

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

TARTU ÜLIKOOL
MEDITSIINITEADUSTE VALDKOND
BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT
FÜSIOLOOGIA OSAKOND

MHC I rajas osalevate geenide ekspressiooni võrdlusuuring 129Sv ja B16 hiirte erinevates ajustruktuurides lipopolüsahhariidi poolt indutseeritud neuroinflammatoorses mudelis

Magistritöö biomeditsiinis

30 EAP

Johanna Liis Udumets

Juhendaja Maria Piirsalu, MSc

TARTU 2021

MHC I rajas osalevate geenide ekspressiooni võrdlusuuring 129Sv ja B16 hiirte erinevates ajustruktuurides lipopolüsahhariidi poolt indutseeritud neuroinflammatoorses mudelis

129S6/SvEvTac ja C57BL/6Ntac on transgeensete hiirte loomisel enim kasutatavad hiireliinid. Nad erinevad teineteisest nii käitumuslike kui ka geneetiliste iseärasuste tõttu. Samuti on täheldatud erinevust nende immuunvastuses. Näiteks on nende toimetulek gripiviirusega erinev. 129S6/SvEvTac hiired on tundlikumad gripiviiruse poolt põhjustatud infektsioonile, põhjustades mitmeid kliinilisi sümptomeid, samas kui C57BL/6Ntac on parema vastupanuvõimega. Nende immuunsüsteemis esinevaid erinevusi on vähe uuritud. Antud magistritöös uuritakse MHC I raja geenide ekspressiooni kahe hiireliini, 129S6/SvEvTac ja C57BL/6Ntac, erinevates ajukudedes kasutades lipopolüsahhariidi poolt indutseeritud põletikumudelit.

CERCS kood: B360 Loomafüsioloogia, B470 Füsioloogia, B640 Neuroloogia, neuropsühholoogia, neurofüsioloogia

Märksõnad: Närvipõletik, ajukude, 129S6/SvEvTac ja C57BL/6NTac hiireliinid, lipopolüsahhariid, MHC I

Comparative study of the expression of genes involved in MHC I in different brain structures of 129Sv and B16 mice in a lipopolysaccharide-induced neuroinflammatory model

129S6/SvEvTac and C57BL/6Ntac are the most commonly used mouse lines for generating transgenic mice. They differ from each other in both behavioural and genetic characteristics. In addition, differences in their immune response have been observed as well. For example, their way of responding to the influenza virus varies. C57BL/6Ntac has better resistance than 129S6/SvEvTac. However, differences in the immune system of these mouse lines have only been briefly studied. This master's thesis surveys the expression of MHC I pathway genes in the aforementioned mouse lines in different brain areas using a lipopolysaccharide-induced inflammation model.

CERCS: B360 Animal physiology, B470 Physiology, B640 Neurology, neuropsychology, neurophysiology

Keywords: Neuroinflammation, brain tissue, 129S6/SvEvTac and C57BL/6NTac mouse lines, lipopolysaccharide, MHC I

SISUKORD

SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	9
1.1 Inbriiditud hiireliinid	9
1.1.1. C57BL/6NTac ja 129S6/SvEvTac hiireliinid.....	10
1.2 Neuroinflammatsioon	12
1.2.1. Mikroglia	13
1.2.2. Lipopolüsahhariid.....	15
1.2.3. MHC I rada.....	17
2. EKSPERIMENTAALOSA	20
2.1 Töö eesmärgid	20
2.2 Materjalid ja meetodika.....	20
2.2.1. Kasutatud katseloomad.....	20
2.2.2. Lipopolüsahhariidi manustamine	21
2.2.2. Katseloomade kaal ja temperatuur	21
2.2.3. Ajustruktuuride prepareerimine.....	21
2.2.4. RNA eraldamine	21
2.2.5. cDNA süntees	22
2.2.6. Kvantitatiivne reaalaaja PCR	22
2.2.7. Statistiline analüüs	25
2.3 Tulemused	25
2.3.1. LPS-i mõju kehakaalule.....	26
2.3.2. LPS-i mõju kehatemperatuurile.....	27

2.3.3. MHC I raja geenide ekspressioon haistesibulas	27
2.3.4. MHC I raja geenide ekspressioon hipokampuses	30
2.3.5. MHC I raja geenide ekspressioon väikeajus.....	32
2.3.4. MHC I raja geenide ekspressioon keskajus	34
2.4 Arutelu	36
TÄNUSÕNAD	39
KOKKUVÕTE	40
KASUTATUD KIRJANDUS.....	42
LIHTLITSENTS	52

KASUTATUD LÜHENDID

$\beta 2m$	beeta2-mikroglobuliin (<i>beta2-microglobulin</i>)
129Sv	129S6/Svev/Tac
APC	antigeeni esitav rakk (<i>antigen presenting cell</i>)
BBB	hematoentsefaalbarjäär (<i>blood-brain barrier</i>)
B16	C57BL/6Ntac
CD-14	diferentseerumisklaster 14 (cluster of differentiation)
DAMP	koekahjustustega seotud molekulaarsed mustrid (<i>damage-associated molecular patterns</i>)
<i>Disc-1</i>	<i>Disrupted in schizophrenia 1</i>
ER	endoplasmaatiline retiikulum (<i>endoplasmic reticulum</i>)
GPI	glükosüülfosfatidüülinositol (glycosylphosphatidylinositol)
H2	koesobivuse lookus (<i>tissue compatibility locus</i>)
HLA-A	inimese leukotsüüdi antigeen A (<i>human leukocyte antigen A</i>)
HLA-B	inimese leukotsüüdi antigeen B (<i>human leukocyte antigen B</i>)
HLA-C	inimese leukotsüüdi antigeen C (<i>human leukocyte antigen C</i>)
<i>Hprt</i>	hüpoksantiin-guaaniin fosforibosüültransferaas (<i>hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase</i>)
IL-1	Interleukiin 1 (<i>interleukin. 1</i>)
IL-4	Interleukiin 4 (<i>interleukin 4</i>)
IL-10	Interleukiin 10 (<i>interleukin 10</i>)
IRF-3	transkriptsioonifaktor (<i>interferon response factor</i>)
LBP	lipopolüsahhariidi siduv valk (<i>Lipopolysaccharide binding protein</i>)
LPS	lipopolüsahhariid (<i>lipopolysaccharide</i>)
MD-2	mediaatorvalk (<i>myeloid Differentiation factor 2</i>)
MHC I	peamine koesobivuskompleks I (<i>major histocompatibility complex I</i>)

NF- κ b	transkriptsioonifaktor (<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>)
NK	naturaalne killer (<i>natural killer</i>)
PAMP	patogeenseoselised molekulaarsed mustrid (<i>pathogen-associated molecular patterns</i>)
ROS	reaktiivsed hapnikuosakesed (<i>reactive oxygen species</i>)
RT-qRCP	pöördtranskriptsiooni kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon (<i>reverse transcription quantitative polymerase chain reaction</i>)
SEM	standardviga (<i>standard error of the mean</i>)
TAP	transporterkompleks (<i>transporter-associated with antigene processing</i>)
<i>TapBp</i>	tapasiini kodeeriv geen (<i>TAP Binding Protein</i>)
TCR	T-raku retseptor (<i>T-cell receptor</i>)
TLR4	Tolli-laadne retseptor 4 (<i>toll-like receptor</i>)
TNF- α	tuumor-nekroosi faktor alfa (<i>tumor necrosis factor alpha</i>)

SISSEJUHATUS

Neuroinflammatsioon esineb mitmetes erinevates neuroloogilistes haigustes. Näiteks on depressioonipatsientidel leitud kõrgeenenud põletikutsütokiinide tase (Himmerich et al., 2019). Samuti on leitud seoseid Parkinsoni, Alzhaimeri, Huntingtoni tõve ning põletiku vahel (Niranjan, 2018). Kuigi põletikku on seostatud mitmete haigustega, on siiski vähe teada mehhanismidest nende taga. Suure hulga põletikuliste faktorite kuhjumisel ajusse läbi hematoentsefaalbarjääri (BBB) viib neuroinflammatsiooni tekkeni. (Banks et al., 2015) Samuti seostatakse neuroinflammatsiooni tekkimist oksüdatiivse stressiga (Agostinho et al., 2010).

Teaduslaborites kasutatakse tihti erinevate uuringute läbiviimiseks hiireliine C57BL/6NTac (Bl6) ja 129S6/SvEv/Tac (129Sv). Need hiired erinevad üksteisest nii geneetiliselt kui ka käitumuslike iseärasuste tõttu. Bl6 hiiri peetakse vähem ärevaks ja kehaliselt aktiivsemaks, samas kui 129Sv loetakse pigem ärevaks ja kehaliselt vähemaktiivseks. (Abramov et al., 2008) Lisaks on neil erinev vastupanuvõime patogeenidele. Gripiviiruse puhul tekib 129Sv hiirtel tugev põletikutsütokiinide vastus ning nad võivad infektsiooni tõttu surra, seevastu Bl6 hiirtel on põletikuliste tsütokiinide vastus pigem tagasihoidlik ja loomad saavad nakkusega tõhusalt hakkama (Davidson et al., 2014).

Varasemalt on Tartu Ülikooli füsioloogia osakonna uuringutes näidatud erinevusi ka nende liinide metaboolses profiilis, kus gram-negatiivse bakteri toksiini, lipopolüsahhariidi (LPS), manustamise järgselt Bl6 hiired reageerisid tugeva hüpometaaboolse reaktsiooniga, mis 129Sv puhul oli puudulikult väljendunud (Piirsalu et al., 2020). Hüpometaaboolne seisund on oluline energia säästmiseks põletikulistes tingimustes. Põletikuline reaktsioon on energeetiliselt kallis ja nõuab immuunaktivatsiooni toetamiseks toitainete ümberjaotumist. (Ganeshan ja Chawla, 2014) Hüpometaaboolne vastus suurendab kudede tolerantsust bakterite põhjustatud infektsioonidele (Ganeshan et al., 2019).

Käesolevas magistritöös on vaatluse all koosobivuskompleks klass I (MHC I) rajas osalevad geenid. Kirjanduse ülevaade keskendub Bl6 ja 129Sv iseärasuste ja neuroinflammatsiooniga seotud mehhanismide lahti seletamisele. Eksperimentaalse osa eesmärgiks oli võrrelda erinevusi MHC I rajaga seotud geenide (*TapBp* ehk tapasiini kodeeriv geen, $\beta 2m$, *Tap1*, *Tap2*,

Lmp2, *Lmp7* ja *Lmp10*) ekspressionis Bl6 ja 129Sv hiirte erinevates ajuosades peale LPSi poolt indutseeritud põletikku. Selleks kasutati kvantitatiivset reaalaja PCR (qRT-PCR) meetodit.

Antud magistritöö valmis Tartu Ülikooli molekulaar-ja rakubioloogia instituudi biomeditsiini õppekava raames. Eksperimentaalne osa viidi läbi Tartu Ülikooli meditsiiniteaduste valdkonna Bio- ja siirdemeditsiini instituudis, Füsioloogia osakonnas.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Inbriiditud hiireliinid

Biomeditsiinilistes uuringutes on hiirte kui mudelorganismide kasutamine laialdaselt levinud. Selleks kasutatakse üldjuhul *inbriiditud* ehk sugulusaretuse teel saadud hiireliine, kes omavad palju eeliseid võrreldes *outbriiditud* hiirtega. (Lutz et al., 2012) *Outbriiditud* hiirte populatsioonis esineb suur mitmekesisus kuna nad on väga heterosügootsed (Chia et al., 2005). Sugulusaretuse teel saadud hiireliinide eeliseks on nende fenotüübiline ja geneetiline samasus ning see, et neid liine on eelnevates uuringutes juba palju kirjeldatud. Seega on teada kuidas mingi hiireliin reageerib teatud katsetele, millised on nende spetsiifilised omadused ning milliseid haiguseid on oodata hiire vananedes. (Lutz, Linder, & Davisson, 2012) Täpsemalt on *inbriiditud* näriine saadud 20 õe-venna järjestikusel paaritamisel. Sellistes tingimustes on täheldatud, et mis tahes lookuses on nende homosügootsus peaaegu 99%. (Roderick, 2013)

Seega on sugulusaretuse teel saadud loomad geneetiliselt üksteise kloonid. (Silver, 2001) *Inbriiditud* hiiri saab kasutada erinevate inimeste haigusjuhtude modelleerimiseks. Samuti annavad nad võimaluse ka erinevateks geneetilisteks uuringuteks. (Beck et al., 2000) Hiiri peetakse väga heaks mudelorganismiks, kuna hiire ja inimese geenid on kodeeritavates piirkondades ligikaudu 95% identsed. Eeliseks on ka nende väike suurus, lühike tiinusaeg (3 nädalat) ning 5-10 pojaga pesakonnad. (Silver, 2001)

Inbriiditud hiirte samasus võib tihti olla ka takistuseks erinevate inimeste haigusjuhtude modelleerimiseks, kuna inimesed on geneetiliselt suure varieeruvusega. Seega kui vaadelda haiguse geneetilist tausta näitab *inbriiditud* hiir ainult väikest osa sellest. Samuti näitavad hiljutised uuringud, et tegelikult ei ole *inbriiditud* hiirte tunnuste varieeruvus väiksem kui seda on segatasutaga hiirtel. (Tuttle et al., 2018) Uuringud näitavad ka, et kui sama *inbriiditud* hiireliiniga teha katseid, kas teises laboris (Crabbe et al., 1999; Kafkafi et al., 2005) või aastaid hiljem (Wahlsten et al., 2006), siis näiteks etanooli eelistamise ja liikumisaktiivsuse osas on andmed olnud viimased 40-50 aastat väga sarnased (Wahlsten et al., 2006). Kognitiivse käitumise kohta seda aga öelda ei saa. Ärevust võrdlevates katsetes aga võivad tulemused juba tugevalt varieeruda sama maja teises ruumis. (Wahlsten et al., 2006) Seega tuleb tulemuste osas olla kriitiline ning võimalusel eelistada segataustaga hiiri (Tuttle et al., 2018).

Hetkel on maailmas kirjeldatud ligikaudu 450 erinevat *inbriiditud* hiireliini. Oluline on, et erinevate uurimisteede korral on vaja kasutada erinevaid hiireliine, kuna igal liinil on mingid liinispetsiifilised omadused. (Wang et al., 2017) Transgeensetes uuringutes on 129S6/SvEv (129Sv) ja C57BL/6 (B16) hiireliinid ühed enim kasutatavad inbriiditud hiired (Monastersky and Geistfeld, 2002).

1.1.1. C57BL/6NTac ja 129S6/SvEvTac hiireliinid

129Sv hiired on paremaks mudeliks psühhiaatrilistes uuringutes, kuna neil on *Disc-1* mutatsioon (Mukaida et al., 1996), mis põhjustab muutusi dopamiini homöostaasis ja mõjutab erinevaid kognitiivseid funktsioone (Koike et al., 2006). B16 hiireliinid on enim levinud käitumuslikes, farmakoloogilistes ja geneetilistes uuringutes. (Lucki et al., 2001) Samuti on nad laialdaselt kasutusel ka südame- ja veresoonkonnahaiguste uuringutes (Lutz et al., 2012) kui ka diabeedi uuringutes (Schreyer et al., 1998).

