAG liitkonstrukti ekspressiooni vaadeldi 24-48 h möödudes.

2.2.3.2 Transfektsioon Lipofectamine 2000TM reagentiga

Transfektsioon viidi läbi antibiootikumivabas Opti-MEMTM vähendatud seerumisisaldusega söötmes (Thermo Scientific, *Opti-MEMTM reduced serum medium*) kasutades Lipofectamine 2000TM reagenti (Thermo Scientific, *Lipofectamine 2000TM transfection reagent*). 0,4 µg LSAMP konstrukte sisaldavat plasmiidset DNA-d lahustati 50 µl-is söötmes. LipofectamineTM 2000 reagent segati 50 µl söötmega ning inkubeeriti 5 min toatemperatuuril. DNA ja transfektsioonireagenti segud segati kokku ja inkubeeriti 20 min toatemperatuuril. Rakkudel olev sööde eemaldati ning neile kanti peale 500 µl Opti-MEMTM söödet. 100 µl LipofectamineTM 2000 ja DNA komplekside segu tilgutati rakkudele ning inkubeeriti 37°C juures 5% CO₂ keskkonnas 4-6 h. Inkubeerimisaja möödudes asendati transfektsioonisegu sisaldav sööde

antibiootikume ja seerumit sisaldava kasvusöötmega. Natiivse LSMAP 1a/1b ja LSAMP 1a/1b-C-FLAG liitkonstrukti ekspressiooni vaadeldi 24-72 h möödudes.

2.2.4 Immunotsütokeemia

Immunotsütokeemiline valgu detekteerimine viidi läbi järgnevalt. Esmalt pesti rakke 1x PBS-iga ning fikseeriti 37°C juures 15 min eelnevalt soojendatud 4% paraformaldehüüd (PFA, Sigma Aldrich)/4% sahharoos (AppliChem)/PBS lahuses. Fikseerimisele järgnesid 2 korda 5 min pesud PBS-is. Seejärel permeabiliseeriti rakud toatemperatuuril 0.1% Triton X-100 (Naxo)/PBS lahuses 5 min jooksul ning pesti 2 korda 5 min järel PBS-iga. Antikehade ebaspetsiifilise seondumise vältimiseks blokeeriti rakud 10% veise seerumi albumiini (BSA, *bovine serum albumine*)/PBS lahuses 37°C juures 30 min jooksul. Järgnevalt inkubeeriti rakke 3% BSA/PBS primaarse antikehade lahuses 37°C juures 1 h:

- hiire monoklonaalne anti-FLAG[®] M2 antikeha (1:1000, Sigma-Aldrich) - tuvastamaks LSAMP 1a/1b-C-FLAG liitvalke;
- hiire monoklonaalne anti-LSAMP (1:200, hybridoma clone 2G9, Developmental Studies Hybridoma Bank) - tuvastamaks natiivseid LSAMP 1a/1b ning LSAMP 1a/1b-C-FLAG liitvalke.

Seondumata primaarne antikeha pesti välja vahetades PBS-i lahust 3 korda iga 5 min järel. Järgnevalt inkubeeriti rakke sekundaarse Alexa Fluor[®] 488 konjugeeritud hiire IgG vastase eeslis valmistatud antikeha lahusega (1:1000, Invitrogen) 3% BSA/PBS anti-mouse, 1:1000 antikeha lahusega. Sarnaselt eelnevale, pesti seondumata antikeha välja vahetades PBS lahust 3 korda iga 5 min järgi. Viimaks ilmestati rakutuomad Hoechst bisbenzimidide (H33258) fluorestseeruva värviga (lõppkontsentratsioon 10 µM, Abcam) PBS-is ning pesti 1 kord 1x PBS-iga ning sulundati Fluoromount (Sigma Aldrich) sulundusvedelikku. Preparaatide dokumenteerimiseks kasutati Olympus FV1200 konfokaalmikroskoopi ning annoteeriti GIMP (GNU Image Manipulation Program) pilditöötlus tarkvara abil.

2.2.5 Immunoelektronmikroskoopia

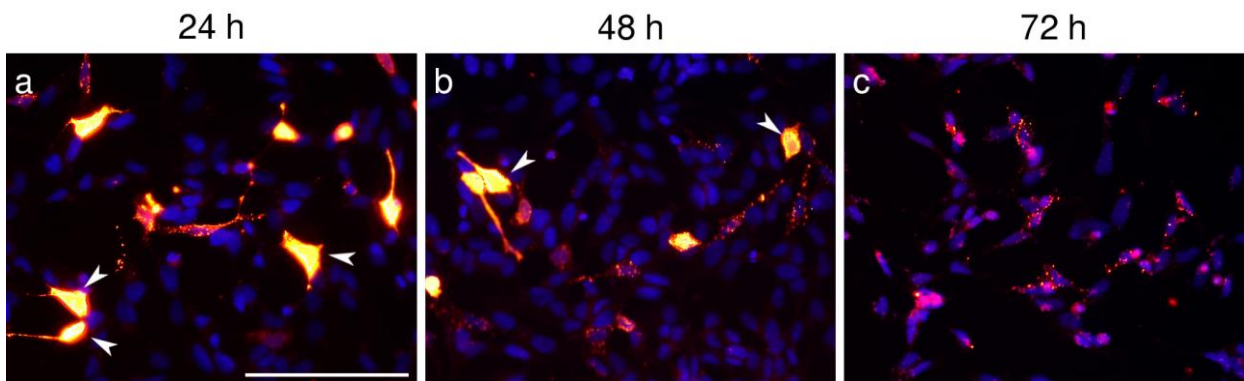
Eelnevalt transfekteeritud rakud kasvatati >90% konfluentsuseni ning fikseeriti PLP (2% paraformaldehüüd-lüsiin-periodaat) fiksaatoriga 2 h jooksul toatemperatuuril. Seejärel permeabiliseeriti rakud 5 min jooksul permeabiliseermislahusega (0.01% saponiini lahus 0,1% BSA/0,1M naatriumfosfaat puhvril (PB, 0,1M NaH₂PO₄/0,1M Na₂HPO₄, pH 7.4). Järgnevalt inkubeeriti rakke toatemperatuuril kas hiire monoklonaalse anti-FLAG[®] M2 antikehaga (1:50, Sigma-Aldrich) või hiire monoklonaalse anti-LSAMP (1:50, hybridoma clone 2G9) antikehaga permeabiliseerimislahuses 1 h vältel. Seondumata antikehad pesti välja permeabiliseerimislahusega vahetades lahust 3 korda iga 2 min järel. Seejärel inkubeeriti rakke 1 h jooksul 5 nm nanokullaga konjugeeritud kitses valmistatud hiire IgG vastase antikeha lahusega (1:50, TAAB, GEM025) permeabiliseerimislahuses ning pesti nagu ülal kirjeldatud. Viimaks järel fikseeriti rakud 1% glutaaraldehüüdi (AppliChem)/0,1M PB lahuses 15 min vältel ja pesti 5 korda 2 min 90 mM naatrium-kakodülaatpuhvriga (pH 7.4, AppliChem), et vältida osmium tetraoksiidi sadenemist rakustruktuuridele. Seejärel fikseeriti ning kontrasteeriti 15 min jooksul rakumembraanid 1% osmium tetraoksiidi (Electron Microscopy Sciences) lahusega 90 mM naatrium kakodülaatpuhvril. Seejärel pesti rakke 90 mM naatrium kakodülaatpuhvriga 5 korda 2 min ning jätkati sisetamisega epoksiidvaiku (keskmise kõvadus, TAAB). Esmalt dehüdreeriti rakud kasvava etanooli kontsentratsiooniga vesi lahustes (30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96%) ning viimaks 15 sek jooksul atsetooni (Sigma Aldrich). Rakkudele valati peale epoksiidvaik ning jäeti kaheks tunniks toatemperatuurile impregneeruma. Vaigu polümeriseerumiseks inkubeeriti proove 48 h 60°C juures. Ultraõhukeste (90 - 100 nm) lõikude tegemiseks kasutati veevanniga teemantnuga (Diatome), mis oli kinnitatud ultramikrotoomile (PowerTome MT-XL RMC, RMC Products, Boeckeler Instruments, Inc.). Ilmestamiseks raku struktuure kontrasteeriti lõigud raskemetalli sooladega. Esmalt inkubeeriti lõike 3 minutit 2% uraniülatsetaadi/50% etanooli lahuses (w/v) ning loputati 50% etanoolis ja milliQ-s. Seejärel inkubeeriti lõike 2 minuti jooksul 0,1M NaOH kontsentratsiooniga 0.2% pliitsitraadi lahuses (pH 12) ning loputati 0,01M NaOH lahuses ja milliQ-s. Preparaatide vaatlemiseks kasutati transmissiooni elektronmikroskoopi Tecnai G² Spirit BioTWIN (FEI), mis töötab 120 kV kiirenduspingel ning dokumenteeriti Orius (Gatan) CCD kaameraga. Annoteerimiseks kasutati GIMP (GNU Image Manipulation Program) pilditöötlustarkvara.