129S6/SvEvTac (129Sv) ja C57BL/6NTac (B16) hiireliinid erinevad teineteisest mitmeti. 129Sv hiired on madalama liikumisaktiivsusega ja suurenenud ärevusega, seevastu B16 hiired on vähem ärevad ning suurema liikumisaktiivsusega. Lisaks, kui rikastada hiirte elukeskkonda, siis tulevad paremini esile hiireliinidele iseärased käitumismustrid. (Abramov et al., 2008) Mitmekesisemas keskkonnas süveneb 129Sv hiirte endasse tõmbumine ja tagasihoidlikkus veelgi, samas kui B16 hiired muutuvad veel füüsiliselt aktiivsemaks, julgemaks ning saavutavad kiirema reaktsioonivõime (Heinla et al., 2014). 129Sv ja B16 hiirtega teostatud depressioonitestide võrdlusuuringud, nagu sundujumise test või sabariputamise test, näitavad, et 129Sv hiirtel on suurem liikumatus kui B16 hiirtel. Seega on 129Sv hiired tundlikumad stressi suhtes, kui seda on B16 hiired. (Liu and Gershenfeld, 2001, 2003) Uuringus, kus hiirte kodukeskkonda oli viidud kassilõhnaga riideese, kutsus B16 hiirtes esile ärevuse, mida 129Sv hiirte puhul ei täheldatud. See näitab, et B16 hiired on uudishimulikud kui 129Sv hiired. (Raud et al., 2007)

Samuti on hiirte kognitiivsetes funktsioonides erinevusi. 129Sv hiirte tundlikkus valule on oluliselt väiksem kui seda on B16 hiirtel (Võikar et al., 2004; Abramov et al., 2008). Hiirte puhul on uuritud ka nende alkohlilembelisust ning on leitud, et 129Sv hiireliinid eelistavad etanoolile vett, samas kui B16 hiired eelistavad veele etanooli, olles seejuures uuritud

hiireliinidest kõige alkoholilembelisemad (Yoneyama et al., 2008). Erinevusi on täheldatud ka amfetamiini manustamisel, kus B16 liikumisaktiivsus oli rohkem stimuleeritud kui 129Sv hiirtel (Chen et al., 2007; Vanaveski et al., 2018). Neid erinevusi võib seostada raaminihke mutatsiooniga *Disc-1* geenis (Mukaida et al., 1996). Kuna see põhjustab muutusi dopamiini homöostaasis ja mõjutab erinevaid kognitiivseid funktsioone (Koike et al., 2006).

Inimestel on *DISC-1* geeni seostatud eelkõige skisofreeniaga. Seos avastati šoti perel, kelle esimese ja 11. kromosoomi vahel tuvastati translokatsioon, mis viis *DISC-1* geeniekspressiooni vähenemiseni. (Jacobs et al., 1970; St Clair et al., 1990) Hiljem on *DISC-1* geeni seostatud ka mitmete teiste psühhiaatriliste häirete väljakujunemisega. 129Sv hiirte kuuendas eksonis on 25 aluspaari pikkune deletsioon, mida B16 hiirtel ei esine. Seda deletsiooni peetakse 129Sv omaseks polümorfismiks. (Koike et al., 2006) Lisaks näitasid Kamiya et al., et *Disc-1* geeniekspressiooni vähenemine häirib normaalset neuronite migratsiooni arenevas ajukoos (Kamiya et al., 2005).

Samuti reageerivad hiireliinid erinevalt teatud patogeenidele. Näiteks kui nakatada kumbagi hiireliini gripiviirusega, siis 129Sv hiired jäävad raskemini haigeks, esineb rohkem ja raskemaid kopsukahjustusi ning samuti lõpeb rohkem juhtumeid surmaga, kui seda on täheldatud B16 hiirte puhul. Seega on B16 hiirte vastupanuvõime viirusele tugevam. Nakatumise korral mõjutab viirus rakkudevahelise informatsiooni vahendamist ja tsütokiinide vabastamist. Kuna 129Sv hiirte puhul vabaneb tsütokiine palju suuremal hulgal (vallandub tsütokiinide torm), kui seda juhtub B16 hiirtel, muudab see 129Sv hiirtel haiguse läbipõdemise tunduvalt raskemaks. (Davidson et al., 2014)

Erinevusi esineb ka nende ainevahetuses. Hiljutises uuringus võrreldi B16 ja 129Sv hiireliinide metabolismet profiili 1,5 h ja 24 h lipopolüsahhariidi (LPSi) manustamise järgselt. Ehkki paljud LPS-ist põhjustatud metaboolsed muutused olid hiireliinide vahel sarnased, leiti mitmeid liinispetsiifilisi muutusi. 1,5 h peale LPS-i manustamist esines B16 hiirtel mitmete metaboliitide hüpometabolism, mis võimendus veelgi 24 h peale LPS-i manustamist. Lisaks näidati ka B16 hiirtel suurenenud putrestsiini tootmist, millel on teadaolevalt neuroprotektiivsed omadused. Seevastu 129Sv hiireliinis B16 hiireliinile omast hüpometaboolset reaktsiooni ei esinenud, vaid metabolismi iseloomustas suurenenud lipiidide tootmine 1,5 h peale LPS-i manustamist. 24 h

hiljem olid tõusnud lisaks lipiidide tasemele ka hüdroksüleeritud atsüülkarnitiinid, mis võib viidata suurenenud põletikulisele seisundile. (Piirsalu et al., 2020)

Hüpometaboolne reaktsioon on oluline energia säästmise vaatepunktist, mis toetab toitainete ümberjaotumist immuunaktivatsiooni kasuks. Peremeesorganism hoiab oma sisemist temperatuuri ühtlasena metabolismi kiirust muutes. Patogeenide korral viib organism läbi aga energiavahetuse, mis viib hüpometabolismi tekkeni. Tekib hüpotermia, et organism saaks kasutada keha temperatuuri ühtlasena hoidmiseks vaja minevat energiat hoopis immuunvastuses. (Ganeshan et al., 2019) See toetab veelgi teooriat, et B16 hiired tulevad paremini toime infektsiooniga.

1.2 Neuroinflammatsioon

Põletikku peetakse paljude kesknärvisüsteemi haiguste põhjustajaks. Nendeks võivad olla näiteks neurodegeneratiivsed haigused, depressioon, unehäired, insult jpt. (Welcome, 2020) Samuti on leitud seoseid põletikul nii epilepsia (Vezzani et al., 2019) kui ka migreeniga (Edvinsson et al., 2019).

Immuunsüsteemil on oluline roll organismi homöostaasi loomisel. Selleks on oluline, et immuun-, endokriin- ja närvisüsteem oleksid võimelised üksteise vahel signaale vahetama. (Dantzer, 2018) Närvi- ja immuunsüsteemi vahelisi interaktsioone võib nimetada neuroimmuunsüsteemiks „*neuroimmune system*“. Selle süsteemi eesmärgiks on vahendada biokeemilisi ja elektrofüsioloogilisi omadusi, et kaitsta neuroneid patogeenide eest. Põletiku korral aktiveeritaks KNS immuunrakud, milleks on mikroglia rakud. (Zhang et al., 2021) Neuroinflammatsiooni korral aktiveeritakse gliia rakud, vabastatakse tsütokiinid, kemokiinid ja reaktiivsed hapnikuühendid (ROS) (Milatovic et al., 2017). Sõltuvalt sellest kui kaua põletikuline protsess kestab võib sellel olla nii positiivseid kui ka negatiivseid omadusi (DiSabato et al., 2016).

Lühikest ja kontrollitud põletikku peetakse peremeesorganismile kasulikuks, kuna infektsiooni korral kutsuvad immuunsignaalid esile haiguskäitumise, mis aitab infektsiooniga võidelda. Lisaks sellele on täheldatud, et muidu immuunsuses olulist rolli omaval interleukiin 4 (IL-4)

on tähtis roll ka erinevates ajufunktsioonides. Traumaatilise KNS vigastuse korral juhib IL-4 makrofaagide repolarisatsiooni. (DiSabato et al., 2016) Lisaks on näidatud, et IL-4 mõjutab ka mälu ja õppimisvõimet (Gadani et al., 2012).

Kroonilise ja kontrollimatu põletikuga on suurenenud tsütokiinide, IL-1, tuumor-nekroosi faktori (TNF, *tumor necrosis factor*), ROS-i ja muude põletikuvahendajate tootmine. Nende suurenenud kogus kahjustab oluliselt närvisüsteemi. (DiSabato et al., 2016) See omakorda võib põhjustada ajupiirkondade degeneratsiooni, mis on iseloomulik neurodegeneratiivsetele haigustele nagu näiteks kognitiivsed ja käitumuslikud häired, dementsus ja depressioon (Singhal and Baune, 2019).

1.2.1. Mikroglia

Mikroglia rakud on peamised põletiku vahendajad KNS-is. Nad moodustavad umbes 5-12% KNS-i rakkudest. (Bazan et al., 2012) Mikroglia rakke iseloomustab väike rakukeha ning pikad dünaamilised jätked, millega nad skaneerivad pidevalt aju sisekeskkonda. Koekahjustuse, patogeensete seisundite ja vigaste sünapside tuvastamisel saavad nad jaguneda ja seeläbi vahendada vajalikke kaitsefunktsioone. (Hanisch, 2014)

Nii öelda puhkefaasis, kui ei ole põletikku, peavad mikroglia rakud säilitama homöostaasi. Tavaseisundis vastutavad mikroglia rakud arengu käigus tekkinud vigaste neuronite kõrvaldamise eest põletikku esile kutsumata. (Takahashi et al., 2005, 2007) Samuti aktiveerivad nad teisi vajalikke rakke koe vigastuste korral (Davis et al., 2017), juhivad raku migratsiooni (Lively and Schlichter, 2013) ja kontrollivad proliferatsiooni (Gomez-Nicola et al., 2013). Varajases arengus aitavad mikroglia rakud kaasa ka KNS hapniku ja toitainetega rikastamisel, ühendades omavahel arenevaid veresooni (Rymo et al., 2011). Tavaolekus on mikroglia rakud väikesed dünaamiliste jätketega rakud, erutuse korral aga muutub nende morfoloogia ja nad muutuvad amöboidseks (Davis et al., 2017).

Tavaliselt aktiveeruvad mikroglia rakud ka väiksema homöostaasi kõrvalekalde korral. Kui märgatakse kahjulikke patogeene või vigaseid sünapse, siis aktiveeritakse fagotsütoos ja tsütokiinide vabastamine. (Morales et al., 2016) Koekahjustuste korral viivad rakuvälise

maatriksi degeneratsioonini ning soodustavad taastumist (Michell-Robinson et al., 2015). Samuti osalevad nad korrapärase aju füsioloogias, heas mälu ja õppimisvõimes (Nava Catorce and Gevorkian, 2016). Aitavad kaasa aju normaalsele arengule, mõjutades neuronite juurdekasvu (Hammond et al., 2018).

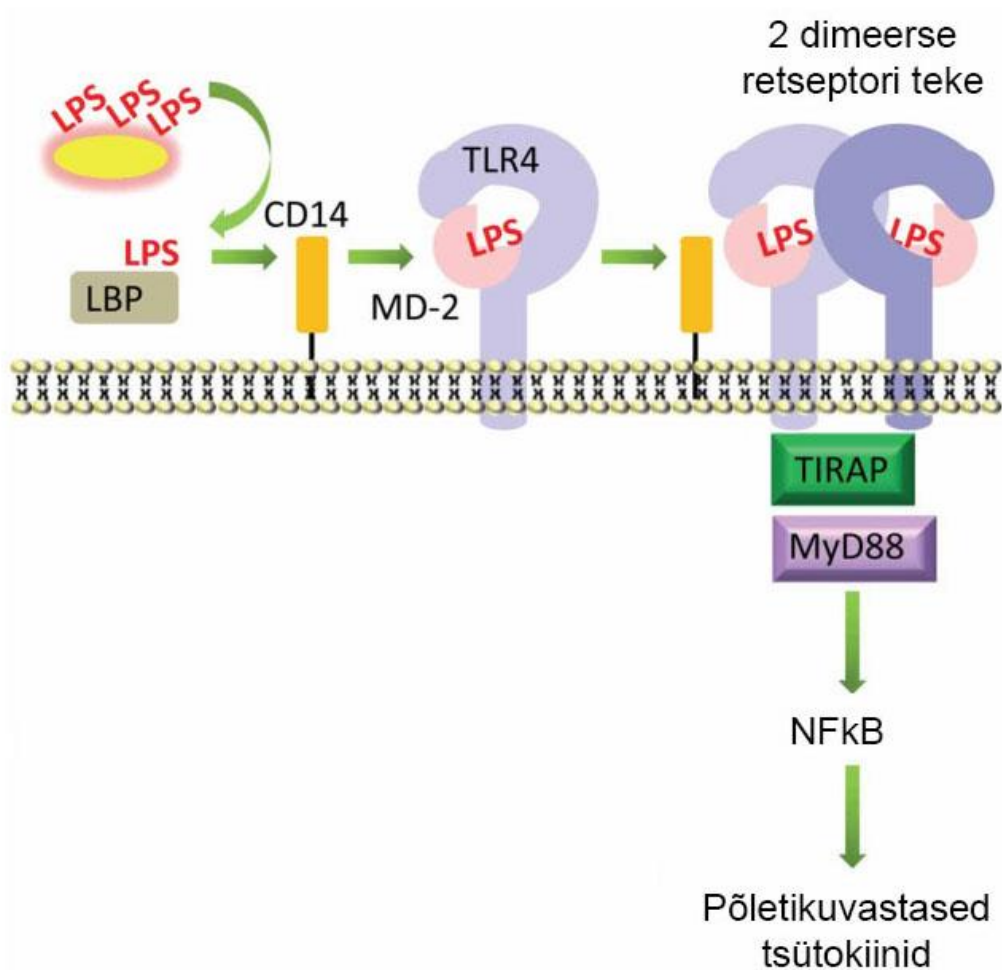
Mikroglia rakud on võimelised muutma oma fenotüüpi vastusena erinevatele stiimulitele. Klassikalise mudeli järgi saab mikroglia polariseeruda, kas M1 või M2 tüüpi. Kuigi viimaste uuringute järgi peetakse seda klassifikatsiooni pigem lihtsustatuks ning mikroglia polarisatsioon arvatakse olevat palju keerukam, omades mitmeid erinevaid polarisatsiooni fenotüüpe. (Wells et al., 2003; Orihuela et al., 2016) M1/M2 polarisatsioonimudel jagab mikroglia rakud kaheks erinevaks fenotüübiks: klassikaliselt aktiveeritud (M1 fenotüüp) ja alternatiivselt aktiveeritud (M2 fenotüüp). Klassikaliselt aktiveeritud M1 mikrogliaat peetakse pro-inflammatoorseks ning vahendab esmast kaitset patoloogilistes tingimustes, M2 mikrogliaat peetakse anti-inflammatoorseks ning tegeleb kahjustuste parandamisega. (Zheng and Wong, 2019) Polariseerumise määrab suuresti ka mikrokeskkond. Enamasti aktiveeritakse mikroglia läbi tolli-laadsete retseptorite (*toll-like receptor*, TLR) interaktsioonide. TLR-id asuvad mikroglia rakkude pinnal ning on võimelised tuvastama erinevaid koekahjustuse ja patogeenidega seotud molekulaarseid mustreid (DAMP-e ja PAMP-e) keskkonnas. (Jack et al., 2005) Pärast polariseerumist on mikroglia võimeline lülituma M1 ja M2 fenotüüpide vahel vastavalt mikrokeskkonna muutustele (Gao et al., 2018).

Zhilin Li *et al* (2014) uurisid kuidas mõjutab põletik mikroglia rakke neljas erinevas hiireliinis. Nad näitasid, et ärevamate hiireliinide puhul oli kõrgem M1 mikroglia tase. Samuti leiti, et 129Sv hiirtel oli ajus suurem hulk makrofaage kui B16 hiireliinil ning viimastel oli mikroglia rakkudel kõrgem põletikuvastaste geenide ekspressioonitase kui 129Sv hiirtel. Lisaks täheldati, et LPS-i manustamisel suurenes 129Sv hiirtel M1 ja M2 mikroglia aktiivsatsioon rohkem kui B16 hiirtel. Uuringud näitasid ka, et M1/M2 mikroglia suhe võib olla hea näitaja loomade ärevustaseme hindamiseks ning M1/M2 mikroglia vaheline suhe võib mõjutada looma sotsiaalset käitumist ja mängida olulist rolli aju arengus. (Li et al., 2014)

1.2.2. Lipopolüsahhariid

Lipolüsahhariid (LPS) on hästi teada ja kirjanduses laialdaselt kirjeldatud PAMP. LPS on bakteriaalne endotoksiin, mis kuulub Gram-negatiivsete bakterite välismembraani koosseisu. Immuunsüsteem reageerib LPS-ile TNF-i ja paljude teiste põletikutsütokiinide tootmise ja vabastamise kaudu. Organismis seondub LPS tolli-laadsete retseptoritega (TLR). Täpsemalt reageerib LPS-ile TLR4 (Akira et al., 2006). Seondudes TLR4 retseptoriga, aktiveerib LPS transkriptsioonifaktori NF- κ B (*nuclear factor- κ B*), millega indutseeritakse põletikutsütokiinide ekspressioon ja IRF-3 (*interferon response factor-3*), mis suurendab esimest tüüpi interferoonide tootmist (Sakai et al., 2017).