2.3. Tulemused

2.3.1 Transfektsiooni reaktsioonide optimeerimine

Alternatiivsetelt 1a ja 1b eksonitelt kodeeritud natiivsed LSAMP konstruktid viidi kolme erinevasse rakuliini (MCF7, SH-SY5Y, U87 MG) kasutades kahte erinevat transfektsioonireagenti (TurboFect ja Lipofectamine 2000). Transfektsioon TurboFect-iga ei andnud soovitud tulemusi - transfektsiooni efektiivsus oli madal ning rakkude suremus suur. Edasised eksperimendid viidi läbi Lipofectamine 2000-ga, millega saavutati parem efektiivsus ning suurem rakkude elumus.

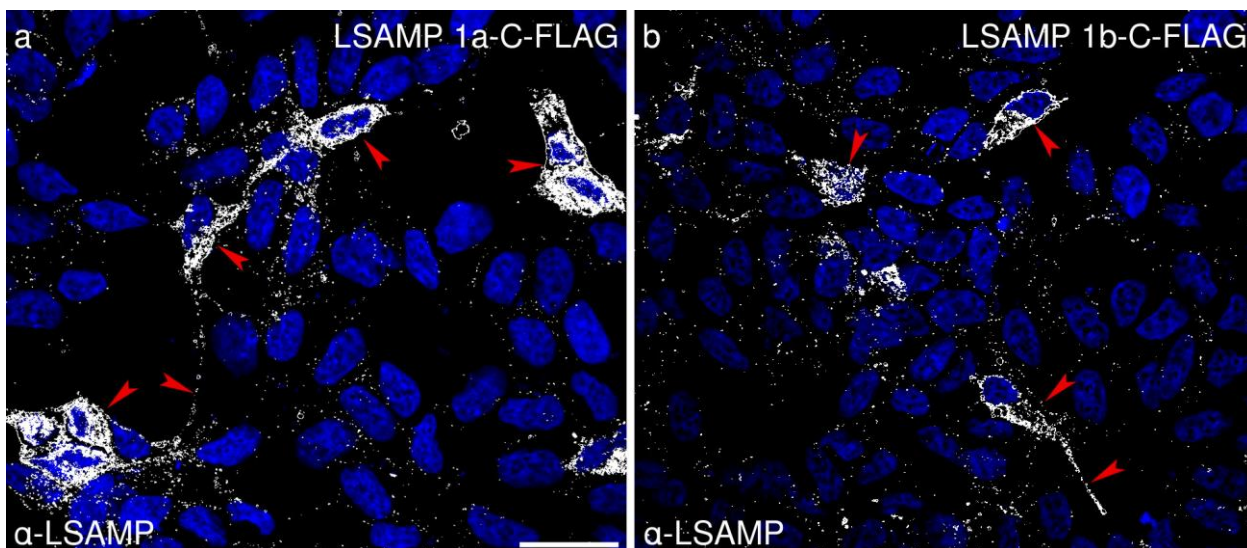
Valgu üle-ekspressioon koormab sekretoorse raja kompartmente ning võib takistada valkudel saavutada korrektset lokaliseerimist (Glick, 1995). Samuti teeb uuritava valgu üle-ekspressioon keeruliseks selle täpse lokaliseerimise rakus. Sellest tulenevalt hinnati natiivsete LSAMP 1a/1b konstruktide ekspresseerimist SH-SY5Y rakuliinis erinevatel ajapunktidel 24, 48 ja 72 h peale transfekteerimist kasutades immunotsütokeemilist märkimist. Primaarse antikehana kasutati anti-LSAMP antikeha. Katsete tulemusena selgus, et LSAMP konstruktide üle-ekspressioon oli kõige tugevam 24 tundi peale transfektsiooni (Joonis 4 a). Transfekteerunud rakkudes polnud fluorestsents-signaali kõrge intensiivsuse tõttu võimalik täpsemalt määrata LSAMP lokaliseerimist. Üle-ekspressioon esines ka 48 h pärast transfekteerimist ning sarnaselt 24 h ajapunktile polnud enamikus transfekteerunud rakkudes valgu lokaliseerimist määratletav (Joonis 4 b). Siiski võis osades rakkudes detekteerida LSAMP valgu paiknemist erinevates raku piirkondades (rakumembraan, tsütoplasma, jätked; Joonis 4 b). Parimaks ajapunktiks LSAMP lokaliseerimise määramisel oli antud tingimuste juures 72 h pärast transfektsiooni, mil valgu lokaliseerimist oli selgelt määratletav peaaegu kõigis transfekteerunud rakkudes (Joonis 4 c).



Joonis 4. Natiivsete LSAMP konstruktide ekspressioon SH-SY5Y rakuliinis erinevates ajapunktides. (a, b) 24 ja 48 tundi pärast transfekterimist on LSAMP lokalisatsiooni detekteerimine (valged noolepead näitavad LSAMP konstruktide üle-ekspressiooni) raskendatud, sest signaal on liiga tugev. (c) 72 tunni möödudes on konstrukte ületootvate rakkude hulk vähenenud ning valgu lokalisatsioon on märgatav pea kõigis transfekteeerunud rakkudes. (a - c) Rakutuomad on ilmestatud H33258 fluorestseeruva värviga. Mõõtlõik: 100 μ m.

2.3.2 FLAG-märgis ei riku LSAMP valgu antigeensust

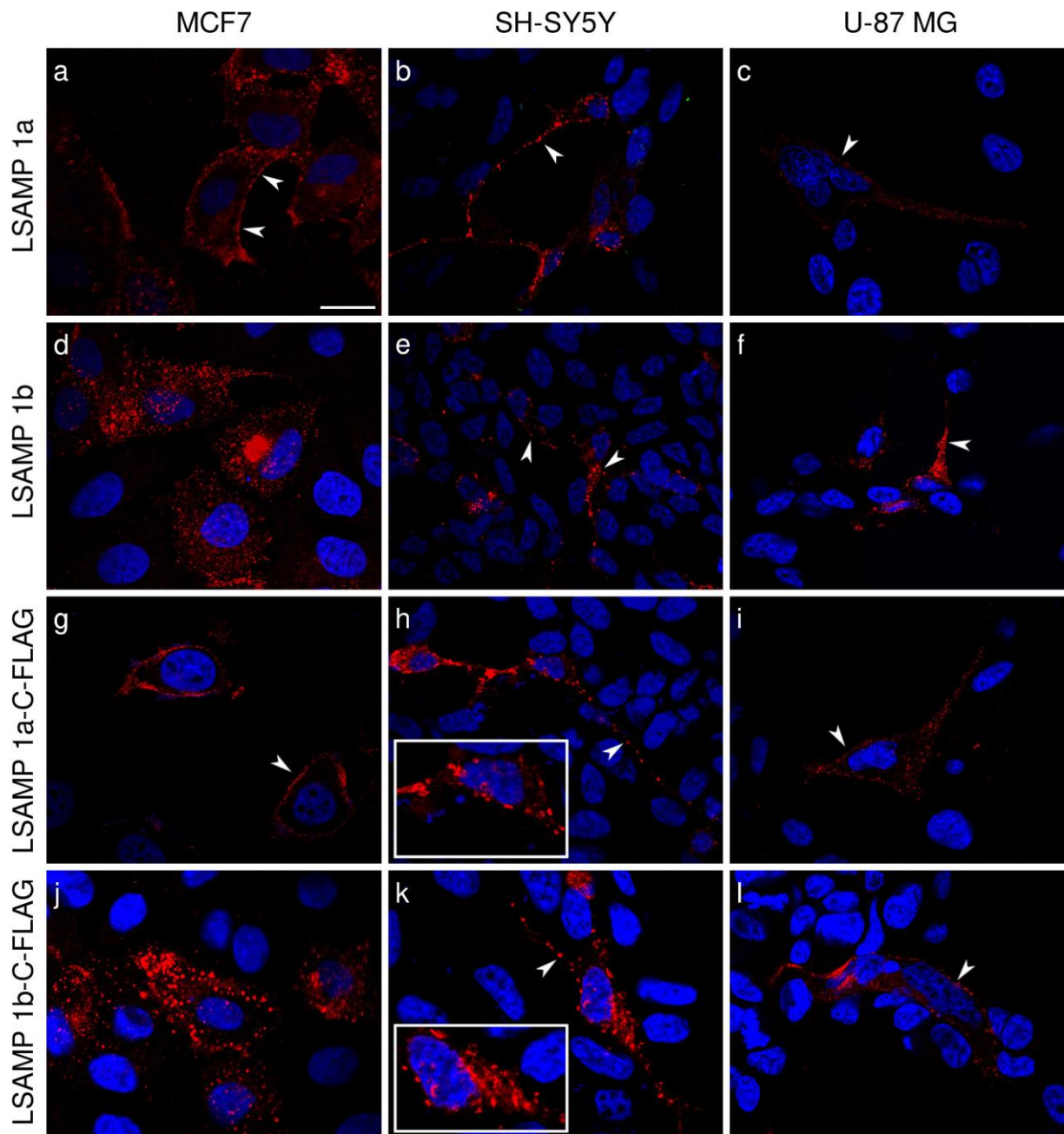
Kuna edasistes töodes oli kavas läbi viia ko-immunosadestamine ja sellele järgnev mass-spektromeetriline analüüs, siis valmistati FLAG-märgisega LSAMP liitkonstruktid (LSAMP 1a/1b-C-FLAG), mis võimaldaksid vastavaid eksperimente teostada. Esmalt kontrollisin, kas alternatiivseid esimesi eksoneid sisaldavasse LSAMP transkriptidesse viidud FLAG märgis võib rikkuda kodeeritud valgu antigeensust. Selleks transfekteeerisin SH-SY5Y rakke LSAMP 1a/1b-C-FLAG konstruktidega ning kasutasin monoklonaalset LSAMP-vastast primaarset antikeha (Joonis 5 a, b). Immuunotsütokeemilise märkimise tulemusena ilmnes, et LSAMP 1a/1b-C-FLAG valgud on ära tuntavad monoklonaalse α -LSAMP antikeha poolt (Joonis 4 ja 5). Transfekteeerunud rakkude jätketes ning rakukehades on detekteeritav LSAMP 1a/1b-C-FLAG ekspressiooni. Transfekteeerumata SH-SY5Y rakkudes on märgatav hajusalt tsitoplasmaatilistesse vesiikulitesse lokaliseerunud endogeenne LSAMP valk (Joonis 5).



Joonis 5. Endogeense LSAMP ja LSAMP-FLAG liitvalkude lokalisatsioon SH-SY5Y rakuliinis. (a) LSAMP 1a-C-FLAG ja (b) LSAMP 1b-C-FLAG lokalisatsioon (valge) transfekteerunud rakkudes (punased noolepead). (a, b) Transfekteerumata rakkudes on hajusalt märgata tsütoplasmaatilistes vesiikulitesse lokaliseerunud endogeenset LSAMP-i (valged punktid). Rakutuomad on ilmetatud H33258 fluorestseeruva värviga. Mõõtlõik: 20 µm.

2.3.3 Natiivse LSAMP 1a/1b ja FLAG märgisega liitvalkude rakuline lokalisatsioon

Järgmisena iseloomustasin immunotsütokeemilise analüüsiga LSAMP 1a/1b ja FLAG märgisega liitvalgu (LSAMP 1a/1b-C-FLAG) lokalisatsiooni sõltuvalt rakkude päritolust, kasutades selleks kolme epiteeliale morfoloogiaga rakuliini - rinnanäärme epiteeli MCF7 kasvajakke, neuroblastoomi kasvajakke SH-SY5Y ning glioblastoomi kasvajakke U-87 MG (Joonis 6). Natiivsete LSAMP 1a/1b valkude rakusisese paiknemise tuvastamisel kasutasin LSAMP-vastast antikeha (Joonis 6 a - f) ning liitvalkude puhul FLAG-vastast antikeha (Joonis 6 g - i). Katsete tulemusena selgus, et natiivse LSAMP 1a/1b ja LSAMP 1a/1b-C-FLAG lokalisatsioonimuster on sarnane. LSAMP 1a (Joonis 6 a - c) on lokaliseerunud kõigis uuritud rakuliinides diskreetsete punktidenä raku kehal ning neuroblastoomi (Joonis 6 b) ja glioblastoomi (Joonis 6 c) rakkude jätketes. Samalaadset LSAMP 1a lokalisatsioonimustrit võib märgata ka LSAMP 1a-C-FLAG liitvalgu puhul (Joonis 6 g - i). Erinevalt SH-SY5Y rakkudest (Joonis 6 b, e) puudub rinnanäärme epiteeli ja glioblastoomi rakkudest endogeenne LSAMP. Tähelepanuväärne on, et LSAMP 1a konstrukte ekspresseerivad rakud on teineteisega seotud (Joonis 6 a, b).