Selleks, et TLR4 saaks käivitada põletikuvastuse, on tal esmalt vaja ära tunda LPS. LPS-i koostisesse kuulub hüdrofiilne polüsahhariidne osa ja hüdrofoobne lipiid A, mis tagab LPS-i toksilisuse. (Nijland et al., 2014) Selleks, et lipiid A-d ära tunda, on vajalik LPS-i siduv valk (*LPS binding protein, LBP*). LPS-i vabal kujul üdiselt organismis ei esine, kuna ta seotakse koheselt LBP-ga. Seejärel kannab LBP LPS-i üle CD-14-le (*cluster of differentiation 14*), mida võib leida nii vabalt vereplasmas kui ka glükosüülfosfatidüül inositol (*glycosylphosphatidyl inositol, GPI*) ankru kaudu rakupinnale seotuna. (Van Amersfoort et al., 2003) Seejärel kantakse LPS üle TLR4 retseptorile, mida vahendab MD-2 (*Myeloid Differentiation factor 2*) mediaatorvalk. (Teghanemt et al., 2005) Peale LPS sidumist toimub TLR4 retseptori dimeriseerumine. Dimerisatsiooni järgselt aktiveerub TLR intratsellulaarne „saba“, mis meelitab enda ligi adaptervalgud ja käivitab signaalide kaskaadi, mille tulemusel aktiveeritakse transkriptsioonifaktorid NF- κ B ja IRF-3 ning põletikutsütokiinide tootmine (Joonis 1). (Medzhitov et al., 1997; Faure et al., 2000)



Joonis. 1 LPS-TLR4 interaktsioon. Kõigepealt seotakse vaba LPS LPB-ga, mis seejärel kantakse üle CD-14-le. Sellele järgneb LPS-i ülekandmine TLR4 retseptorile MD-2 vahendusel. Järgnevalt toimub moodustunud kompleksi dimerisatsioon, mis omakorda põhjustab adaptervalkude, TIRAP ja MyD88, kaasamise. Need soodustavad transkriptsioonifaktori NF-κB aktivatsiooni, mis omakorda aktiveerib põletikuvastaste tsütokiinide nagu IL-6 ja TNF-α transkriptsiooni. (Maeshima and Fernandez, 2013; pilt adapteeritud)

LPS-i kasutatakse laialdaselt neuroinflammatsiooni uurimiseks. Perifeerias olev LPS ei ole ise võimeline läbima hematoentsefaalbarjääri (BBB) ning põletik tekib läbi sekundaarse vastuse. Mitmed tsütokiinid, näiteks IL-6 ja TNF-α, on võimelised läbima BBB-d ning on seega olulisteks aineteks neuroimmuunsetes interaktsioonides. Veelgi enam, LPS stimuleerib ajusisest tsütokiinide vabastamist. Neid vabastavad ajus asuvad endoteelirakud. (Singh and Jiang, 2004; Vargas-Caraveo et al., 2017)

Lisaks on mitmed erinevad uuringud näidanud, et LPS kutsub esile tõusu MHC (*major histocompatibility complex*) klass I raja komponentides. (MacAry et al., 2001)

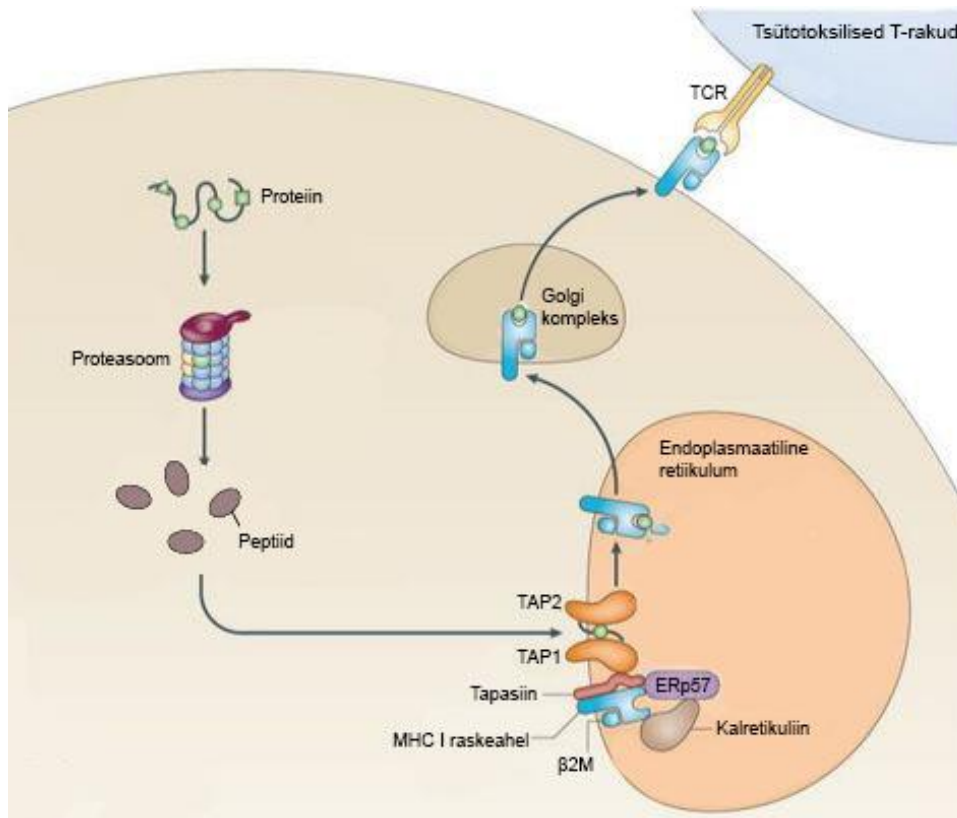
1.2.3. MHC I rada

MHC geenid on jagatud kolme klassi, milleks on klassis I, II ja III (Cebrián et al., 2014). Peaaegu kõik organismi rakud ekspresseerivad MHC I kompleksi (Hewitt, 2003). Samas kui MHC II ekspresseerub ainult antigeene esitavate rakkude (APC) pinnal. MHC III kompleks erineb teistest selle poolest, et ta ei ole võimeline siduma ja presenteerima antigeene. Küll aga on MHC III regioonil oma oluline koht immuunsüsteemis, sisaldades mitmeid immuunreaktsiooni seisukohalt olulisi geene nagu näiteks TNF- α kodeeriv geen. (Mak and Saunders, 1983)

Inimesel asub MHC geenikompleks kuuendas kromosoomis, hiirtel 17ndas kromosoomis (Apostolopoulos et al., 2008). MHC I kompleks koosneb nii hiirel kui inimesel α -ahelast ning beeta-2-mikroglobuliinist (β_2m). See asub inimesel ja hiirel erinevates kromosoomides. Inimesel asub β_2m 15ndas kromosoomis ja hiirtel teises kromosoomis. (Shiina et al., 2017) Inimese MHC I kompleksi geenideks on inimese leukotsüüt antigeen A (HLA-A), inimese leukotsüüt antigeen B (HLA-B) ja inimese leukotsüüt antigeen C (HLA-C). Hiire MHC I kompleksi geenideks on aga H2-K, H2-D ja H2-L. (Nardo et al., 2016)

MHC I molekulid vastutavad selle eest, et teha vahet millised rakud on omad ja millised võõrad, kuid MHC I heterodimeer ise ei erista oma ja võõrast peptiidi. Seda vahendab T-rakul asuv T-raku retseptor (TCR). Seega omavad MHC I molekulid näiteks olulist rolli organismi immuunvastusel, kui peremeesorganism nakatub viirustega, kuna MHC I kaudu esitatakse immuunsüsteemile enamik rakusisestest bakteritest ja viirustest pärit peptiide. (Hewitt, 2003) Kui organism on nakatunud viirusega, siis üldjuhul on MHC ekspressioon ja transport raku pinnale aktiveeritud ning nakatunud rakkudel käivitatakse apoptoos, et vältida naaberrakkude nakatumist. Tavaliselt on naturaalsed killer-rakud (*natural killer*, NK) inaktiveeritud, kui MHC I on ekspresseeritud raku pinnal, kuid MHC I molekulide puudumisel aktiveeritakse NK rakud. Seega juhul kui viirus suudab ära hoida MHC I raja aktiveerumist kaitsevad organismi viiruse eest NK rakud. (Antoniou and Powis, 2008; Wang et al., 2008; Revilleza et al., 2011)

MHC I on heterodimeer, mis koosneb rakumembraani läbivast transmembraansest raskest α -ahelast, mis seondub mittekovalentselt beeta-2-mikroglobuliiniga (β_2m). (Lindå et al., 1999) MHC I kaudu esitatakse immuunsüsteemile enamik viirustest ja rakusisestest bakteritest pärit peptiide raku pinnal. Selleks on vajalik eelnev antigeeni töötlemine raku sees. Kõigepealt toimub tsütoplasmas antigeeni omastamine, peale mida toimub valgu degradatsioon proteosoomis. (Hewitt, 2003; Murat and Tellam, 2015) Tavaline proteosoom, mis viib läbi valgu lagundamist, koosneb 20S põhiproteosoomist ja 19S reguleerivast ühikust. Selleks, et peptiidid saaksid seonduda MHC I kompleksiga, peavad need olema 8-18 aminohapet pikad. Kui need seda ei ole, siis lõigatakse need lühemaks peptidaaside abil. (Groettrup et al., 2010) Eraldi struktuurideks on veel ka immuunoproteosoomid, mida rakkudes tavaolekus ei leidu ning aktiveeritakse põletikulises seisundis. Nendeks on näiteks Imp2, Imp7 ja Imp10. (Ferrington and Gregerson, 2012) Proteosoomides tekkinud peptiidid transporditakse ER-i, mida viib läbi transporter kompleks TAP (*transporter-associated with antigen processing*), mis koosneb TAP1 ja TAP2 valgust. (Reits et al., 2000) ER-is toimub MHC biosüntees, mille käigus ribosoom sünteesib MHC I α -ahela, mis integreerub translatsiooni käigus ER-i membraaniga. ER-i membraanil seondub α -ahel kalneksiiniga, mis vahendab β_2m ja α -ahela vahelist seondumist. Seejärel vahetatakse kalneksiin kalretikuliini vastu, mis aitab MHC I ja β_2m kompleksil seonduda peptiidiga. Selleks, et tagada peptiidi efektiivne seondumine MHC I kompleksiga toimub MHC I ja TAP kompleksi interaktsioon ER-i pinnal, mida stabiliseerib valk nimega tapasiin. Lõpuks kantakse MHC I koos peptiidiga Golgi kompleksi kaudu raku pinnale. (Groettrup et al., 2010; Murat and Tellam, 2015) Järgnevalt tunnevad MHC molekuli ja peptiidi kompleksi ära T-rakud. Põhiliselt tunnevad MHC I kompleksi ära CD 8 + tsütotoksilised T-lümfotsüüdid. (Hewitt, 2003) (Joonis 2.)



Joonis 2. MHC I antigeeni protsessimine. Antigeenid lagundatakse proteosoomis peptiidideks. Peptiidid kantakse TAP1 ja TAP2 valkudest koosneva transporterkompleksi abil ER-i, kus toimub antigeeni sidumine MHC I kompleksiga. ER-i membraanil seondub α -ahel kalneksiiniga, mis aitab α -ahelal seonduda β 2m-ga. Seejärel vahetatakse kalneksiin kalretikuliini vastu, mis aitab moodustunud kompleksi edasist seondumist peptiidiga. Järgnevalt toimub MHC I ja TAP interaktsioon ER-i pinnal, mida stabiliseerib valk tapasiin. Lõpuks kantakse MHC I koos peptiidiga Golgi kompleksi kaudu raku pinnale ning kompleksi tunnevad ära T-rakud. (Groettrup et al., 2010; pilt adapteeritud)

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

Käesoleva magistritöö suuremaks eesmärgiks oli võrrelda muutusi MHC I rajas osalevate geenide ekspressioonis, B16 ja 129Sv hiirte erinevates ajuosades, peale põletikulise seisundi indutseerimist lipopolüsahhariidiga.

Töö alaeesmärgid:

- Võrrelda LPSi mõju kehakaalule 24 h peale süstimist B16 ja 129Sv hiirtel
- Võrrelda LPSi mõju kehatemperatuurile 24 h peale süstimist B16 ja 129Sv hiirtel
- Uurida B16 ja 129Sv hiirtel MHC I rajaga seotud geenide (*TapBp* ehk tapasiini kodeeriv geen, $\beta 2m$, *Tap1*, *Tap2*, *Lmp2*, *Lmp7* ja *Lmp10*) ekspressiooni baastasemeid ning LPSist tingitud muutusi 4 erinevas ajukoos:
 - Haistesibul
 - Hipokampus
 - Väikeaju
 - Ventraalne keskaju

2.2 Materjalid ja meetodika

2.2.1. Kasutatud katseloomad

Töös kasutati kahte erinevat hiireliini, mida on kirjeldatud kirjanduse ülevaates: C56BL/6NTac (B16; n=20) ja 129S6/SvEvTac (129Sv; n=20). Katseloomad olid 16-23 nädala vanused metsiktüüpi isased hiired. Loomi aretati ja hoiti Tartu Ülikooli katseloomakeskuses. Neid hoiti tavatingimustes, kus toidugraanulid ja joogivesi olid loomadele vabalt kättesaadavad. Hiirtel oli reguleeritud ööpäevane režiim, 12h/12h valge/pime tsükkel (valge tsükkel: 07.00 - 19.00 ja pime tsükkel: 19:00 – 07:00).

Katse teostati Eesti Vabariigi Maaeluministeriumi loomkatseprojekti loakomisjoni poolt väljastatud loa alusel (nr 141, 17.04.2019).

2.2.2. Lipopolüsahhariidi manustamine

Lipopolüsahhariid (LPS; *E. Coli* stereotüübist 0111:B4; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) lahustati füsioloogilises lahuses (0,9% NaCl). Hiirtele manustati intraperitoneaalselt (i.p) 0,5 mg/kg LPSi lahust. Kontrollgrupi hiirtele manustati füsioloogilist lahust. Katsegrupid jagunesid järgnevalt: 20 hiirt, kellele manustati LPSi (Bl6 n=10; 129Sv n=10) ning 20 hiirt, kellele manustati füsioloogilist lahust (Bl6 n=10; 129Sv n=10).

2.2.2. Katseloomade kaal ja temperatuur

Hiirte kehatemperatuuri ja kehakaalu mõõdeti enne ning 24 h pärast LPS-i ja füsioloogilise lahuse süstimist. Kehatemperatuuri mõõtmiseks kasutati rektaalset termomeetrit (TSE Technical & Scientific Equipment GmbH, Saksamaa).

2.2.3. Ajustruktuuride prepareerimine

Katseloomad hukati 24 h pärast LPSi ja füsioloogilise lahuse manustamist dekapitatsiooni teel. Seejärel eraldati aju koljust. Eemaldatud aju prepareeriti jääl, väljaõppinud eksperdi poolt. Eraldati haistesibul, väikeaju, ventraalne keskaju ja hipokampus. Eraldatud ajuosad külmutati koheselt vedelas lämmastikus ning säilitati temperatuuril -80 °C.