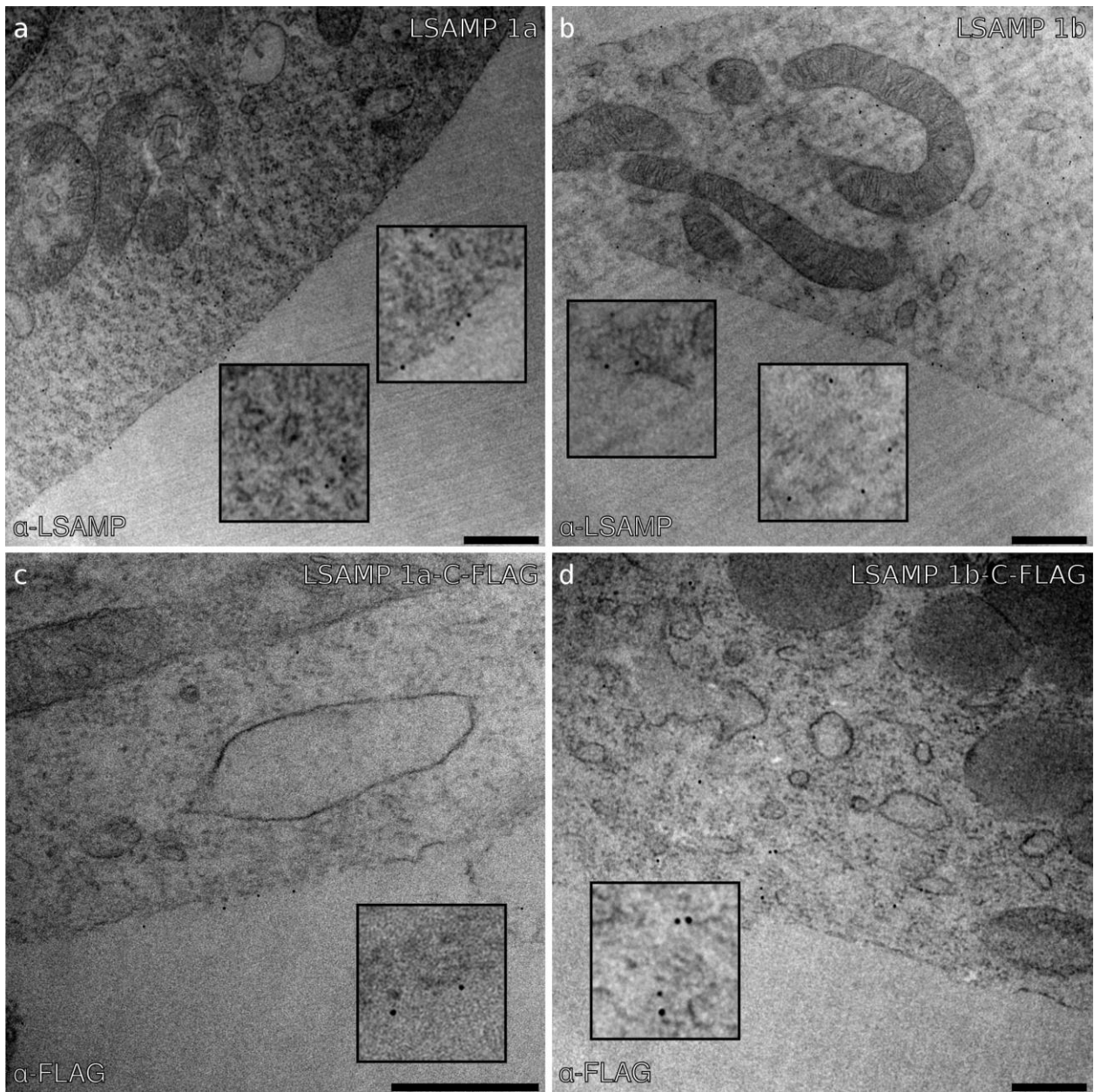


Joonis 6. Natiivsete LSAMP ja LSAMP 1a/1b-C-FLAG lokalisatsioon kolmes erinevas rakuliinis. (a - f) Natiivse LSAMP 1a/1b lokalisatsioon tuvastatud LSAMP-vastase anti kehaga ning (g - l) LSAMP 1a/1b-C-FLAG liitvalkude paiknemine FLAG-vastase anti kehaga. (a - c) LSAMP 1a ja (g - i) LSAMP 1a-C-FLAG ekspressioon rakukehades kõigis uuritud rakuliinides on sarnane. LSAMP 1a ja LSAMP 1a-C-FLAG lokalisatsioon on detekteeritav ka SH-SY5Y ja (c, i) U-87 MG rakujätketes. (d, e, k) LSAMP 1b ja (j, k, l) LSAMP 1b-C-FLAG on valdavalt detekteeritavad rakusisestes vesiikulites, mõningatel juhtudel täheldatavad ka rakukehadel ja jätketes. Rakutuomad on ilmestatud H33258 fluorestseeruva värviga. Mõõtlõik: 20 µm.

Sarnast fenomeni on näha ka LSAMP 1a-C-FLAG positiivsete rakkude puhul (Joonis 6 h). Natiivse LSAMP 1b ja LSAMP 1b-C-FLAG liitvalgu paiknemine on heterogeensem. LSAMP 1b paikneb rakusisestes vesiikulites ja on detekteeritav ka rakumembraanis (Joonis 6 d, e, f). Analoogset mustrit võib märgata LSAMP 1b-C-FLAG liitvalgu paiknemises (Joonis 6 j, k, l). Erinevalt LSAMP 1a valgukonstrukte ekspresseerivatest rakkudest ei moodusta natiivset LSAMP 1b ja liitvalgu ekspresseerivad rakud omavahel märgatavaid ühendusi.

2.3.4 LSAMP 1a/1b ja LSAMP 1a/1b-C-FLAG lokalisatsioon ultrastruktuursel tasemel

Täpsemaks LSAMP 1a/b ja LSAMP 1a/1b-C-FLAG lokalisatsiooni kirjeldamiseks vaatlesin nende paiknemist SH-SY5Y rakuliinis kasutades transmissiooni elektronmikroskoopiat. LSAMP 1a/1b lokalisatsiooni tuvastamisel kasutasin LSAMP-vastast antikeha, mis tunneb ära ka endogeense LSAMP valgu (Joonis 7 a, b). LSAMP 1a/1b-C-FLAG liitvalgu tuvastamisel kasutasin FLAG-vastast antikeha (Joonis 7 c, d). Elektronmikroskoopiline analüüs kinnitab LSAMP 1a ja LSAMP 1a-C-FLAG konstruktide paiknemist rakumembraanil (Joonis 7 a, c). Lisaks ilmneb, et uuritavad valgud paiknevad rakumembraanil saarekestena. Vähemal määral on LSAMP 1a tuvastatav ka raku sees (Joonis 7 a). LSAMP 1b ja LSAMP 1b-C-FLAG on detekteeritavad peamiselt tsütoplasmas ning membraansetes organellides (Joonis 7 b, d). Membraanset lokalisatsiooni on märgata tunduvalt harvem.



Joonis 7. LSAMP 1a/1b ja LSAMP 1a/1b-C-FLAG lokaliseerimine SH-SY5Y rakuliinis ultrastruktuursel tasemel. (a, b) Natiivse LSAMP 1a/1b lokaliseerimiseks kasutatud LSAMP-vastast antikehaga ning (c, d) LSAMP 1a/1b-C-FLAG liitvalkude lokaliseerimiseks FLAG-vastast antikehaga. (a) LSAMP 1a ja (c) LSAMP 1a-C-FLAG valgukonstruktid paiknevad rakumembraanil kobaratena. (a) Vähesel määral on LSAMP 1a detekteeritav raku tsütoplasmas. (b) LSAMP 1b ja (d) LSAMP 1b-C-FLAG on lokaliseerunud peamiselt tsütoplasmas ja membraansetes organelides. Mõõtlõik: 500 nm.

2.4. Arutelu

LSAMP geeni kahe esimese eksoni (1a ja 1b) alternatiivsetelt eksonitelt kodeeritakse erineva järjestusega signaalpeptiide (Joonis 1 ja 3). Neid signaalpeptiide kodeeriv ala on evolutsiooniliselt konserveerunud, mis võib viidata signaaljärjestuste erinevale rollile (Pimenta jt., 1995; Pimenta jt., 1996; Pimenta ja Levitt, 2004). Kuna pole selge, kuidas ja kas lõigatakse *LSAMP* valgu signaaljärjestused, pole ka teada, kas alternatiivsetelt esimestelt eksonitelt transleeritud küpsed valgud on identse järjestuse ja funktsiooniga.

Valgu funktsiooni mõistmiseks on esmalt oluline kindlaks määrata selle rakuline lokalisatsioon, mille kirjeldamisel tuleb arvestada valgu üle-ekspressioonist põhjustatud potentsiaalsete artefaktidega. Esmalt võib üle-ekspressioon tekitada oluliste toitainete ning aminohapete puuduse, mis mõjutab kogu raku metabolismi. Samuti võib küllastunud valgu eksperssioon põhjustada selle kogunemist endoplasmaatilisse retiikulumi või plasmamembraani. Halvimal juhul põhjustab liigne valgu tootmine aga rakkude surma (Glick, 1995). Üle-ekspressioonil tekkida võivate artefaktide vältimiseks vaatlesin konstruktide ekspersiooni neuroblastoomi rakkudes 24, 48 ja 72 h pärast transfekteerimist (Joonis 4). Tulemusena selgus, et 72 h peale transfekteerimist üle-ekspressiooni ei esinenud ning valgu lokalisatsioon oli määratletav peaaegu kõigis transfekteerunud rakkudes (Joonis 4c). Suure tõenäosusega on selleks ajapunktiks valku üle tootvad rakud surnud. Näha on transfekteerunud rakud, milles plasmidi koopiaarv on madalam ning sekretoorse raja kompartmendid pole üle koormatud (Joonis 4 c). Sellised rakud annavad adekvaadsema pildi valgu rakusisest paiknemisest.

Eelnevalt konstrueeritud FLAG-märgisega *LSAMP* liitkonstruktid (*LSAMP* 1a/1b-C-FLAG) võimaldavad edaspidistes eksperimentides (ko-immuunosadestamine ja sellele järgnev mass-spektromeetriline analüüs). Selleks on esmalt vaja välja selgitada, kas FLAG märgis rikub valgu antigeensust ja lokalisatsiooni (Joonis 5, Joonis 6). Neuroblastoomi kasvajakude transfektsioonil *LSAMP* 1a/1b-C-FLAG liitkonstruktidega ning immunotsütokeemilise märkimise tulemusena selgub, et anti-*LSAMP* antikeha tunneb ära FLAG-märgisega liitkonstruktid (Joonis 5 a, b). See viitab asjaolule, et liitkonstrukte modifitseeritakse sarnaselt natiivse valguga.

LSAMP 1a/1b-C-FLAG liitkonstruktid ja natiivse LSAMP 1a/1b rakusise paiknemise võrdlemisel selgub, et FLAG-märgis ei riku valgu lokalisatsiooni (Joonis 6). LSAMP konstruktid transfekterimisel neuroblastoomi, glioblastoomi ja adenokartsinoomi rakkudes selgub, et natiivne LSAMP 1a ja liitvalk (LSAMP 1a-C-FLAG) paiknevad rakumembraanil ja rakkude jätketes saarekestena (Joonis 6 a, b, c ja g, h, i). Selline paiknemise muster on iseloomulik GPI ankruga seotud membraansetele valkudele, mis on reeglina paigutatud kolesteroolirikastesse lipiidiparvedesse (Sangiorgio jt., 2004). Vähemal määral on näha paiknemist raku sees, mida kinnitab ka SH-SY5Y rakkudega teostatud immuunoelektronmikroskoopia analüüs (Joonis 7 a, c). Samuti ilmneb, et LSAMP 1a-d ekspresseerivad rakud moodustavad ühendusi teiste LSAMP 1a-d ekspresseerivate rakkudega (Joonis 6 a, b, h). See võib viidata varasemalt teadaolevale funktsioonile, kus LSAMP mõjutab sünapsite moodustumist ning neuriiitide väljakasvu (Hashimoto jt., 2009). Erinevalt LSAMP 1a-st on LSAMP 1b tuvastatav peamiselt tsütoplasmas ning membraansetes organelides (Joonis 7 b, d). Membraanset lokalisatsiooni on märgata tunduvalt harvem (Joonis 6 d, e, f ja j, k, l).

LSAMP 1a ja 1b erinev lokalisatsioon võib tuleneda erinevustest alternatiivsete signaalpeptiidide aminohappelises järjestuses. Signaalpeptiidi järjestust ennustavad andmebaasid (OCTOPUS, SPEPLip, SignalP 4.1 Server, SPdb: a signal peptide database) annavad LSAMP valgu 1a eksonilt kodeeritud signaalpeptiidi pikkuseks 23 aminohapet (MRTYWLHSVWVVGFFLSLFSLQG), 1b pikkuseks aga 28 aminohapet (MVRRVQPDRKQLPLVLLRLLCLLPTGLP). LSAMP 1a signaalpeptiidi n-regioon koosneb 7 aminohapest, hüdrofoobne h-regioon sisaldab 12 ja c-regioon 4 aminohapet. LSAMP 1b signaalpeptiidi n-regioon koosneb aga 11 aminohapest, h-regioon sisaldab sarnaselt 1a-le 12 aminohapet ning c-regiooni moodustab 5 aminohapet. Mõlema signaalpeptiidi h-regioonid on sama pikkusega ning sarnase hüdrofoobsusega (1a h-regioonis 9 hüdrofoobset aminohapet, 1b h-regioonis 10 hüdrofoobet aminohapet). Samuti on mõlema signaalpeptiidi h-regioonid leutsiini (L) rikkad (von Heijne, 1985 b). Hüdrofoobne h-regioon on hädavajalik translokatsiooni toimumiseks, samuti on see oluline signaalpeptiidi lõikamises (Cioffi jt., 1989). Kuna mõlema alternatiivse signaalpeptiidi h-regioonid on sarnased, ei lasu erineva rakusise lokalisatsiooni põhjus tõenäoliselt selles regioonis. Kuigi alternatiivsete signaalpeptiidide N-terminaalse regiooni pikkus erineb, sisaldavad need mõlemad positiivselt laetud aminohappeid ning regioon on hüdrofiilsete omadustega. See vastab kirjanduses kirjeldatud n-regioonile ning ei mõjuta taas kord suure tõenäosusega LSAMP 1a ja

1b konstruktid erinevat rakusisest paiknemist (von Heijne, 1985 a, 1985 b; von Heijne 1986). Põhjus võib peituda signaalpeptiidide C-terminaalses regioonis. Selle jaoks, et signaalpeptidaas lõikaks korrektselt signaalpeptiidi, peaksid signaalpeptiidid vastama -3,-1 reeglile: positsioonis -1 (signaalpeptiidi viimane aminohape) ja -3 peavad paiknema väikesed neutraalsed aminohapped, positsioonis -2 mahukas aromaadne aohape. Lisaks puudub enamikul signaalpeptiididel proliin (P) positsioonidest -3 kuni +1 (transleeritud valgu esimene aminohape) (von Heijne, 1990; von Heijne, 1983). LSAMP signaalpeptiid 1b sisaldab aga positsioonis -1 aminohapet proliin. Nilsson ja von Heijne näitasid, et proliin positsioonis +1 inhibeerib signaalpeptidaasi (Nilsson ja von Heijne, 1992). Proliini sisestamine signaalpeptiidi hüdrofoobsesse h-regiooni takistab aga SRP ja h-regiooni vahelisi interaktsioone ning signaalpeptiidi lõikamine on häiritud (Ryan ja Edwards, 1995). Signal Peptide Website andmebaasis leiduva 5128 eükarüootse signaalpeptiidi järjestuse analüüsil ilmneb, et vaid 0,0158%-il signaalpeptiididest paikneb proliin positsioonis -1. Üheks selliseks valgus oli interleukiin 6 (IL6). IL6 valgul esineb kaks alternatiivset signaalpeptiidi lõikesaiti, mis võivad reguleerida post-translatsioonilisi modifikatsioone. Madalama molekulmassiga IL6 vorm (23 - 25 kD) läbib O-glükosüleerimise ning suurema molekulmassiga IL6 vorm (28 - 30 kD) nii N- kui ka O-glükosüleerimise (May jt., 1991). LSAMP 1b signaalpeptiidi -1 positsioonis paiknev proliin võib häirida signaalpeptiidi lõikamist, mis omakorda võib suunata küpse valgu teistesse raku kompartmentidesse. Võib oletada, et -1 positsioonis olev proliin ei blokeeri täielikult signaalpeptiidi lõikamist ning LSAMP küpseb sarnaselt 1a eksonilt kodeeritud signaalpeptiidiga valgule.

Selleks, et teada saada, kas LSAMP 1a ja 1b isovormid on sarnaselt interleukiin 6 valgule erineva suurusega, tuleb järgnevalt läbi viia natiivse ja FLAG-märgisega LSAMP liitvalkude immuunlaigutus (*western blot* analüüs). Antud meetod aitab mõõta valkude ligikaudse molekulmassi ja annab seega ka aimu erinevatest post-translatsioonilisest modifikatsioonidest (juhul, kui need on erineva massiga). FLAG-märgisega valkude ko-immuunsadestamine ja edasine mass-spektromeetria analüüs täiendab eelnevat eksperimenti ning võimaldab määrata LSAMP valgu aminohappelise järjestuse, translatsioonijärgseid modifikatsioone ning tuvastada potentsiaalseid interaktsioonipartnereid.