2.2.4. RNA eraldamine

RNA eraldus viidi läbi jääl, et vältida RNAasi degradeerivat efekti. Hiire rakuline RNA eraldati ajuosade homogeniseerimise teel. Homogeniseerimiseks kasutati homogenisaatoreid (10x micrpestels 0030120.973, Eppendorf) TRI reagenti (Trizol Reagent, Invitrogen, Molecular Research Center Inc, USA) ning tootja poolseid juhiseid. Proovid homogeniseeriti esialgu 100 µl TRI reagentis ning seejärel lisati ülejäänud osa TRI reagenti, kuni 500 µl. Järgnevalt inkubeeriti proove 5 minutit toatemperatuuril ning seejärel lisati 200 µl kloroformi (Sigma-Aldrich, Saksamaa). Proove raputati tugevalt kuni segu ühtlaselt roosaks muutumiseni peale mida inkubeeriti veel 2 minutit toatemperatuuril. Seejärel tsentrifuugiti proove eeljahutatud tsentrifuugis (Eppendorf 5810/R Bench Top, Saksamaa) kiirusel 12 000 G 4 °C juures 15 minutit. Moodustus kolm kihti, millest pealmine RNAd sisaldav vesifaas (u. 300 µl) tõsteti ümber uude eppendorfi ning lisati 250 µl (pool kasutatud TRI reagenti mahust) isopropanooli (Naxo, Eesti) RNA sadestamiseks. Proovid segati hoolega tuube pöörates ning inkubeeriti 10

minutit toatemperatuuril. Seejärel tsentrifuugiti 10 minutit kiirusel 12 000 G 4 °C juures. Supernatant eemaldati ning RNA sadet pesti 1 ml jääkülma (-20 °C juures hoiustatud) 75% etanooliga. Seejärel proove tsentrifuugiti kiirusel 7500 G 4°C juures 10 minutit. Etanool eemaldati ning pesu teostati veel teist ja kolmandat korda. Kolmanda pesu järgselt peale etanooli eemaldamist suspendeeriti RNA sade üles 50 µl MilliQ (MQ) vees. Proove segati vortexil ning järgnes RNA kontsentratsiooni mõõtmine NanoDrop ND-1000 spektrofotomeetriga (NanoDrop Technologies, USA). Eraldatud RNA proove säilitati - 80 °C juures.

2.2.5. cDNA süntees

RNA-st sünteesiti cDNA, kasutades SuperScript™ III pöördtranskriptaasi (Invitrogen) ning hesameerseid praimereid (Invitrogen). Alustuseks võeti -80°C sügavkülmast eelnevalt eraldatud RNA proovid ning lasti toatemperatuuril sulada. Sünteesiks kasutati 1000-2000 ng eraldatud RNA-d. RNA lahusele lisati praimer-dNTP segu, mis koosnes 1 µl dNTP (Fermentas) ja 1 µl heksameersest praimerist (50 µM). Praimerite seondumiseks inkubeeriti proove 5 minutit 70°C juures. Seejärel tõsteti proovid 5 minutiks jääle reaktsiooni peatamiseks. cDNA sünteesiks lisati proovidele 4 µl 5X First-Strand Buffer [250 mM Tris-HCl (pH 8,3 toatemperatuuril), 375 mM KCl, 15 mM MgCl], 1 µl 0.1 M DTT, 1,5 µl MQ ja 0,5 µl SuperScript™ III pöördtranskriptaasi (200 U/µl). Seejärel inkubeeriti proove 75 minutit 50 °C juures. Reaktsioon peatati tõstes proovid 15 minutiks 70 °C juurde. Seejärel lahjendati cDNAd 10X ning proove hoiustati -80 °C juures. Lisaks mõõdeti ka cDNA kontsentratsiooni kasutades NanoDrop ND-1000 spektrofotomeetrit.

2.2.6. Kvantitatiivne reaalaja PCR

Antud magistritöös kasutati SYBR green kvantitatiivse reaalaja PCR-i (RT-qPCR) tehnoloogiat, mis seondub mittespetsiifiliselt kaheaheelise DNA-ga. SYBR green on fluorestsentsvärv ning tekkiv fluorestsentsignaali hulk on proportsionaalselt sõltuvuses kaheaheelise DNA hulgaga. (Marmioli and Maestri, 2007; Tajadini et al., 2014)

MHC I rajas osalevate geenide (*TapBp* ehk tapasiini kodeeriv geen, $\beta 2m$, *Tap1*, *Tap2*, *Lmp2*, *Lmp7* ja *Lmp10*) praimerite selektsioon leidis aset Primer3 tarkvara vahendusel. Referentsgeenina kasutati hüpoksaantiin-guaaniin fosforibosüültransferaasi (*hypoxanthine-*

guanine phosphoribosyltransferase, Hprt-d). Praimerid disainiti alati erinevatesse eksonitesse, mille vahele jäi suurem intron või kahe eksoni piirile, et välistada genoomse DNA amplifikatsiooni. Praimerite amplikonide spetsiifilisust ning praimerite efektiivsust kontrolliti nii geelektroforeesil kui ka RT-qPCR-ga, analüüsidest sulamiskõverat. Praimerite järjestused on välja toodud tabelis 1.

Tabel 1. RT-qPCR praimerite nukleotiidsed järjestused

Geen	Produkt pikkus (nt)	Forward / Reverse	Järjestus
<i>Hprt</i>	85 bp	F	5'-GCAGTACAGCCCCAAAATGG-3'
		R	5'-AACAAAGTCTGGCCTGTATCCAA-3'
$\beta 2m$	107 bp	F	5'-TGGTCTTTCTGGTGCTTGTC-3'
		R	5'-TATGTTCCGGCTTCCCATTCTCC-3'
<i>Tap1</i>	99 bp	F	5'-CTTGGATGATGCCACCAGTG-3'
		R	5'-AGAAGAACCGTCCGAGAAGC-3'
<i>Tap2</i>	143 bp	F	5'-GCGCCATCTTTTTTCATGTGC-3'
		R	5'-AAGGTCTTGCGCAACAAAG-3'
<i>Lmp7</i>	73 bp	F	5'-ATGCAGCCCACCGCATTC-3'
		R	5'-CGTGGGCCATCTCAATTTGAAC-3'
<i>Lmp10</i>	94 bp	F	5'-GAATGCGTCCTTGGAACACG-3'
		R	5'-TCCATCTCGGAACACAAGCC-3'
<i>Lmp2</i>	134 bp	F	5'-ATGGGAGGGATGCTAATTCGAC-3'
		R	5'-ATGGCATCTGTGGTGAAACG-3'
<i>TapBp</i>	124 bp	F	5'-CAGCTACCTCCAGTCACTGC-3'
		R	5'-GCCCTGAGAAGCCTGCCA-3'

Proove analüüsiti QuantStudio 12K Flex (Applied Biosystems, USA) masinaga. Iga proovi reaktsioonisegu sisaldas 8,8 µl HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix (Solis Biodyne, Eesti), 25,2 µl MQ, 5 µl 5mM *forward* ja *reverse* praimersegu (TAG Copenhagen, Taani), millele lisati 5 µl cDNAd, lõppmahuga 44 µl (Tabel 2). Reaktsioonisegu pipeteeriti 10 µl kaupa 384-augulisele mikrotiiterplaadile neljas korduses. RT-qPCR-i programmietapid on välja toodud tabelis 3. Suhtelise mRNA ekspressioonitasemed esitati $2^{-\Delta CT}$ kujul.

Tabel 2. RT-qPCR reaktsioonisegu koostis

Komponent	Kogus 1 proovi kohta
HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix (Solis Biodyne, Eesti)	8,8 µl
Vesi (Milli-Q)	25,2 µl
cDNA	5 µl
Praimermix (10 µM)	5 µl

Tabel 3. RT-qPCR programm

Etapp	Temperatuur (°C)	Aeg	Korduste arv
Polümeraasi aktivisatsioon	95	10 minutit	1
Denatureerimine	95	15 sekundit	40
Praimerite seondumine ja produkti paljundamine	60	1 minut	
Dissotsiatsioon	95	15 sekundit	1
	60	1 minut	
	95	15 sekundit	

2.2.7. Statistiline analüüs

Peale RT-qPCR-i analüüsi viidi andmed $2^{-\Delta CT}$ kujule, kus ΔCT tähistab erinevust koduhoidja (*Hprt*) ja uuritava geeni vahel (Silver et al., 2006). Andmed korrastati ning hälbijad eemaldati tuginedes sulamiskõvera kvaliteedile. Seejärel koostati korrastatud andmetest graafikud, kasutades GraphPad Prism 9 (GraphPad Software Inc, USA) programmi. Andmed on esitatud keskmise mRNA ekspressiooni tasemena koos keskmise standardveaga (mean \pm SEM). Andmete statistiliseks analüüsiks kasutati kahefaktorilist dispersioonanalüüsi [Two-way ANOVA; hiireliin (B16 või 129Sv) x töötlus (LPS või füsioloogiline lahus)], millele järgnes Bonferroni *post hoc* analüüs. Tulemused loeti statistiliselt oluliseks, kui p-väärtus oli väiksem kui 0,05.

Kaalu ja temperatuuri korral arvutati esmalt 0 h ja 24 h mõõtmistulemuste vahe ($\frac{(24h\ kaal - 0h\ kaal)}{0\ h\ kaal} \times 100$). Seejärel teostati saadud tulemustest statistiline analüüs, kus kasutati kahefaktorilist dispersioonanalüüsi [Two-way ANOVA; hiireliin (B16 või 129Sv) x töötlus (LPS või füsioloogiline lahus)], millele järgnes Bonferroni *post hoc* analüüs. Tulemused loeti statistiliselt oluliseks, kui p-väärtus oli väiksem kui 0,05. Nii kaalu kui ka temperatuuri muutused 24 tunni jooksul on esitatud keskmise standardveaga (mean \pm SEM).

2.3 Tulemused

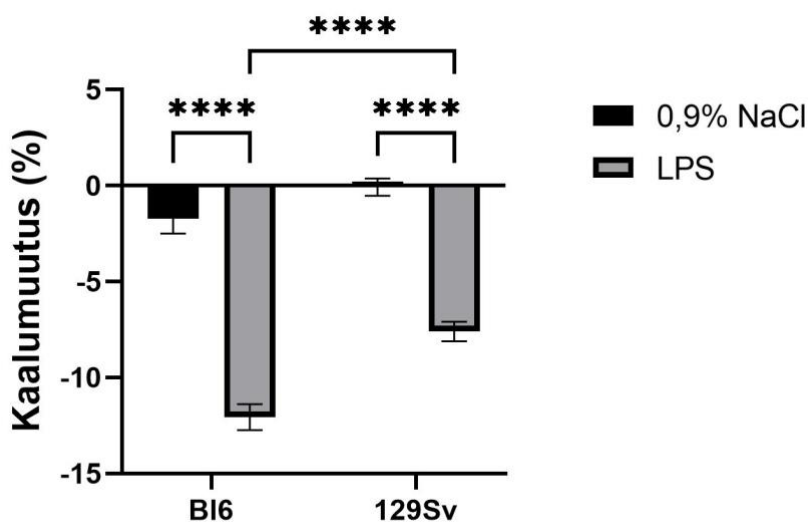
Antud magistritöös uuriti gram-negatiivse bakteri toksiini, lipopolüsahhariidi (LPS), mõju 129Sv ja B16 hiirte kehakaalule, kehatemperatuurile ning MHC I rajas osalevate geenide ekspressioonile neljas erinevas ajustruktuuris. Ajuosade valikul võeti arvesse mikroglia tihedust, et oleks esindatud kõrgeima mikroglia tihedusega piirkonnad (hipokampus ja haistesibul), keskmise mikroglia tihedusega piirkonnad (ventraalne keskaju) ning madalaima tihedusega alad (väikeaju). (Tan et al., 2020) Seega on esindatud potentsiaalselt tugevama kui nõrgema immuunvastusega piirkonnad.

Et uurida LPS-i poolt esile kutsutud muutusi Bl6 ja 129Sv hiirtel, jaotati loomad nelja gruppi. Kontrollgrupi hiirtele manustati 0,9% NaCl ühekordse süstina. Kontrollgrupi hiired jagunesid omakorda kaheks – 10 Bl6 liini hiirt ning 10 129Sv liini hiirt. Eksperimentaalgrupile manustati 0,5 mg/kg LPS-i ühekordse i.p süstina ning grupp jagunes sarnaselt kontrollgrupile kaheks – 10 Bl6 liini hiirt ning 10 129Sv liini hiirt.

2.3.1. LPS-i mõju kehakaalule

Selleks, et võrrelda LPS-ist tingitud muutusi hiirte kehakaalus, kaaluti hiiri enne ning 24 tundi pärast LPS-i ja füsioloogilise lahuse manustamist.

24 tunni möödudes oli LPS oluliselt mõjutanud nii Bl6 kui ka 129Sv kehakaalu (mõlemal langus $p < 0,0001$). Sealjuures oli Bl6 hiirte kehakaalu langus LPS-i ja füsioloogilise lahuse vahel suurem kui 129Sv hiirtel. Nimelt 24 tundi peale LPS-i manustamist langes Bl6 hiirtel kehakaal keskmiselt 3,44 g ehk 10,36 %, 129Sv hiirtel oli langus keskmiselt 2,20 g ehk 7,52 %, samas kui keskmine kaal enne LPS-i manustamist oli mõlema hiireliini puhul sarnane. Füsioloogilist lahust saanud hiirte vahel olulist kaalumuutust ei märgatud. (Joonis 3).

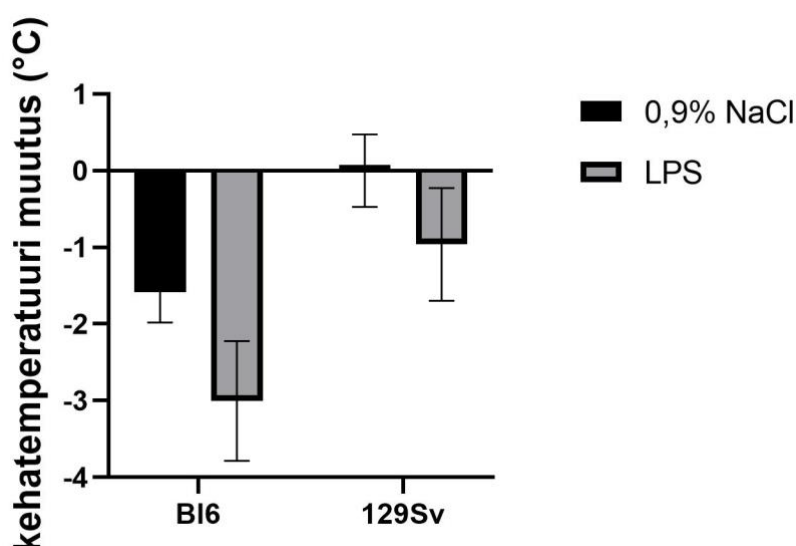


Joonis. 3 Kehakaalu muutus (%) 24 tundi peale LPS-i ja 0,9% NaCl manustamist Bl6 ja 129Sv hiirtel. Statistiliselt olulised tulemused on näidatud horisontaalse joonega, kus **** $p < 0,0001$. Tulemuste statistiliseks analüüsiks kasutati Two-way ANOVA testi testi koos Bonferroni *post hoc* testiga.

2.3.2. LPS-i mõju kehatemperatuurile

Selleks, et võrrelda LPS-ist tingitud muutusi hiirte kehatemperatuuris, mõõdeti hiirte temperatuuri enne ning 24 tundi pärast LPS-i ja füsioloogilise lahuse manustamist.

LPS-i manustamine ei kutsunud esile olulisi muutusi temperatuuris kummagi hiireliini puhul. Küll aga oli märgata tendentsi mõlemas hiireliinis, mille kohaselt LPS-i mõjul langes kehatemperatuur, kuid see muutus ei osutunud statistiliselt oluliseks. LPS-ist tingitud keskmine temperatuuri langus oli B16 hiirtel suurem ($3,00^{\circ}\text{C} \pm 0,78^{\circ}\text{C}$) kui 129Sv hiirte puhul ($0,96 \pm 0,74^{\circ}\text{C}$). Samuti võis märgata füsioloogilise lahuse puhul B16 hiirtel suuremat temperatuurimuutust kui 129Sv hiirtel, mis samuti ei osutunud statistiliselt oluliseks (Joonis 4).



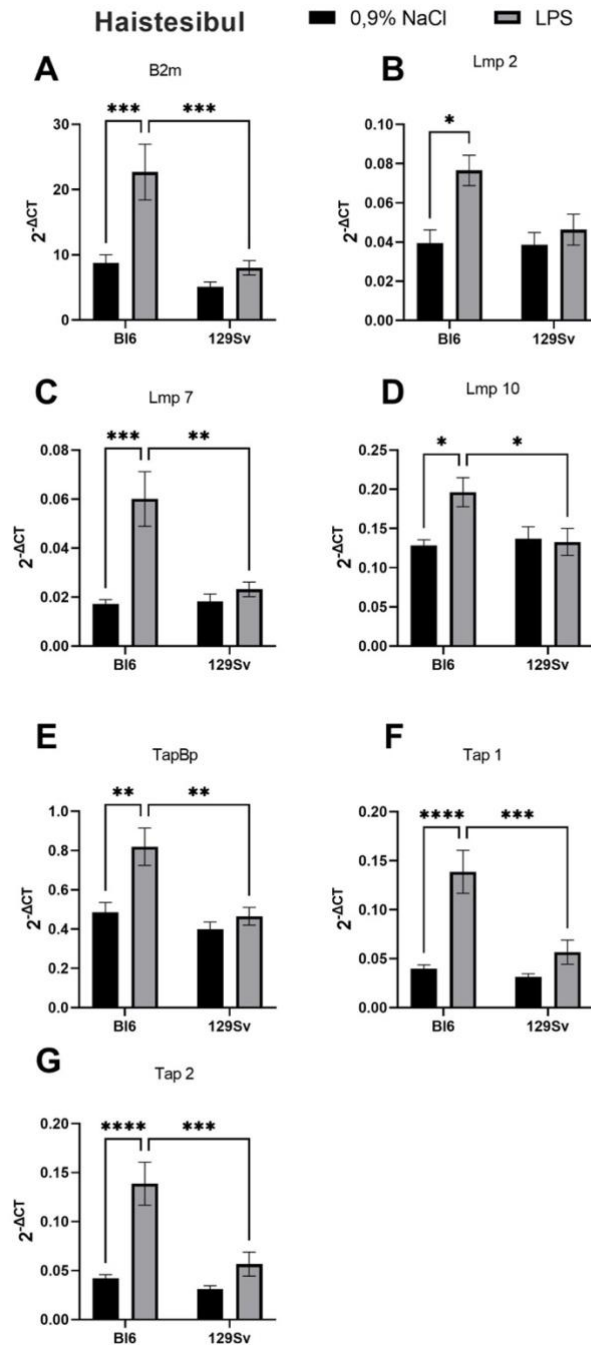
Joonis. 4 Temperatuurimuutus ($^{\circ}\text{C}$) 24 tundi peale LPS-i ja 0,9% NaCl manustamist B16 ja 129Sv hiirtel. Tulemused loeti statistiliselt oluliseks, kui $p < 0,05$. Tulemuste statistiliseks analüüsiks kasutati Two-way ANOVA testi koos Bonferroni *post hoc* testiga.

2.3.3. MHC I raja geenide ekspressioon haistesibulas

MHC I raja geenide (*Tap1*, *Tap2*, *$\beta 2m$* , *TapBp*, *Lmp2*, *Lmp7* ning *Lmp10*) ekspressiooni baastaseme erinevuste määramiseks B16 ja 129Sv hiirte vahel, võrreldi alustuseks kontrollgruppe ehk hiiri, kellele manustati füsioloogilist lahust. Haistesibulas ei esinenud ühegi geeni puhul statistiliselt olulist erinevust 129Sv ja B16 hiirte geeniekspressiooni baastasemetes.

Järgnevalt, et uurida LPS-i mõju mainitud geenide ekspressioonile haistesibulas, võrreldi geeniekspressiooni tulemusi füsioloogilist lahust ja LPS-i manustatud hiirte vahel. LPS-i manustamine põhjustas olulisi muutusi B16 hiirtel, kuid 129Sv hiirtel ei indutseerinud LPS muutusi mitte üheski geenis. LPS-i manustatud B16 hiirtel oli kõigi valitud MHC I raja geenide ekspressioon oluliselt kõrgem kui füsioloogilist lahust saanud B16 hiirtel. Kõige suuremat tõusu oli märgata geenides *Tap1* ja *Tap2* ($p < 0,0001$). Samuti esines tugev tõus geenide *$\beta 2m$* ($p < 0,001$), *Lmp7* ($p < 0,001$) ja *TapBp* ($p < 0,01$) ekspressioonis. Kõige tagasihoidlikum tõus oli *Lmp2* ($p < 0,05$) ja *Lmp10* ($p < 0,05$) geenide ekspressioonitasemes võrreldes füsioloogilist lahust saanud B16 hiirtega.

MHC I rajas uuritud seitsmest geenist haistesibulas oli kuue geeni puhul märgata statistiliselt olulist erinevust B16 ja 129Sv LPS-i saanud hiirte vahel. Kuna LPS suurendas geenide ekspressiooni B16 hiirtes, aga 129Sv hiirtes ühtegi statistiliselt olulist muutust geenide ekspressioonides ei põhjastanud, siis olid kahe hiireliini omavahelised LPS-i muutused statistiliselt olulised. (Joonis 5).



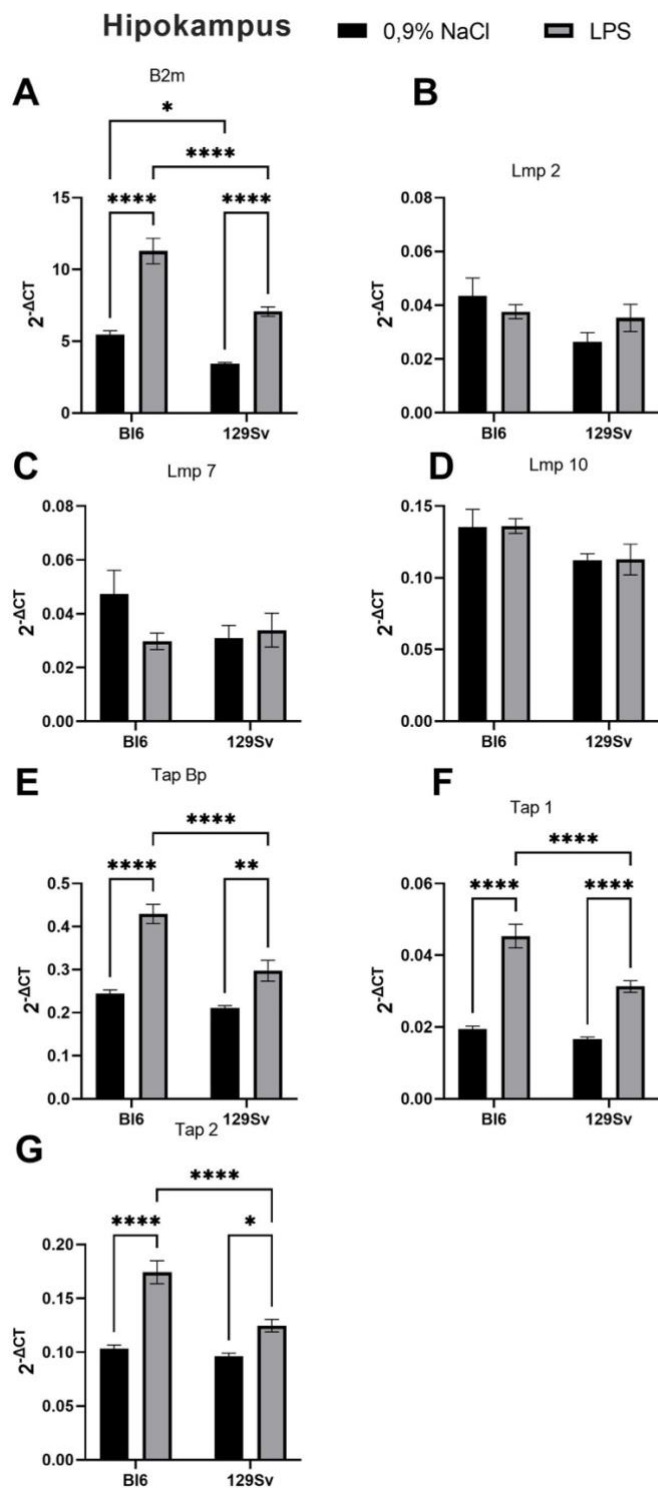
Joonis. 5 MHC I raja geenide ekspressioon haistesibulas. MHC I raja geenide: (A) $\beta 2m$, (B) *Lmp2*, (C) *Lmp7*, (D) *Lmp10*, (E) *TapBp*, (F) *Tap1* ja (G) *Tap2* ekspressioon füsioloogilist lahust (mustad tulbad) ning LPS-i (hallid tulbad) manustatud BL/6 ja 129Sv hiirte haistesibulas. Tulemused on graafikutele $2^{-\Delta CT}$ kujul koos keskmise standardveaga (mean \pm SEM). Statistiliselt olulised tulemused on näidatud horisontaalse joonega, kus * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ ja **** $p < 0,0001$. Tulemuste statistiliseks analüüsiks kasutati Two-way ANOVA testi koos Bonferroni *post hoc* testiga.

2.3.4. MHC I raja geenide ekspressioon hipokampuses

Hipokampuse puhul esines baastaseme erinevus 129Sv ja B16 hiirte vahel ainult $\beta 2m$ geeni ekspressioonis, kus $\beta 2m$ ekspressioonitase B16 hiirtel oluliselt kõrgem ($2^{-\Delta CT} = 5,464 \pm 0,86$) kui 129Sv hiirtel ($2^{-\Delta CT} = 3,447 \pm 0,24$; $p = 0,0411$).

LPS-i manustatud hiirtel oli neljas geen statistiliselt oluline ekspressiooni muutus, võrreldes hiirtega, kellele manustati füsioloogilist lahust. B16 hiirtel oli oluliselt tõusnud ekspressiooni tase $\beta 2m$, $TapBp$, $Tap1$ ja $Tap2$ geenide korral ($p < 0,0001$). Statistiliselt olulisi muutuseid ei esinenud aga üheski immunoproteasoomigeenis: $Lmp2$, $Lmp7$ ja $Lmp10$. 129Sv hiirte puhul oli samades geenides näha ekspressiooni tasemete tõusu LPS-i ja füsioloogilist lahust saanud hiirte vahel. Kõige suurem tõus esines $\beta 2m$ ja $Tap1$ geeni ekspressioonis ($p < 0,0001$). Lisaks esines tõus nii $TapBp$ geenis ($p < 0,01$) kui ka $Tap2$ geeni ekspressioonis ($p < 0,05$).

LPS-ist mõjutatud geenide puhul esines statistiliselt oluline erinevus B16 ja 129Sv LPS-i manustatud hiirte vahel ($p < 0,0001$). Nimelt kutsus LPS esile tunduvalt suurema tõusu $\beta 2m$, $TapBp$, $Tap1$ ja $Tap2$ geenide ekspressioonis B16 hiirte hipokampuses võrreldes 129Sv hiirtega (Joonis 6).



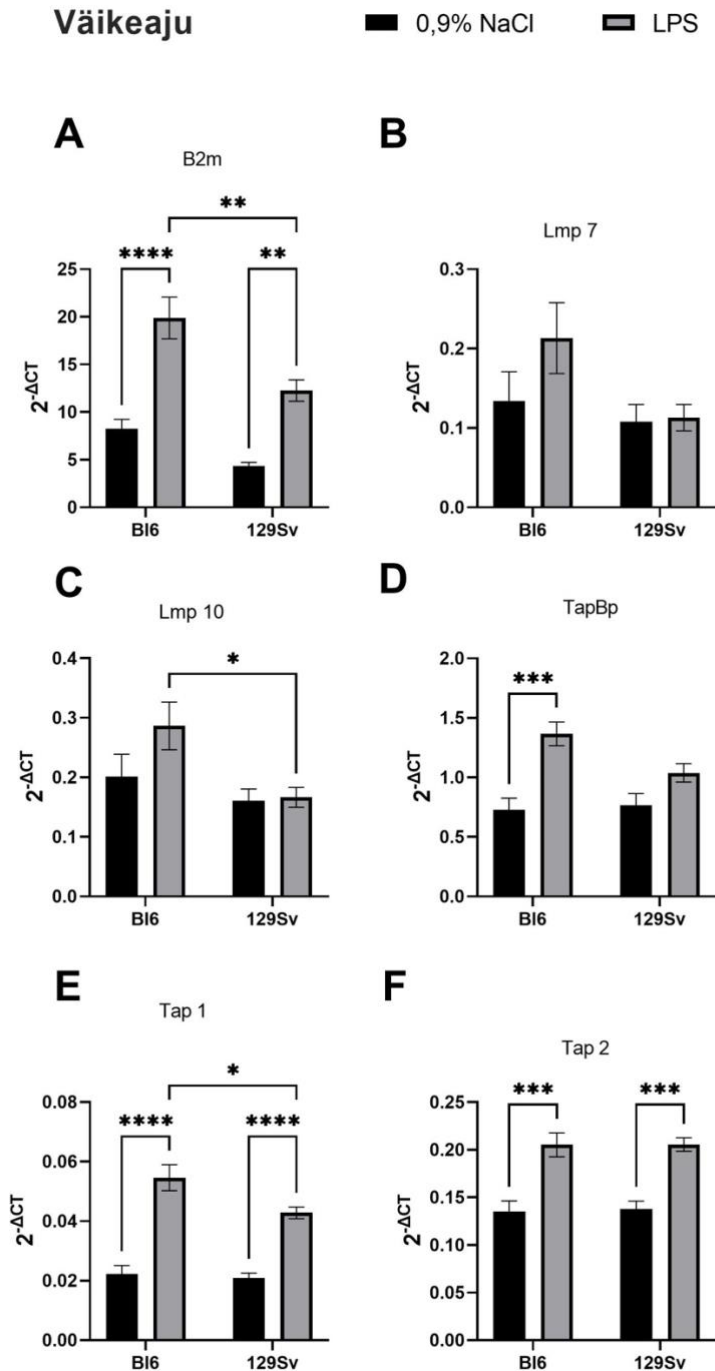
Joonis. 6 MHC I raja geenide ekspressioon hipokampuses. MHC I raja geenide: (A) $\beta 2m$, (B) *Lmp2*, (C) *Lmp7*, (D) *Lmp10*, (E) *TapBp*, (F) *Tap1* ja (G) *Tap2* ekspressioon füsioloogilist lahust (mustad tulbad) ning LPS-i (hallid tulbad) manustatud B16 ja 129Sv hiirte hipokampuses. Tulemused on graafikutele $2^{-\Delta CT}$ kujul koos keskmise standardveaga (mean \pm SEM). Statistiliselt olulised tulemused on näidatud horisontaalse joonega, kus * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, ja **** $p < 0,0001$. Tulemuste statistiliseks analüüsiks kasutati Two-way ANOVA testi koos Bonferroni *post hoc* testiga.

2.3.5. MHC I raja geenide ekspressioon väikeajus

Väikeajus ei esinenud ühegi geeni puhul füsioloogilist lahust saanud 129Sv ja B16 hiirte vahel statistiliselt olulist erinevust. Teistest kudedest oli väikeaju erinev, kuna seal ei esinenud *Lmp2* geeni ekspressiooni. Vaadeldes *Lmp7* geeni, ei esinenud ühtegi statistiliselt olulist muutust nii 129Sv kui ka B16 hiireliinil, seda nii füsioloogilise lahuse ning LPS-i manustamise korral.

LPS-i manustamine kutsus B16 hiirtel esile statistiliselt olulise tõusu võrreldes füsioloogilist lahust saanud hiirtega neljas geenis seitsmest. Kõige suurem tõus esines $\beta 2m$ ja *Tap1* geenide ekspressioonis ($p < 0,0001$). Madalam geeniekspressiooni tõus esines *TapBp* ja *Tap2* geenides ($p < 0,001$). 129Sv hiirte puhul oli olulist muutust näha LPS-i saanud hiirte ja füsioloogilist lahust saanud hiirte vahel kolmes geenis kuuest. Kõige suurem geeniekspressiooni tõus esines *Tap1* geenis ($p < 0,0001$). Geeniekspressiooni tõusu oli näha ka *Tap 2* ($p < 0,001$) ja $\beta 2m$ ($p < 0,001$) geenide korral.

Kolme MHC I rajas osaleva geeni puhul oli näha, et LPS-i manustamise järgselt olid geenid kõrgemalt ekspresseerunud B16 hiirtel kui 129Sv hiirtel. Kõige suurem erinevus oli $\beta 2m$ geeni korral ($p < 0,01$), kus B16 hiirtel $\beta 2m$ oli kõrgemini ekspresseerunud LPS-i manustamise korral kui 129Sv hiirtel. Samuti olid oluliselt kõrgemalt ekspresseerunud B16 hiirtel *Tap1* ja *Lmp10* kui 129Sv hiirtel ($p < 0,05$) LPS-i manustamise järgselt. Kuigi LPS ei kutsunud esile statistiliselt olulist muutust *Lmp10* geeni ekspressioonis, oli ekspressioonitase B16 hiirtel oluliselt kõrgem LPS-i manustamise järgselt. Sellest tulenevalt esines ka oluline liinidevaheline erinevus LPS-i gruppide vahel (Joonis 7).