KOKKUVÕTE

Käesoleva töö eesmärgiks oli välja selgitada, kas alternatiivsed N-terminaalsed signaaljärjestused (1a ja 1b) mõjutavad LSAMP valgu rakulist paiknemist. Selleks kasutasin eelnevalt kloonitud alternatiivsetelt transkriptidelt kodeerivaid natiivseid LSAMP 1a/1b ning FLAG märgisega rekombinantseid inimese LSAMP 1a/1b (LSAMP 1a/1b-C-FLAG) järjestusi. Konstruktide tranfektsioonile järgnenud immunofluorestsents ja elektronmikroskoopiliste analüüside tulemusena selgus:

- LSAMP 1a/1b-C-FLAG liitvalkude epitoop on ära tuntav anti-LSAMP antikeha poolt ning liitvalkude lokalisatsioon matkib natiivsete LSAMP 1a/1b valkude paiknemist;
- LSAMP 1a on paikneb peamiselt plasmamembraanil;
- LSAMP 1b lokalitseerub tsütoplasmaatilistesse vesiikulitesse ning vähemal määral rakumembraanile.

Localization of human LSAMP protein harboring alternative N-terminal signal sequences

Liisi Tarve

SUMMARY

The limbic system-associated membrane protein (LSAMP) is a founding member of neural adhesion protein family called IgLON. The *LSAMP* gene encodes a 64- to 68-kDa glycoprotein which is characterized by three immunoglobulin (Ig) domains. LSAMP is expressed on the surface of somata and dendrites of neurons in cortical regions of the limbic system which are involved in mediating cognitive and emotional behaviours. In the development of neuronal circuits LSAMP has been shown to assist neuronal migration, neurite outgrowth, axon guidance and synaptic development. Imbalance in the expression of LSAMP generates profound effects on behavioural parameters (anxiety and social interactions) in mice. Polymorphisms in the human *LSAMP* gene have been associated with neuropsychiatric disorders like schizophrenia, panic disorder and suicidal behaviour. Furthermore, the levels of the LSAMP protein have been found to be increased by 20% in frontal cortex in patients with schizophrenia and bipolar disorder.

The genomic structure of *LSAMP* gene is evolutionarily conserved harboring two first exons and promoters (1a and 1b). Translated LSAMP from alternative first exons differ only in signal peptide coding sequence. Alternative promoters are active in different and often complementary brain regions: 1a is active in limbic structures whereas 1b is expressed in sensory cortex and nuclei. Evolutionary conservation suggests that these N-terminal signal peptides may have functionally different roles.

The aim of this thesis is to find out whether alternative N-terminal signal sequences of LSAMP alters the cellular localization of the mature protein. In the interest of understanding the function of alternative LSAMP N-terminal signal sequences (1a and 1b) I used previously cloned native LSAMP 1a/1b and LSAMP 1a/1b fusion constructs with FLAG-tag. Immunocytochemistry on transfected cells (adenocarcinoma, neuroblastoma and glioblastoma cell-line) reveals that the localization of native LSAMP 1a is concentrated as patches on the plasma membrane, frequently interconnecting LSAMP 1a expressing cells, whereas native LSAMP 1b is mostly seen in cytoplasmic vesicles. The immuno-electron microscopic analysis of transfected neuroblastoma

cells confirms differential expression of native LSAMP 1a and 1b proteins. In addition, the epitope of LSAMP-FLAG fusion constructs is recognized by anti-LSAMP antibody and the localization of LSAMP 1a/1b-C-FLAG fusion constructs mimic the localization of native LSAMP 1a/1b protein. Subsequent co-immunoprecipitation of LSAMP fusion proteins and further mass-spectral analyses will determine whether LSAMP 1a and 1b will differ in protein sequence and posttranslational modifications. Moreover, it will be essential in order to unravel novel interaction partners for LSAMP.

TÄNUSÕNAD

Täna väga oma juhendajaid Kersti Lillevälja ja Tambet Tõnissood igakülgse abi, toetuse ja nõuannete eest.

Väga suured tänud minu kaasjuhendajale Toomas Jagomäele, kes abistas ja juhendas mind töö valmimise igas etapis.

Eriliselt pean tänama Kattri-Liis Esklat, kes aitas mind alati kogu oma jõu ja nõuga.

KIRJANDUSE LOETELU

Akeel, M., McNamee, C. J., Youssef, S., & Moss, D. (2011). DIgLONs inhibit initiation of neurite outgrowth from forebrain neurons via an IgLON-containing receptor complex. *Brain Research*, 1374, 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.12.028>

Barøy, T., Kresse, S. H., Skårn, M., Stabell, M., Castro, R., Lauvrak, S., ... Meza-Zepeda, L. a. (2014). Reexpression of LSAMP inhibits tumor growth in a preclinical osteosarcoma model. *Molecular Cancer*, 13, 93. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-13-93>

Behan A.T., Byrne, C., Dunn, M. J., Cagney, G., & Cotter, D. R. (2009). Proteomic analysis of membrane microdomain-associated proteins in the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia and bipolar disorder reveals alterations in LAMP, STXBP1 and BASP1 protein expression. *Mol Psychiatry*, 14(6), 601–661

Brümmendorf, T., Spaltmann, F., & Treuber, U. (1997). Cloning and characterization of neural cell recognition molecule on axons of the retinotectal system and spinal cord. *European Journal of Neuroscience*, 9(6), 1105-1116.

Chen, J., Lui, W.-O., Vos, M. D., Clark, G. J., Takahashi, M., Schoumans, J., ... Teh, B. T. (2003) The t(1;3) breakpoint-spanning genes LSAMP and NORE1 are involved in clear cell renal cell carcinomas. *Cancer Cell*, 4(5), 405-413.

Cioffi, J. A., Allen, K. L., Lively, M. O., & Kemper, B. (1989). Parallel effects of signal peptide hydrophobic core modifications on co-translational translocation and post-translational cleavage by purified signal peptidase. *Journal of Biological Chemistry*, 264(25), 15052–15058.

Cui, Y., Ying, Y., van Hasselt, A., Ng K. M., Yu, J., Zhang, Q., ... Tao, G. (2008). OPCML is broad tumor suppressor for multiple carcinomas and lymphomas with frequently epigenetic inactivation. *PLoS ONE* 3:e2990. [10.1371/journal.pone.0002990](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002990)

Davis, M. J., Hanson, K. A., Clark, F., Fink, J. L., Zhang, F., Kasukawa, T., ... Teasdale, R. D. (2006). Differential use of signal peptides and membrane domains is a common occurrence in the

protein output of transcriptional units. *PLoS Genetics*, 2(4), 554–563. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020046>

Eagleson, K. L., Pimenta, A. F., Burns, M. M., Fairfull, L. D., Cornuet, P. K., 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(3), 725–740. [https://doi.org/10.1016/S1044-7431\(03\)00237-9](https://doi.org/10.1016/S1044-7431(03)00237-9)

Elks, C. E., Loos, R. J., Hardy, R., Wills, A. K., Wong, A., Wareham, N. J., ... Ong, K. K. (2012). Adult obesity susceptibility variants are associated with greater childhood weight gain and a faster tempo of growth: the 1946 British Birth Cohort Study. *Am. J. Clin. Nutr.* 95, 1150–1156. [10.3945/ajcn.111.027870](https://doi.org/10.3945/ajcn.111.027870)

Funatsu, N., Miyata, S., Kumanogoh, H., Shigeta, M., Hamada, K., Endo, Y., ... Maekawa, S. (1999). Characterization of a novel rat brain glycosylphosphatidylinositol- anchored protein (Kilon), a member of the IgLON cell adhesion molecule family. *Journal of Biological Chemistry*, 274(12), 8224–8230. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.12.8224>

Gil, O. D., Zhang, L., Chen, S., Ren, Y. Q., Pimenta, A., Zanazzi, G., ... Salzer, J. L. (2002). Complementary expression and heterophilic interactions between IgLON family members neurotrimin and LAMP. *Journal of Neurobiology*, 51(3), 190–204. <https://doi.org/10.1002/neu.10050>

Gilbert, A., Lehmann, M., Wiesner, B. & Schüle, R. (2017). The monomer/homodimer equilibrium of G protein-coupled receptors: formation in the secretory pathway and potential functional significance. *G-Protein-Coupled Receptor Dimers*, 33, 359-384.

Gilmore, R., Walter, P., & Blobel, G. (1982). Protein translocation across the endoplasmic reticulum. II. Isolation and characterization of the signal recognition particle receptor. *The Journal of Cell Biology*, 95(2 Pt 1), 470–477. <https://doi.org/10.1083/jcb.95.2.470>

Glick, B. R. (1995). Metabolic load and heterogenous gene expression. *Biotechnology Advances*, 13(2), 247–261. [https://doi.org/10.1016/0734-9750\(95\)00004-A](https://doi.org/10.1016/0734-9750(95)00004-A)

Hashimoto, T.h, Maekawa, S., & Miyata, S. (2009). IgLON cell adhesion molecules regulate synaptogenesis in hippocampal neurons. *Cell Biochemistry and Function*, 27, 496–498. <https://doi.org/10.1002/cbf>

von Heijne, G. (1986). A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Research*, 14(11), 4453–4469.

von Heijne, G. (1998). Life and death of a signal peptide. *Reviews in Neurological Diseases*, 7(1), 111–113. <https://doi.org/10.1111/dom.12265>

Horton, H. L., & Levitt, P. (1988). A unique membrane protein is expressed on early developing limbic system axons and cortical targets. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 8(12), 4653–4661.

Hotta, K., Kitamoto, T., Kitamoto, A., Mizusawa, S., Matsuo, T., Nakata, Y., ... Sekine, A. (2011). Association of variations in the FTO, SCG3 and MTMR9 genes with metabolic syndrome in a Japanese population. *J. Hum. Genet.* 56, 647–651.

Hyde, C. L., Nagle, M. W., Tian, C., Chen, X., Paciga, S. A., Wendland, J. R., ... Winslow, A. R. (2016). Identification of 15 genetic loci associated with risk of major depression in individuals of European descent. *Nat. Genet.* 48, 1031–1036.

Innos, J., Koido, K., Philips, M.-A., & Vasar, E. (2013). Limbic system associated membrane protein as a potential target for neuropsychiatric disorders. *Frontiers in Pharmacology*, 32. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00032>

Innos, J., Philips, M. a., Leidmaa, E., Heinla, I., Raud, S., Reemann, P., ... Vasar, E. (2011). Lower anxiety and a decrease in agonistic behaviour in *Lsamp*-deficient mice. *Behavioural Brain Research*, 217(1), 21–31. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.09.019>

Innos, J., Philips, M.-A., Raud, S., Lilleväli, K., Kõks, S., & Vasar, E. (2012). Deletion of the *Lsamp* gene lowers sensitivity to stressful environmental manipulations in mice. *Behavioural Brain Research*, 228(1), 74–81. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.11.033>

Itoh, S., Hachisuka, A., Kawasaki, N., Hashii, N., Teshima, R., Hayakawa, T., ... Yamaguchi, T. (2008). Glycosylation analysis of IgLON family proteins in rat brain by liquid chromatography

and multiple-stage mass spectrometry. *Biochemistry*, 47(38), 10132–10154. <https://doi.org/10.1021/bi8009778>

Kapp, K., Schrempf, S., Lemberg, M. K. & Dobberstein, B. (2009). Post-targeting functions of signal peptides. *Landes Bioscience*, 2000-2003.

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

Koido, K., Traks, T., Balõšev, R., Eller, T., Must, A., Koks, S., ... Vasar, E. (2012). Associations between LSAMP gene polymorphisms and major depressive disorder and panic disorder. *Translational Psychiatry*, 2(July), e152. <https://doi.org/10.1038/tp.2012.74>

Koido, K., Janno, S., Traks, T., Parksepp, M., Ljubajev, Ü., Veiksaar, P., ... Vasar, E. (2014). Associations between polymorphisms of LSAMP gene and schizophrenia. *Psychiatry Research*, 215(3), 797–798. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2014.01.016>

Kuenzel, E. A., Mulligan, J. A., Sommercorn, J., & Krebs, E. G. (1987). Substrate specificity determinants for casein kinase II as deduced from studies with synthetic peptides. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(19), 9136–9140.

Kurys, G., Tagaya, Y., Bamford, R., Hanover, J. A., & Waldmann, T. A. (2000). The Long Signal Peptide Isoform and Its Alternative Processing Direct the Intracellular Trafficking of Interleukin-15. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(39), 30653–30659. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002373200>

Lemberg, M. K., Bland, F. A., Weihofen, A., Braud, V. M., & Martoglio, B. (2001). Intramembrane Proteolysis of Signal Peptides: An Essential Step in the Generation of HLA-E Epitopes. *The Journal of Immunology*, 167(11), 6441–6446. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.11.6441>

Leyboldt F., Armangue T., Dalmau J. (2015). Autoimmune encephalopathies. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1338, 94–114. [10.1111/nyas.12553](https://doi.org/10.1111/nyas.12553)

- Low, M. G. (1989). The glycosyl-phosphatidylinositol anchor of membrane proteins. *BBA - Reviews on Biomembranes*, 988(3), 427–454. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(89\)90014-2](https://doi.org/10.1016/0304-4157(89)90014-2)
- Lyko, F., Martoglio, B., Jungnickel, B., Rapoport, T. A., & Dobberstein, B. (1995). Signal sequence processing in rough microsomes. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.34.19873>
- Martoglio, B., & Dobberstein, B. (1998). Signal sequences: More than just greasy peptides. *Trends in Cell Biology*, 8(10), 410–415. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(98\)01360-9](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(98)01360-9)
- May, L. T., Shaw, J. E., Khanna, A. K., Zabriskie, J. B., & Sehgal, P. B. (1991). Marked cell-type-specific differences in glycosylation of human interleukin-6. *Cytokine*, 3(3), 204–211. [https://doi.org/10.1016/1043-4666\(91\)90018-9](https://doi.org/10.1016/1043-4666(91)90018-9)
- McKie, A. B., Vaughan, S., Zanini, E., Okon, I. S., Louis, L., de Sousa, C., ... Gabra, H. (2012). The OPCML tumor suppressor functions as a cell surface repressor–adaptor, negatively regulating receptor tyrosine kinases in epithelial ovarian cancer. *Cancer Discov.* 2, 156–171. [10.1158/2159-8290.CD-11-0256](https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-11-0256)
- McNamee, C. J., Youssef, S., & Moss, D. (2011). IgLONs form heterodimeric complexes on forebrain neurons. *Cell Biochemistry and Function*, 29(2), 114–119. <https://doi.org/10.1002/cbf.1730>
- Meyer, D. I., Krause, E., & Dobberstein, B. (1982). Secretory protein translocation across membranes - The role of the “docking protein”. *Nature*, 297(5868), 647–650. <https://doi.org/10.1038/297647a0>
- Melén, E., Himes, B. E., Brehm, J. M., Boutaoui, N., Klanderma, B. J., Sylvia, J. S., Lasky-Su, J. (2010). Analyses of shared genetic factors between asthma and obesity in children. *J. Allergy Clin. Immunol.* 126, 631–637. [10.1016/j.jaci.2010.06.030](https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.06.030)
- Must, A., Tasa, G., Lang, A., Vasar, E., Kõks, S., Maron, E., & Väli, M. (2008). Association of limbic system-associated membrane protein (LSAMP) to male completed suicide. *BMC Medical Genetics*, 9, 1–6. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-9-34>