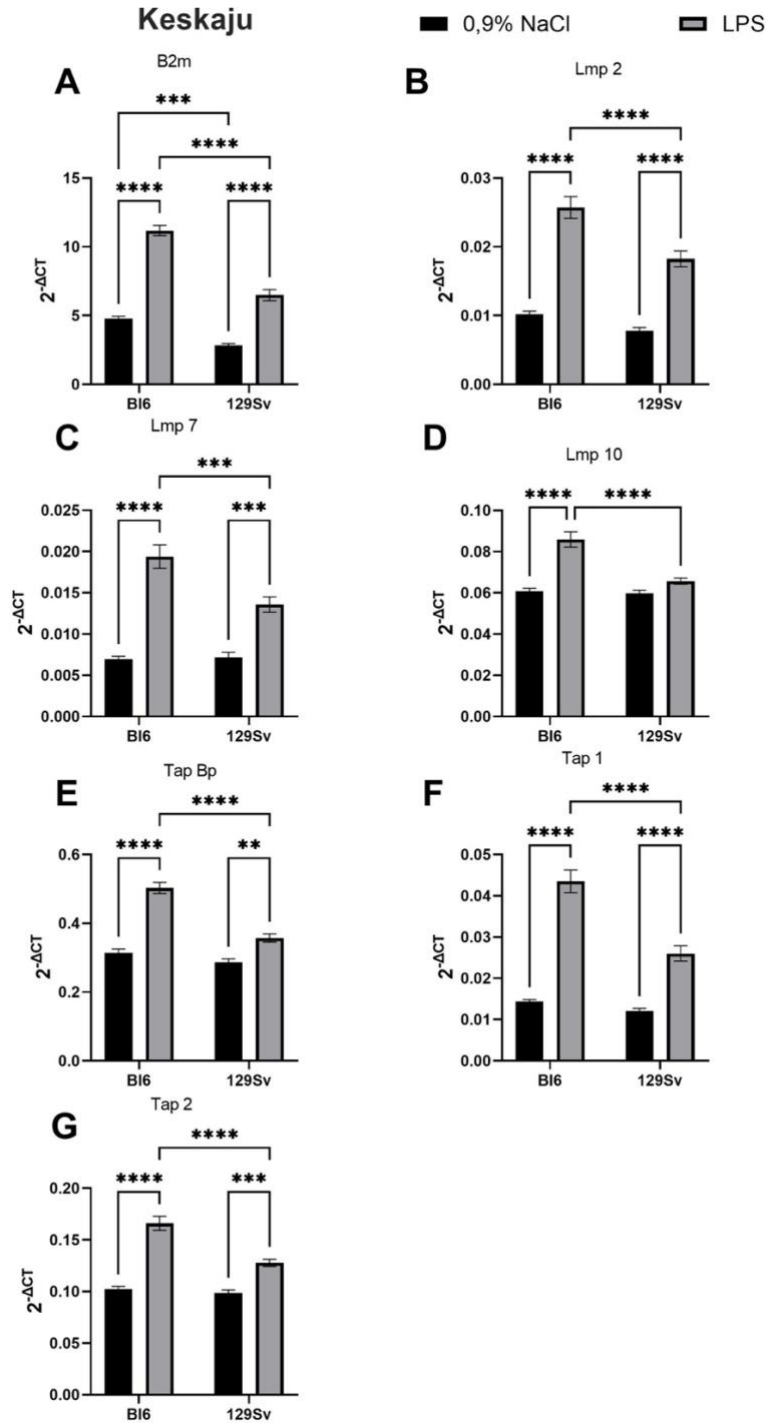
Joonis. 7 MHC I raja geenide ekspressioon väikeajus. MHC I raja geenide: (A) $\beta 2m$, (B) *Lmp7*, (C) *Lmp 10*, (D) *TapBp*, (E) *Tap 1* ja (F) *Tap2* ekspressioon füsioloogilist lahust (mustad tulbad) ning LPS-i (hallid tulbad) manustatud Bi6 ja 129Sv hiirte väikeajus. Tulemused on graafikutele $2^{-\Delta CT}$ kujul koos keskmise standardveaga (mean \pm SEM). Statistiliselt olulised tulemused on näidatud horisontaalse joonega, kus * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ ja **** $p < 0,0001$. Tulemuste statistiliseks analüüsiks kasutati Two-way ANOVA testi koos Bonferroni *post hoc* testiga.

2.3.4. MHC I raja geenide ekspressioon keskajus

Keskajus ei esinenud enamike geenide puhul statistiliselt olulisi erinevusi 129Sv ja B16 hiirte baastasemetes. Küll aga oli erinevus ühe geenis, $\beta 2m$ ekspressioonitase oli B16 hiirtel oluliselt kõrgem ($2^{-\Delta CT} = 4,79 \pm 0,15$) kui 129Sv hiirtel ($2^{-\Delta CT} = 2,848 \pm 0,12$; $p < 0,0001$).

Võrreldes kontrollgrupiga, kutsus LPS esile B16 hiirte puhul statistiliselt olulise tõusu kõigis seitsmes MHC I raja geeniekspressioonis (kõikide geenide puhul $p < 0,0001$). 129Sv hiirte puhul olid LPS-i manustamise järgselt oluliselt üles reguleeritud 6 geeni: *Lmp2*, *Tap1* ja $\beta 2m$ ($p < 0,0001$); *Lmp7* ($p < 0,001$), *Tap2* ($p < 0,001$) ja *TapBp* ($p < 0,01$). Kõige suurem iseärasus keskajus oli *Lmp10* geeniekspressiooni taseme muutuses, kus LPS-i manustamine kutsus esile tugeva tõusu B16 hiirtes ($p < 0,0001$) võrreldes kontrollgrupiga, samas kui 129Sv hiirte puhul statistiliselt olulist muutust LPS esile ei kutsunud.

Kõikide MHC I rajas osalevate geenide puhul oli märgata statistiliselt olulist erinevust B16 ja 129Sv LPS-i manustatud hiirte vahel. Väga suurt LPS-i indutseeritud erinevust ($p < 0,0001$) 129Sv ja B16 hiirte vahel oli näha $\beta 2m$, *Lmp2*, *Lmp10*, *TapBp*, *Tap1* ja *Tap2* geenide ekspressiooni korral, kus kõikidel juhtudel oli B16 hiirtes geenide ekspressiooni tase kõrgem võrreldes 129Sv hiirtega. Erinevus esines *Lmp7* geeniekspressiooni korral. Taaskord oli geeniekspressiooni tase kõrgem B16 hiirtel võrreldes 129Sv hiirtega (Joonis 8).



Joonis. 8 MHC I raja geenide ekspressioon keskajus. MHC I raja geenide: (A) $\beta 2m$, (B) *Lmp2*, (C) *Lmp7*, (D) *Lmp 10*, (E) *TapBp*, (F) *Tap 1* ja (G) *Tap2* ekspressioon füsioloogilist lahust (mustad tulbad) ning LPS-i (hallid tulbad) manustatud B16 ja 129Sv hiirte keskajus. Tulemused on graafikutel $2^{-\Delta CT}$ kujul koos keskmise standardveaga (mean \pm SEM). Statistiliselt olulised tulemused on näidatud horisontaalse joonega, kus *** $p < 0,001$ ja **** $p < 0,0001$. Tulemuste statistiliseks analüüsiks kasutati Two-way ANOVA testi koos Bonferroni *post hoc* testiga.

2.4 Arutelu

Antud töö põhieesmärgiks oli võrrelda muutusi MHC I rajas osalevate geenide ekspressioonis, B16 ja 129Sv hiirte erinevates ajuosades, peale põletikulise seisundi indutseerimist lipopolüsahhariidiga. Täpsemalt uurit *TapBp* ehk tapasiini kodeerivat geeni, $\beta 2m$, transporterkompleksi *Tap1*, *Tap2* geene ning immunoproteasoomigeene *Lmp2*, *Lmp7* ja *Lmp10*. Võrreldi nende geenide ekspressiooni baastasemeid ning LPS-i manustamisest tingitud muutusi haistesibulas, hipokampus, väikeajus ja ventraalses keskajus. Lisaks uuriti ka LPS-i mõju kehakaalule ja temperatuurile. Gram-negatiivse bakteri toksiini, lipopolüsahhariidi (LPS-i), on immunoloogilistes uuringutes laialdaselt kasutatud nii perifeerselt indutseeritud neuroinflammatsiooni kui ka näriliste depressioonilaadse käitumise modelleerimisel (Singh and Jiang, 2004; Vargas-Caraveo et al., 2017). Seni on vähe uuritud hiireliinide vahelisi erinevusi põletikulises seisundis. Täheldatud on nende erinevat vastupanuvõimet patogeenide korral. Gripiviiruse puhul tekib 129Sv hiirtel tugev põletikutsütokiinide vastus ning nad võivad infektsiooni tõttu surra, seevastu B16 hiirtel on põletikuliste tsütokiinide vastus pigem tagasihoidlik ja loomad saavad nakkusega tõhusalt hakkama (Davidson et al., 2014). Antud magistritöö eesmärk oli uurida võimalikke erinevusi põletikuliste protsessidega toimetulekul B16 ja 129Sv hiireliinide vahel 24 tundi pärast LPS-i manustamist.

LPS-i manustamine põhjustas nii B16 kui ka 129Sv hiirte kehatemperatuuris languse, kuid antud erinevus ei osutunud statistiliselt oluliseks. B16 hiirte kehatemperatuur langes madalamale kui 129Sv hiirtel. LPS-ist tingitud keskmine temperatuurilangus oli B16 hiirtel $3,00\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,78\text{ }^{\circ}\text{C}$ ning 129Sv hiirte puhul $0,96\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,74\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ka varasemalt on nähtud hiirtes sarnast efekti, kus LPS kutsub esile hüpotermilise reaktsiooni. Näiteks on tehtud kehatemperatuuri mõõtmised 1,5 tundi peale LPS-i manustamist, mil põletik on veel varajases staadiumis ja 24 tundi peale LPS-i manustamist, kus esineb hiline põletikureaktsioon. 129Sv hiirte puhul nähti suuremat kehatemperatuuri langust kui B16 hiirtel 1,5 tunni möödumisel LPS-i manustamisest. Põletiku progresseerudes normaliseerus nende kehatemperatuur, samas kui B16 hiirtel oli kehatemperatuur püsivalt madal. (Piirsalu et al., 2020)

Patoloogilistes tingimustes on organismil immuunvastuse käivitamiseks vaja lisaenergiat. Seega on vaja energiat süsteemide vahel ümber jaotada, mis viib hüpometaabolismi tekkeni. Hiljutine uuring näitas põletiku poolt põhjustatud hüpotermiat kui hüpometaabolismi

esilekutsumise strateegiat, mis on oluline peremeesorganismi tolerantsuse ja ellujäämise jaoks (Ganeshan et al., 2019). See võib tähendada, et B16 hiired tulevad infektsioonidega paremini toime, kuna 129Sv hiirtes toimub kehatemperatuuri kõikumine, samas kui B16 hiired suudavad hoida püsivalt madalat temperatuuri, mis soodustab hüpometabolismi ja immuunsüsteemile vajamineva lisaenergia teket.

Samuti kutsus LPS esile tugeva kehakaalu languse mõlemas hiireliinis. B16 hiirte kehakaalu langus oli 10,36 %, samas kui 129Sv hiirtel oli kehakaal langenud 7,52 %. Lisaks oli B16 hiirte kehakaal tunduvalt rohkem langenud, kui 129Sv hiirtel. Sellist LPS-i põhjustatud muutust B16 ja 129Sv hiirte kehakaalule on täheldatud ka varem, kus peale LPS-i manustamist mõlemas hiireliinis kehakaal oluliselt langes ning samuti täheldati suuremat kehakaalu langust B16 hiirtes võrreldes 129Sv hiirtega (Piirsalu et al., 2020). Uuringud on näidanud ka, et LPS-i manustamine vähendab oluliselt B16 hiirte toidutarbimist (Kim et al., 2013), 18 tunnise näljaperioodi vältel on B16 hiirtel täheldatud juba 16% kehakaalu langust (Ayala et al., 2006). See võib immuunvastuse kontekstis olla B16 hiirtele suureks eeliseks, kui eeldada, et kaalulangus on seotud hüpometabolismi tekkega. Seega võib suurem kaalulangus B16 hiirtel näidata paremat vastupanuvõimet võrreldes 129Sv hiirtega. Seda toetab ka teadmine, et 129Sv hiirtel hüpometaboolset vastust LPS-i manustamise järgselt ei esine (Piirsalu et al., 2020).

MHC I rajas osalevate geenide ekspressiooni muutuste tulemused näitasid, et LPS põhjustas kõikides kudedes muutuseid B16 hiirtes. 129Sv hiirte puhul oli MHC I geenide ekspressiooni näha väikeajus, keskajus ja hipokampuses. Haistesibulal ei esinenud aga ühtegi statistiliselt olulist LPS-i indutseeritud geeniekspressiooni muutust. LPS-i suurendavat mõju MHC I raja geenide ekspressioonile kinnitavad ka varasemad uuringud, kus on näha, et LPS kutsus esile tõusu kõikides MHC I raja komponentides (MacAry et al., 2001). Huvitav oli see, et keskajus ja hipokampuses oli 0,9% NaCl lahust saanud 129Sv ja B16 $\beta 2m$ geeni ekspressioon erinev, kus B16 hiireliinis on ekspressiooni tase kõrgem kui 129Sv hiirtes. See tähendab, et keskajus ja hipokampuses on 129Sv ja B16 hiireliini $\beta 2m$ geeni ekspressioon teistsugune. Täpsemaid põhjuseid selle taga ei ole teada.

Ajustruktuur, kus esines kõige rohkem muutuseid MHC I rajas osalevate geenide ekspressiooni tasemes oli keskaju. Seal oli näha LPS-i saanud 129Sv hiirte suurenenud geenide ekspressiooni

taset võrreldes füsioloogilist lahust saanud 129Sv hiirtega, kui ka LPS-i saanud B16 hiirte suurenenud taset geenide ekspresseerimises võrreldes füsioloogilist lahust saanud B16 hiirtega. Erandiks oli *Lmp10*, kus 129Sv hiirtel LPS olulist muutust ei põhjustanud. Erinevalt teistest ajustruktuuridest, ei toimunud väikeajus *Lmp2* geeniekspressiooni, kuid ka teistes ajuosades oli antud geeni ekspresseerimine madal. Ka varasemates uuringutes on saadud, et *Lmp2* geeni ekspresseerimine on madalam kui näiteks *Lmp7* ekspresseerimise tase. Erinevus võib tulla sellest, et MHC I klassi pinna ekspresseerimise tase on seotud *Lmp7* geeniekspressiooniga ning *Lmp2* seda taset oluliselt ei mõjuta (Kang et al., 2000). Kõige kõrgemat ekspresseerimise mõlemas hiireliinis andis $\beta 2m$. Uuringud näitavad, et $\beta 2m$ on väga oluline roll nii MHC I rajas kui ka üldises immuunsüsteemis (Li et al., 2016).

Ainuke ajustruktuur, kus 129Sv hiirtes LPS-i manustamine ei põhjustanud ühtegi statistiliselt olulist muutust geeniekspressioonides oli haistesibul. Seevastu B16 hiirte puhul olid üles reguleeritud kõik geenid peale LPS-i manustamist. Haistesibul on seotud haistmisega, saates edasi haistmisteavet amügdalasse, frontaalsesse ajukoorda ja hipokampusse, kus see edasi mõjutab juba emotsioone, mälu ja õppimisvõimet (Moon et al., 2014). Seega on hiirte haistesibulal väga oluline roll. See, et B16 hiirtel oli LPS-i manustamise järgselt näha kõikide MHC I rajas osalevate geenide kõrgeenenud ekspresseerimise, samas kui LPS-i manustamine ei põhjustanud märkimisväärsed muutused 129Sv hiirte geenide ekspresseerimises, kinnitab MHC I geenide suuremat ekspresseerimist.