- Nilsson, I. & von Heijne, G. (1992). A signal peptide with a proline next to the cleavage site inhibits leader peptidase when present in a sec-independent protein. *Federation of European Biochemical Societies*, 299(3), 243-246.
- 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. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-2388>
- Pan, Y., Wang, K. S., & Aragam, N. (2011). NTM and NR3C2 polymorphisms influencing intelligence: family-based association studies. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 35, 154–160. [10.1016/j.pnpbp.2010.10.016](https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.10.016)
- Paulick, M. G., & Bertozzi, C. R. (2008). The Glycosylphosphatidylinositol Anchor: A Complex Membrane-Anchoring Structure for Proteins. *Biochemistry*, 47(27), 6991–7000.
- Philips, M. A., Lilleväli, K., Heinla, I., Luuk, H., Hundahl, C. A., Kongi, K., ... Vasar, E. (2014). Lsamp is implicated in the regulation of emotional and social behavior by use of alternative promoters in the brain. *Brain Structure and Function*, 1381–1393. <https://doi.org/10.1007/s00429-014-0732-x>
- Pimenta, A. F., Fischer, I., & Levitt, P. (1996). cDNA cloning and structural analysis of the human limbic-system-associated membrane protein (LAMP). *Gene*, 170(2), 189–195. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(96\)84698-1](https://doi.org/10.1016/0378-1119(96)84698-1)
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2003.11.013>
- Pimenta A. F., Zhukareva V., Barbe M. F., Reinoso B. S., Grimley C., Henzel W., ... 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. [10.1016/0896-6273\(95\)90034-9](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90034-9)

- Poveda A., Ibáñez M. E., & Rebato E. (2014). Common variants in BDNF, FAIM2, FTO, MC4R, NEGR1, and SH2B1 show association with obesity related variables in Spanish Roma population. *Am. J. Hum. Biol.* 26, 660–669. [10.1002/ajhb.22576](https://doi.org/10.1002/ajhb.22576)
- 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. *Journal of Cell Science*, 117(Pt 17), 3961–3973. <https://doi.org/10.1242/jcs.01261>
- Ryan, P., & Edwards, C. O. (1995). Systematic introduction of proline in a eukaryotic signal sequence suggests asymmetry within the hydrophobic core. *Journal of Biological Chemistry*, 270(46), 27876–27879. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.46.27876>
- Sabater, L., Gaig, C., Gelpi, E., Bataller, L., Lewerenz, J., Torres-Vega, E., ... Graus, F. (2014). A novel non-rapid-eye movement and rapid-eye-movement parasomnia with sleep breathing disorder associated with antibodies to IgLON5: A case series, characterisation of the antigen, and post-mortem study. *The Lancet Neurology*, 13(6), 575–586. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70051-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70051-1)
- Sangiorgio, V., Pitto, M., Palestini, P., & Masserini, M. (2004). GPI-anchored proteins and lipid rafts. *Ital J Biochem.* 53(2), 98-111.
- 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(7), 4330–4342. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.628438>
- Schofield, P. R., McFarland, K. C., Hayflick, J. S., Wilcox, J. N., Cho, T. M., Roy, S., ... 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(2), 489–495.
- Sellar, G. C., Watt, K. P., Rabiasz, G. J., Stronach, E. A., Li, L., Miller, E. P., ... Gabara, H. (2003). OPCML at 11q25 is epigenetically inactivated and has tumor-suppressor function in epithelial ovarian cancer. *Nature Genetics*, 34(3), 337-343.

- Sharma, K., Schmitt, S., Bergner, C. G., Tyanova, S., Kannaiyan, N., Manrique-Hoyos, N., ... Simons, M. (2015). Cell type- and brain region-resolved mouse brain proteome. *Nature Neuroscience*, 18(12), 1819–1831. <https://doi.org/10.1038/nn.4160>
- Singh, K., Lilleväli, K., Gilbert, S. F., Bregin, A., Narvik, J., Jayaram, M., ... Philips, M. A. (2018). The combined impact of IgLON family proteins Lsamp and Neurotrimin on developing neurons and behavioral profiles in mouse. *Brain Research Bulletin*, 140(March), 5–18. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.03.013>
- Struyk, a F., Canoll, P. D., Wolfgang, M. J., Rosen, C. L., D'Eustachio, P., & Salzer, J. L. (1995). Cloning of neurotrimin defines a new subfamily of differentially expressed neural cell adhesion molecules. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 15(3 Pt 2), 2141–2156.
- Sugimoto, C., Maekawa, S., & Miyata, S. (2010). OBCAM, an immunoglobulin superfamily cell adhesion molecule, regulates morphology and proliferation of cerebral astrocytes. *Journal of Neurochemistry*, 112(3), 818–828. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06513.x>
- Tagaya, Y., Kurys, G., Thies, T. A., Losi, J. M., & Azimi, N. (1997). Generation of Secretable and Nonsecretable Interleukin 15 Isoforms through Alternate Usage of Signal Peptides. *PNAS*, 94(26), 14444–14449. <https://doi.org/10.1086/330282>
- Vanaveski, T., Singh, K., Narvik, J., Eskla, K. L., Visnapuu, T., Heinla, I., ... Vasar, E. (2017). Promoter-Specific expression and genomic structure of Iglon family genes in mouse. *Frontiers in Neuroscience*, 11(February), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00038>
- von Heijne, G. (1983). Amino Acids near Signal-Sequence Cleavage Sites. *Eur. J. Biochem*, 21, 17–21.
- von Heijne, G. (1985 a). Structural and Thermodynamic Aspects of Transfer of Proteins into and across Membranes. *Current Topics in Membranes and Transport*, 24, 151–179.
- von Heijne, G. (1985 b). Signal sequences. The limits of variation. *Journal of Molecular Biology*, 184(1), 99–105. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(85\)90046-4](https://doi.org/10.1016/0022-2836(85)90046-4)

von Heijne, G. (1990). The Signal peptide. *J Membr Biol*, 115, 195–201.
<https://doi.org/10.1007/bf01868635>

Walter, P. (1994). Signal Sequence Recognition and Protein Targeting To the Membrane. *Annual Review of Biochemistry*, 10, 87–119.

Walter, P., & Lingappa, V. R. (1986). Mechanism of protein translocation across the endoplasmic reticulum membrane. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 2(1), 499–516.

Wang, L., Hauser, E. R., Shah, S. H., Seo, D., Sivashanmugan, P., Exum, S. T., ... Vantse, J. M. (2008). Polymorphisms of the tumor suppressor gene LSAMP are associated with left main coronary artery disease. *Annal of human genetics*, 72(4), 443-453.

Williams, A. F., & Barclay, A. N. (1988). The Immunoglobulin Superfamily—Domains for Cell Surface Recognition. *Annual Review of Immunology*, 6(1), 381–405.
<https://doi.org/10.1146/annurev.iy.06.040188.002121>

Woodgett, J. R., Gould, K. L., & Hunter, T. (1986). Substrate specificity of protein kinase C: Use of synthetic peptides corresponding to physiological sites as probes for substrate recognition requirements. *European Journal of Biochemistry*, 161(1), 177–184.
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1986.tb10139.x>

Zacco, A., Cooper, V., Chantler, P. D., & Horton, L. (1990). Isolation, Biochemical Characterization and Ultrastructural Analysis of the Limbic System-Associated Membrane Protein (LAMP), Protein Expressed by Neurons Comprising Functional Neural Circuits. *The Journal of Neuroscience*, 73–90.

KASUTATUD VEEBIAADDRESSID

<http://signalpeptide.de/> 22.05.2018

<http://octopus.cbr.su.se/> 25.05.2018

http://gpcr.biocomp.unibo.it/cgi/predictors/spep/pred_spepcgi.cgi 25.05.2018

<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> 25.05.2018

<http://proline.bic.nus.edu.sg/spdb/index.html> 25.05.2018

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Liisi Tarve

(sünnikuupäev: 12.05.1991)

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

Alternatiivseid signaalpeptiide omava LSAMP valgu rakulisest lokalisatsioonist

mille juhendajad on Kersti Lilleväli, Tambet Tõnissoo ja Toomas Jagomäe,

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 28.08.2019 kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

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

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

Tartus, 28.05.2017