LPS-ist tingitud oluliselt suurem tõus B16 hiirte MHC I rajas osalevate geenide ekspresseerimises võib olla üheks põhjuseks, miks B16 hiired tulevad paremini toime infektsioonidega. Kuna organismi nakatumisel viirusega aktiveeritakse MHC I geenide ekspresseerimine ja transport raku pinnale (Antoniou and Powis, 2008; Wang et al., 2008; Revilla et al., 2011). Seega omavad MHC I molekulid olulist rolli organismi immuunvastuses juhul kui peremeesorganism nakatub viirusega (Hewitt, 2003). Samuti on täheldatud, et MHC I kompleksi geenide ekspresseerimise taseme vähenemisega on inimestel suurenenud melanoomi tase (Garrido et al., 2012). Eelnevast võib järeldada, et B16 ja 129Sv hiirte erinevused immuunsüsteemis võivad osaliselt olla seotud MHC I rajas osalevate geenide ekspresseerimisega. Seda selle tõttu, et B16 hiirtes, mida oli indutseeritud LPS-i poolt, oli kõrgem MHC I ekspresseerimine kui 129Sv hiirtes. See seletaks ka, miks B16 hiired on infektsioonidele vastupidavamad kui 129Sv hiired.

TÄNUSÕNAD

Soovin kindlasti väga tänada oma juhendajat Maria Piirsalu, kes oli mulle magistritöö koostamisel igati toeks ning õpetas mulle väga palju uut ja huvitavat ning suutis mulle tekitada väga suure huvi neuroteaduste vastu. Aitäh, et olid alati nii kannatlik, mõistev, abivalmis ja kõige rohkem - aitäh, et uskusid minusse. Lisaks tahan väga tänada Eero Vasarat, kes mind enda teadusrühma soojalt vastu võttis ning mulle nii huvitava teema leidis. Samuti olen tänulik Kesrti Lillevälile, kes jagas omapoolseid soovitusi. Viimaseks soovin tänanada oma lähedasi - pere ja sõpru, kes mulle pidevalt toeks olid.

KOKKUVÕTE

Organismi homöostaasi hoidmisel on immuunsüsteemil oluline roll. Neuroimmuunsüsteemi ülesandeks on kaitsta neuroneid patogeenide eest. Põletiku reguleerimisel osalevad mikroglia rakud, mis on põhilised immuunsüsteemi rakud ajus (Morales et al., 2016). Lisaks on põletiku korral aktiveeritud NF- κ B rada ja MHC-I kompleks. Kuna neuroinflammatsiooni seostatakse mitmete neuroloogiliste haigustega nagu depressioon (Welcome, 2020), migreen (Edvinsson et al., 2019) või epilepsia (Vezzani et al., 2019), on oluline mõista sellega seotud mehhanisme. 129Sv ja B16 hiireliinid on võimaldanud võrrelda nii kognitiivseid (Raud et al., 2007; Abramov et al., 2008; Heinla et al., 2014) kui ka metaboolseid erinevusi (Ganeshan et al., 2019; Piirsalu et al., 2020). Samuti on nende vastupanu võime erinev gripiviiruse korral (Davidson et al., 2014), mis võimaldab uurida nende erinevusi immuunvastuses.

Käesoleva magistr töö eesmärk oli analüüsida MHC I rajaga seotud geenide ekspressiooni B16 ja 129Sv hiireliinide hipokampus, väikeajus, keskajus ja haistesibulas, Lisaks võrreldi LPS-i mõju kaalule ja kehatemperatuurile.

Läbiviidud katsete tulemused näitasid, et LPS-i manustamise järgselt esines nii 129Sv kui ka B16 hiirtel langus kehatemperatuur ja kaalus. Suurem langus esines B16 hiirtel, mida on täheldatud ka teistes uuringutes. (Ganeshan et al., 2019; Piirsalu et al., 2020). Erinevusi esines ka gripiviirusega, kus B16 tulevad infektsiooniga paremini toime ja on harvemini raskelt haiged võrreldes 129Sv hiirtega (Davidson et al., 2014). Kaalu ja temperatuuri langust ning paremat vastupanu võimet viirusele B16 hiirtes võib seostada hüpometablismiga (Ganeshan et al., 2019; Piirsalu et al., 2020). Samuti näitasid MHC I raja geenide ekspressiooni võrdlusuuringud, et kõikides ajukudedes on B16 hiirte puhul geeniekspressiooni muutused peale LPS-i manustamist tunduvalt suuremad kui 129Sv puhul. Seega võib tulemustest järeldada, et 129Sv ja B16 hiirtes esinevad olulised erinevused nende immuunsüsteemis ning neuroinflammatoorsetes mudelites on B16 hiirtel tugevam immuunvastus, millest tulenevalt nad saavad paremini hakkama infektsiooniga võitlemisel.

Comparative study of the expression of genes involved in MHC I in different brain structures of 129Sv and Bl6 mice in a lipopolysaccharide-induced neuroinflammatory model

Summary

Johanna Liis Udumets

There have been many studies that compare various medical aspects of 129Sv and Bl6 mouse lines. The lines exhibit both behavioural and genetic differences. For example, the 129Sv mice have lower locomotor activity and increased anxiety, whereas Bl6 mice are less agitated and more mobile. Dissimilarities have also been observed with the administration of different substances. For instance, amphetamine caused the Bl6's locomotor activity to be more stimulated than 129Sv's. These differences may relate to a frameshift mutation in the *Disc-1* gene. Differences have also been found in their metabolism as well as responses to certain pathogens, such as the influenza virus which caused the 129Sv mice to become more ill when infected. Important mechanisms in the immune response in case of inflammation are microglia cells, the $\text{Nf-}\kappa\text{B}$ pathway, and the MHC I complex. However, there have not been many studies around the immune response mechanisms in the aforementioned mouse lines. Additionally, since neuroinflammation is the cause of many diseases, such as depression, epilepsy, and migraine, this master's thesis' aim is to understand those immune responses better in the 129Sv and Bl6 lines by surveying the expression of MHC I pathway genes in different brain tissues.

The main genes in the MHC I pathway are *b2m*, *Lmp2*, *Lmp7*, *Lmp 10*, *Tap Bp*, *Tap 1*, and *Tap 2* which were examined in two different mouse strains C56 BL6 Tac (Bl6; n = 20) and 129S6/SvEvTac (129Sv; n = 20). An inflammation model was induced by using lipopolysaccharide. The mice of both strains were divided into two groupings: the saline group and the inflammatory group. After the experiment sample tissues were collected and gene expression was measured using RT-qPCR. The main objectives of this study were to determine the levels of gene expression and to compare this found data between the study groups. The results showed that the most significant changes occurred in the midbrain, with Bl6 mice exhibiting changes in the expression levels of all genes when LPS was administered. Gene expression in all the MHC I components were higher in Bl6 mice receiving LPS compared to 129Sv mice. These results demonstrated that high expression of MHC I pathway genes in Bl6 mice compared to 129Sv mice may be strongly associated with resistance in mice.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Abramov, U., Puussaar, T., Raud, S., Kurrikoff, K., and Vasar, E. (2008). Behavioural differences between C57BL/6 and 129S6/SvEv strains are reinforced by environmental enrichment. *Neurosci. Lett.* 443, 223–227. doi:10.1016/j.neulet.2008.07.075.
- Agostinho, P., Cunha, R. a, and Oliveira, C. (2010). Neuroinflammation , Oxidative Stress and the Pathogenesis of Alzheimer ' s Disease. *Curr. Pharmaceutical Des.* 16, 2766–2778.
- Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006). Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* 124, 783–801. doi:10.1016/j.cell.2006.02.015.
- Antoniou, A. N., and Powis, S. J. (2008). Pathogen evasion strategies for the major histocompatibility complex class I assembly pathway. *Immunology* 124, 1–12. doi:10.1111/j.1365-2567.2008.02804.x.
- Apostolopoulos, V., Yuriev, E., Lazoura, E., Yu, M., and Ramsland, P. A. (2008). MHC and MHC-like molecules: Structural perspectives on the design of molecular vaccines. *Hum. Vaccin.* 4, 400–409. doi:10.4161/hv.4.6.6690.
- Ayala, J. E., Bracy, D. P., McGuinness, O. P., and Wasserman, D. H. (2006). Considerations in the Design of Hyperinsulinemic-Euglycemic Clamps in the Conscious Mouse. *Diabetes* 55, 390–397. doi:10.2337/diabetes.55.02.06.db05-0686.
- Banks, W. A., Gray, A. M., Erickson, M. A., Salameh, T. S., Damodarasamy, M., Sheibani, N., et al. (2015). Lipopolysaccharide-induced blood-brain barrier disruption: roles of cyclooxygenase, oxidative stress, neuroinflammation, and elements of the neurovascular unit. *J. Neuroinflammation* 12, 223. doi:10.1186/s12974-015-0434-1.
- Bazan, N. G., Halabi, A., Ertel, M., and Petasis, N. A. (2012). “Neuroinflammation,” in *Basic Neurochemistry* (Elsevier), 610–620. doi:10.1016/B978-0-12-374947-5.00034-1.
- Beck, J. A., Lloyd, S., Hafezparast, M., Lennon-Pierce, M., Eppig, J. T., Festing, M. F. W., et al. (2000). Genealogies of mouse inbred strains. *Nat. Genet.* 24, 23–25. doi:10.1038/71641.
- Cebrián, C., Loike, J. D., and Sulzer, D. (2014). Neuronal mhc-i expression and its implications in synaptic function, Axonal regeneration and parkinson's and other brain diseases. *Front. Neuroanat.* 8, 1–9. doi:10.3389/fnana.2014.00114.

- Chen, R., Zhang, M., Park, S., and Gnegy, M. E. (2007). C57BL/6J mice show greater amphetamine-induced locomotor activation and dopamine efflux in the striatum than 129S2/SvHsd mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 87, 158–163. doi:10.1016/j.pbb.2007.04.012.
- Chia, R., Achilli, F., Festing, M. F. W., and Fisher, E. M. C. (2005). The origins and uses of mouse outbred stocks. *Nat. Genet.* 37, 1181–1186. doi:10.1038/ng1665.
- Crabbe, J. C., Wahlsten, D., and Bruce C. Dudek (1999). Genetics of Mouse Behavior: Interactions with Laboratory Environment. *Science (80-.)*. 284, 1670–1672. doi:10.1126/science.284.5420.1670.
- Dantzer, R. (2018). Neuroimmune Interactions: From the Brain to the Immune System and Vice Versa. *Physiol. Rev.* 98, 477–504. doi:10.1152/physrev.00039.2016.
- Davidson, S., Crotta, S., McCabe, T. M., and Wack, A. (2014). Pathogenic potential of interferon $\alpha\beta$ in acute influenza infection. *Nat. Commun.* 5, 5–7. doi:10.1038/ncomms4864.
- Davis, B. M., Salinas-Navarro, M., Cordeiro, M. F., Moons, L., and De Groef, L. (2017). Characterizing microglia activation: a spatial statistics approach to maximize information extraction. *Sci. Rep.* 7, 1576. doi:10.1038/s41598-017-01747-8.
- DiSabato, D. J., Quan, N., and Godbout, J. P. (2016). Neuroinflammation: the devil is in the details. *J. Neurochem.* 139, 136–153. doi:10.1111/jnc.13607.
- Edvinsson, L., Haanes, K. A., and Warfvinge, K. (2019). Does inflammation have a role in migraine? *Nat. Rev. Neurol.* 15, 483–490. doi:10.1038/s41582-019-0216-y.
- Faure, E., Equils, O., Sieling, P. A., Thomas, L., Zhang, F. X., Kirschning, C. J., et al. (2000). Bacterial Lipopolysaccharide Activates NF- κ B through Toll-like Receptor 4 (TLR-4) in Cultured Human Dermal Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.* 275, 11058–11063. doi:10.1074/jbc.275.15.11058.
- Ferrington, D. A., and Gregerson, D. S. (2012). “Immunoproteasomes,” in *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 75–112. doi:10.1016/B978-0-12-397863-9.00003-1.
- Gadani, S. P., Cronk, J. C., Norris, G. T., and Kipnis, J. (2012). IL-4 in the Brain: A Cytokine To Remember. *J. Immunol.* 189, 4213–4219. doi:10.4049/jimmunol.1202246.

- Ganeshan, K., Nikkanen, J., Man, K., Leong, Y. A., Sogawa, Y., Maschek, J. A., et al. (2019). Energetic Trade-Offs and Hypometabolic States Promote Disease Tolerance. *Cell* 177, 399-413.e12. doi:10.1016/j.cell.2019.01.050.
- Gao, J., Scheenstra, M. R., van Dijk, A., Veldhuizen, E. J. A., and Haagsman, H. P. (2018). A new and efficient culture method for porcine bone marrow-derived M1- and M2-polarized macrophages. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 200, 7–15. doi:10.1016/j.vetimm.2018.04.002.
- Garrido, C., Paco, L., Romero, I., Berruguilla, E., Stefansky, J., Collado, A., et al. (2012). MHC class I molecules act as tumor suppressor genes regulating the cell cycle gene expression, invasion and intrinsic tumorigenicity of melanoma cells. *Carcinogenesis* 33, 687–693. doi:10.1093/carcin/bgr318.
- Gomez-Nicola, D., Fransen, N. L., Suzzi, S., and Perry, V. H. (2013). Regulation of Microglial Proliferation during Chronic Neurodegeneration. *J. Neurosci.* 33, 2481–2493. doi:10.1523/JNEUROSCI.4440-12.2013.
- Groettrup, M., Kirk, C. J., and Basler, M. (2010). Proteasomes in immune cells: more than peptide producers? *Nat. Rev. Immunol.* 10, 73–78. doi:10.1038/nri2687.
- Hammond, T. R., Robinton, D., and Stevens, B. (2018). Microglia and the Brain: Complementary Partners in Development and Disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 34, 523–544. doi:10.1146/annurev-cellbio-100616-060509.
- Hanisch, U. K. (2014). “Microglia,” in *Encyclopedia of the Neurological Sciences*, 3–5. doi:10.1016/B978-0-12-385157-4.00184-6.
- Heinla, I., Leidmaa, E., Visnapuu, T., Philips, M. A., and Vasar, E. (2014). Enrichment and individual housing reinforce the differences in aggressiveness and amphetamine response in 129S6/SvEv and C57BL/6 strains. *Behav. Brain Res.* 267, 66–73. doi:10.1016/j.bbr.2014.03.024.
- Hewitt, E. W. (2003). The MHC class I antigen presentation pathway: Strategies for viral immune evasion. *Immunology* 110, 163–169. doi:10.1046/j.1365-2567.2003.01738.x.
- Himmerich, H., Patsalos, O., Lichtblau, N., Ibrahim, M. A. A., and Dalton, B. (2019). Cytokine research in depression: Principles, challenges, and open questions. *Front. Psychiatry* 10. doi:10.3389/fpsy.2019.00030.
- Jack, C. S., Arbour, N., Manusow, J., Montgrain, V., Blain, M., McCrea, E., et al. (2005).

- TLR Signaling Tailors Innate Immune Responses in Human Microglia and Astrocytes. *J. Immunol.* 175, 4320–4330. doi:10.4049/jimmunol.175.7.4320.
- JACOBS, P. A., BRUNTON, M., FRACKIEWICZ, A., NEWTON, M., COOK, P. J. L., and ROBSON, E. B. (1970). Studies on a family with three cytogenetic markers. *Ann. Hum. Genet.* 33, 325–336. doi:10.1111/j.1469-1809.1970.tb01658.x.
- Kafkafi, N., Benjamini, Y., Sakov, A., Elmer, G. I., and Golani, I. (2005). Genotype-environment interactions in mouse behavior: A way out of the problem. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 4619–4624. doi:10.1073/pnas.0409554102.
- Kamiya, A., Kubo, K., Tomoda, T., Takaki, M., Youn, R., Ozeki, Y., et al. (2005). A schizophrenia-associated mutation of DISC1 perturbs cerebral cortex development. *Nat. Cell Biol.* 7, 1167–1178. doi:10.1038/ncb1328.
- Kang, J. K., Yoon, S. J., Kim, N. K., and Heo, D. S. (2000). The expression of MHC class I, TAP1/2, and LMP2/7 gene in human gastric cancer cell lines. *Int. J. Oncol.* 27. doi:10.3892/ijo.16.6.1159.
- Kim, K. K., Jin, S. H., and Lee, B. J. (2013). Herpes Virus Entry Mediator Signaling in the Brain Is Imperative in Acute Inflammation-Induced Anorexia and Body Weight Loss. *Endocrinol. Metab.* 28, 214. doi:10.3803/EnM.2013.28.3.214.
- Koike, H., Arguello, P. A., Kvajo, M., Karayiorgou, M., and Gogos, J. A. (2006). Disc1 is mutated in the 129S6/SvEv strain and modulates working memory in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 3693–3697. doi:10.1073/pnas.0511189103.
- Li, L., Dong, M., and Wang, X.-G. (2016). The Implication and Significance of Beta 2 Microglobulin. *Chin. Med. J. (Engl.)* 129, 448–455. doi:10.4103/0366-6999.176084.
- Li, Z., Ma, L., Kuleskaya, N., Vöikar, V., and Tian, L. (2014). Microglia are polarized to M1 type in high-anxiety inbred mice in response to lipopolysaccharide challenge. *Brain. Behav. Immun.* 38, 237–248. doi:10.1016/j.bbi.2014.02.008.
- Lindå, H., Hammarberg, H., Piehl, F., Khademi, M., and Olsson, T. (1999). Expression of MHC class I heavy chain and β 2-microglobulin in rat brainstem motoneurons and nigral dopaminergic neurons. *J. Neuroimmunol.* 101, 76–86. doi:10.1016/S0165-5728(99)00135-6.
- Liu, X., and Gershenfeld, H. K. (2001). Genetic differences in the tail-suspension test and its relationship to imipramine response among 11 inbred strains of mice. *Biol. Psychiatry*

- 49, 575–581. doi:10.1016/S0006-3223(00)01028-3.
- Liu, X., and Gershenfeld, H. K. (2003). An exploratory factor analysis of the Tail Suspension Test in 12 inbred strains of mice and an F2 intercross. *Brain Res. Bull.* 60, 223–231. doi:10.1016/S0361-9230(03)00033-9.
- Lively, S., and Schlichter, L. C. (2013). The microglial activation state regulates migration and roles of matrix-dissolving enzymes for invasion. *J. Neuroinflammation* 10, 843. doi:10.1186/1742-2094-10-75.
- Lucki, I., Dalvi, A., and Mayorga, A. (2001). Sensitivity to the effects of pharmacologically selective antidepressants in different strains of mice. *Psychopharmacology (Berl.)* 155, 315–322. doi:10.1007/s002130100694.
- Lutz, C. M., Linder, C. C., and Davisson, M. T. (2012). “Strains, Stocks and Mutant Mice,” in *The Laboratory Mouse* (Elsevier), 37–56. doi:10.1016/B978-0-12-382008-2.00003-9.
- MacAry, P. A., Lindsay, M., Scott, M. A., Craig, J. I. O., Luzio, J. P., and Lehner, P. J. (2001). Mobilization of MHC class I molecules from late endosomes to the cell surface following activation of CD34-derived human Langerhans cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 3982–3987. doi:10.1073/pnas.071477498.
- Maeshima, N., and Fernandez, R. C. (2013). Recognition of lipid A variants by the TLR4-MD-2 receptor complex. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3, 19. doi:10.3389/fcimb.2013.00003.
- Mak, T. W., and Saunders, M. E. (1983). The major histocompatibility complex (MHC). *Transplant. Proc.* 15, 27–206. doi:10.1016/B978-012088451-3.50012-0.
- Marmioli, N., and Maestri, E. (2007). “Polymerase chain reaction (PCR),” in *Food Toxicants Analysis* (Elsevier), 147–187. doi:10.1016/B978-044452843-8/50007-9.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C. A. (1997). A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394–397. doi:10.1038/41131.
- Michell-Robinson, M. A., Touil, H., Healy, L. M., Owen, D. R., Durafourt, B. A., Bar-Or, A., et al. (2015). Roles of microglia in brain development, tissue maintenance and repair. *Brain* 138, 1138–1159. doi:10.1093/brain/awv066.
- Milatovic, D., Zaja-Milatovic, S., Breyer, R. M., Aschner, M., and Montine, T. J. (2017).

- “Neuroinflammation and oxidative injury in developmental neurotoxicity,” in *Reproductive and Developmental Toxicology*, 1051–1061. doi:10.1016/B978-0-12-804239-7.00055-X.
- Monastersky, G. M., and Geistfeld, J. G. (2002). “Transgenic and Knockout Mice,” in *Laboratory Animal Medicine* (Elsevier), 1129–1141. doi:10.1016/B978-012263951-7/50031-4.
- Moon, C., Jun Yoo, S., and Soo Han, H. (2014). “Smell,” in *Encyclopedia of the Neurological Sciences* (Elsevier), 216–220. doi:10.1016/B978-0-12-385157-4.00072-5.
- Morales, I., Fariás, G. A., Cortes, N., and Maccioni, R. B. (2016). “Neuroinflammation and Neurodegeneration,” in *Update on Dementia* (InTech). doi:10.5772/64545.
- Mukaida, N., Ishikawa, Y., Lkeda, N., Fujioka, N., Watanabe, S., Kuno, K., et al. (1996). Novel insight into molecular mechanism of endotoxin shock: biochemical analysis of LPS receptor signaling in a cell-free system targeting NF- κ B and regulation of cytokine production/action through β 2 integrin in vivo. *J. Leukoc. Biol.* 59, 145–151. doi:10.1002/jlb.59.2.145.
- Murat, P., and Tellam, J. (2015). Effects of messenger RNA structure and other translational control mechanisms on major histocompatibility complex-I mediated antigen presentation. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 6, 157–171. doi:10.1002/wrna.1262.
- Nardo, G., Trolese, M. C., and Bendotti, C. (2016). Major Histocompatibility Complex I Expression by Motor Neurons and Its Implication in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front. Neurol.* 7. doi:10.3389/fneur.2016.00089.
- Nava Catorce, M., and Gevorkian, G. (2016). LPS-induced Murine Neuroinflammation Model: Main Features and Suitability for Pre-clinical Assessment of Nutraceuticals. *Curr. Neuropharmacol.* 14, 155–164. doi:10.2174/1570159X14666151204122017.
- Nijland, R., Hofland, T., and van Strijp, J. (2014). Recognition of LPS by TLR4: Potential for Anti-Inflammatory Therapies. *Mar. Drugs* 12, 4260–4273. doi:10.3390/md12074260.
- Niranjan, R. (2018). Recent advances in the mechanisms of neuroinflammation and their roles in neurodegeneration. *Neurochem. Int.* 120, 13–20. doi:10.1016/j.neuint.2018.07.003.
- Orihuela, R., McPherson, C. A., and Harry, G. J. (2016). Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *Br. J. Pharmacol.* 173, 649–665. doi:10.1111/bph.13139.

- Piirsalu, M., Taalberg, E., Lilleväli, K., Tian, L., Zilmer, M., and Vasar, E. (2020). Treatment With Lipopolysaccharide Induces Distinct Changes in Metabolite Profile and Body Weight in 129Sv and Bl6 Mouse Strains. *Front. Pharmacol.* 11, 2–4. doi:10.3389/fphar.2020.00371.
- Raud, S., Sütt, S., Plaas, M., Luuk, H., Innos, J., Philips, M.-A., et al. (2007). Cat odor exposure induces distinct changes in the exploratory behavior and Wfs1 gene expression in C57Bl/6 and 129Sv mice. *Neurosci. Lett.* 426, 87–90. doi:10.1016/j.neulet.2007.08.052.
- Reits, E. A. J., Vos, J. C., Grommé, M., and Neefjes, J. (2000). The major substrates for TAP in vivo are derived from newly synthesized proteins. *Nature* 404, 774–778. doi:10.1038/35008103.
- Revilleza, M. J., Wang, R., Mans, J., Hong, M., Natarajan, K., and Margulies, D. H. (2011). How the Virus Outsmarts the Host: Function and Structure of Cytomegalovirus MHC-I-Like Molecules in the Evasion of Natural Killer Cell Surveillance. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011, 1–12. doi:10.1155/2011/724607.
- Roderick, T. H. (2013). “Mouse,” in *Brenner’s Encyclopedia of Genetics* (Elsevier), 482–485. doi:10.1016/B978-0-12-374984-0.00981-5.
- Rymo, S. F., Gerhardt, H., Wolfhagen Sand, F., Lang, R., Uv, A., and Betsholtz, C. (2011). A Two-Way Communication between Microglial Cells and Angiogenic Sprouts Regulates Angiogenesis in Aortic Ring Cultures. *PLoS One* 6, e15846. doi:10.1371/journal.pone.0015846.
- Sakai, J., Cammarota, E., Wright, J. A., Cicuta, P., Gottschalk, R. A., Li, N., et al. (2017). Lipopolysaccharide-induced NF- κ B nuclear translocation is primarily dependent on MyD88, but TNF α expression requires TRIF and MyD88. *Sci. Rep.* 7, 1428. doi:10.1038/s41598-017-01600-y.
- Schreyer, S. A., Wilson, D. L., and LeBoeuf, R. C. (1998). C57BL/6 mice fed high fat diets as models for diabetes-accelerated atherosclerosis. *Atherosclerosis* 136, 17–24. doi:10.1016/S0021-9150(97)00165-2.
- Shiina, T., Blancher, A., Inoko, H., and Kulski, J. K. (2017). Comparative genomics of the human, macaque and mouse major histocompatibility complex. *Immunology* 150, 127–138. doi:10.1111/imm.12624.

- Silver, L. (2001). "Inbred Strain," in *Brenner's Encyclopedia of Genetics* (Elsevier), 53. doi:10.1016/B978-0-12-374984-0.00781-6.
- Silver, N., Best, S., Jiang, J., and Thein, S. L. (2006). Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Mol. Biol.* 7, 33. doi:10.1186/1471-2199-7-33.
- Singh, A. ., and Jiang, Y. (2004). How does peripheral lipopolysaccharide induce gene expression in the brain of rats? *Toxicology* 201, 197–207. doi:10.1016/j.tox.2004.04.015.
- Singhal, G., and Baune, B. T. (2019). "Inflammatory abnormalities in major depressive disorder," in *Major Depressive Disorder*, 75–89. doi:10.1016/B978-0-323-58131-8.00006-9.
- St Clair, D., Blackwood, D., Muir, W., Walker, M., St Clair, D., Muir, W., et al. (1990). Association within a family of a balanced autosomal translocation with major mental illness. *Lancet* 336, 13–16. doi:10.1016/0140-6736(90)91520-K.
- Tajadini, M., Panjehpour, M., and Javanmard, S. (2014). Comparison of SYBR Green and TaqMan methods in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes. *Adv. Biomed. Res.* 3, 85. doi:10.4103/2277-9175.127998.
- Takahashi, K., Prinz, M., Stagi, M., Chechneva, O., and Neumann, H. (2007). TREM2-Transduced Myeloid Precursors Mediate Nervous Tissue Debris Clearance and Facilitate Recovery in an Animal Model of Multiple Sclerosis. *PLoS Med.* 4, e124. doi:10.1371/journal.pmed.0040124.
- Takahashi, K., Rochford, C. D. P., and Neumann, H. (2005). Clearance of apoptotic neurons without inflammation by microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2. *J. Exp. Med.* 201, 647–657. doi:10.1084/jem.20041611.
- Tan, Y.-L., Yuan, Y., and Tian, L. (2020). Microglial regional heterogeneity and its role in the brain. *Mol. Psychiatry* 25, 351–367. doi:10.1038/s41380-019-0609-8.
- Teghanemt, A., Zhang, D., Levis, E. N., Weiss, J. P., and Gioannini, T. L. (2005). Molecular Basis of Reduced Potency of Underacylated Endotoxins. *J. Immunol.* 175, 4669–4676. doi:10.4049/jimmunol.175.7.4669.
- Tuttle, A. H., Philip, V. M., Chesler, E. J., and Mogil, J. S. (2018). Comparing phenotypic variation between inbred and outbred mice. *Nat. Methods* 15, 994–996. doi:10.1038/s41592-018-0224-7.

- Van Amersfoort, E. S., Van Berkel, T. J. C., and Kuiper, J. (2003). Receptors, Mediators, and Mechanisms Involved in Bacterial Sepsis and Septic Shock. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 379–414. doi:10.1128/CMR.16.3.379-414.2003.
- Vanaveski, T., Narvik, J., Innos, J., Philips, M. A., Ottas, A., Plaas, M., et al. (2018). Repeated administration of D-amphetamine induces distinct alterations in behavior and metabolite levels in 129Sv and B16 mouse strains. *Front. Neurosci.* 12. doi:10.3389/fnins.2018.00399.
- Vargas-Caraveo, A., Sayd, A., Maus, S. R., Caso, J. R., Madrigal, J. L. M., García-Bueno, B., et al. (2017). Lipopolysaccharide enters the rat brain by a lipoprotein-mediated transport mechanism in physiological conditions. *Sci. Rep.* 7, 13113. doi:10.1038/s41598-017-13302-6.
- Vezzani, A., Balosso, S., and Ravizza, T. (2019). Neuroinflammatory pathways as treatment targets and biomarkers in epilepsy. *Nat. Rev. Neurol.* 15, 459–472. doi:10.1038/s41582-019-0217-x.
- Võikar, V., Vasar, E., and Rauvala, H. (2004). Behavioral alterations induced by repeated testing in C57BL/6J and 129S2/ Sv mice: Implications for phenotyping screens. *Genes, Brain Behav.* 3, 27–38. doi:10.1046/j.1601-183X.2003.0044.x.
- Wahlsten, D., Bachmanov, A., Finn, D. A., and Crabbe, J. C. (2006). Stability of inbred mouse strain differences in behavior and brain size between laboratories and across decades. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 16364–16369. doi:10.1073/pnas.0605342103.
- Wang, Q., Du, L., Wang, Y., Xu, C., Sun, Z., Fu, Y., et al. (2017). The development and biological characteristics of a novel potentially radioresistant inbred mouse strain. *Mol. Med. Rep.* 15, 759–767. doi:10.3892/mmr.2016.6066.
- Wang, Z., Zhang, L., Qiao, A., Watson, K., Zhang, J., and Fan, G.-H. (2008). Activation of CXCR4 Triggers Ubiquitination and Down-regulation of Major Histocompatibility Complex Class I (MHC-I) on Epithelioid Carcinoma HeLa Cells. *J. Biol. Chem.* 283, 3951–3959. doi:10.1074/jbc.M706848200.
- Welcome, M. O. (2020). Neuroinflammation in CNS diseases: Molecular mechanisms and the therapeutic potential of plant derived bioactive molecules. *PharmaNutrition* 11, 100176. doi:10.1016/j.phanu.2020.100176.

- Wells, J. E. A., Hurlbert, R. J., Fehlings, M. G., and Yong, V. W. (2003). Neuroprotection by minocycline facilitates significant recovery from spinal cord injury in mice. *Brain* 126, 1628–37. doi:10.1093/brain/awg178.
- Yoneyama, N., Crabbe, J. C., Ford, M. M., Murillo, A., and Finn, D. A. (2008). Voluntary ethanol consumption in 22 inbred mouse strains. *Alcohol* 42, 149–160. doi:10.1016/j.alcohol.2007.12.006.
- Zhang, J., Boska, M., Zheng, Y., Liu, J., Fox, H. S., and Xiong, H. (2021). Minocycline attenuation of rat corpus callosum abnormality mediated by low-dose lipopolysaccharide-induced microglia activation. *J. Neuroinflammation* 18, 100. doi:10.1186/s12974-021-02142-x.
- Zheng, Z. V., and Wong, K. C. G. (2019). Microglial activation and polarization after subarachnoid hemorrhage. *Neuroimmunol. Neuroinflammation* 2019, 30–31. doi:10.20517/2347-8659.2018.52.

LIHTLITSENTS

Mina, Johanna Liis Udumets,

annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

MHC I rajas osalevate geenide ekspressiooni võrdlusuuring 129Sv ja B16 hiirte erinevates ajustruktuurides lipopolüsahhariidi poolt indutseeritud neuroinflammatoorses mudelis,

mille juhendaja on Maria Piirsalu,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, alates **01.06.2023** kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Johanna Liis Udumets

03.06.2021