

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

Eva-Maria Oja

***Lsamp* adhesioonimolekuli seosed serotonergilise süsteemiga**

Magistritöö biomeditsiinis

40 EAP

Juhendajad MSc Aleksandr Bregin
PhD Jürgen Innos
PhD Mari-Anne Philips
PhD Tambet Tõnissoo

TARTU 2018

INFOLEHT

***Lsamp* adhesioonimolekuli seosed serotonergilise süsteemiga**

Serotonergiline süsteem on üks mitmetest projektsioonisüsteemidest ajus, mille moodustavad erinevad neuroniterühmad, mille rakukehad asuvad peamiselt ajutüve raphe tuumades ning aksonid innerveerivad praktiliselt kogu kesknärvisüsteemi, kaasa arvatud limbilise süsteemi osasid. Koos vastutavad need süsteemid paljude bioloogiliselt oluliste protsesside eest ning häired kummaski süsteemis viivad näiteks muutunud sotsiaalse käitumiseni. Süsteemide toimimiseks on olulised nii neurotransmitter serotoniin kui ka raku adhesioonimolekulid nagu LSAMP. *Lsamp* geeni puudulikkus mõjutab nii serotonergilist kui limbilist süsteemi, mõjutades sotsiaalset käitumist ning serotoniini baas- ja metabolismitaset ajus. Käesolevas töös kirjeldati esmakordselt *Lsamp* adhesioonimolekuli ekspressiooni kesk- ja tagaajus ning uuriti kroonilise estsitalopraami manustamise mõju hiirte kaalule, käitumisele ja serotoniini metabolismile.

Märksõnad: LSAMP, SSRI, estsitalopraam, serotonergiline süsteem, raphe tuumad

CERCS kood: B640 Neuroloogia, neuropsühholoogia, neurofüsioloogia

***Lsamp* adhesion molecule – relations with the serotonergic system**

The serotonergic system is one of the many projection systems in the brain, formed by various neuron groups which cell bodies are located mainly in the raphe nuclei in the brain stem and the axons of these neurons innervate practically the entire central nervous system, especially parts of the limbic system. Together with the limbic system, the serotonin system regulates several biologically relevant processes and defects in either of the systems may lead altered social behaviour, for example. The functioning of these systems is supported by the neurotransmitter serotonin and cell adhesion molecules, such as LSAMP. Lsamp deficit affects both the limbic and serotonergic systems by altering social behaviour and changing the levels of serotonin and its metabolite, and the rate of serotonin metabolism. In this master's thesis Lsamp expression in mid- and hindbrain is described, also influence of chronic escitalopram administration to weight, behaviour and serotonin metabolism in mice was studied.

Key words: LSAMP, SSRI, escitalopram, serotonergic system, raphe nuclei

CERCS code: B640 Neurology, neuropsychology, neurophysiology

SISUKORD

INFOLEHT.....	2
SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID	6
SISSEJUHATUS	8
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	10
1.1 Serotonergiline süsteem.....	10
1.1.1 Raphe tuumad.....	10
1.1.2 Serotoniin	13
1.1.2.1 Serotoniini retseptorid.....	14
1.1.2.2 Serotoniini transporter ja SSRI-d.....	15
1.1.2.2.1 Estsitalopraam	16
1.2 Limbiline süsteem.....	17
1.2.1 Limbilise süsteemiga seotud peamised ajuosad	17
1.2.1.1 Hüpotalamus	17
1.2.1.2 Amügdala.....	18
1.2.1.3 Hipokampus.....	18
1.2.1.4 Prefrontaalkorteks	19
1.2.1.5 Striatum.....	19
1.3 Raku adhesioonimolekulid ja närvisüsteem	20
1.3.1 Immunoglobuliini geeni superperekond.....	21
1.3.1.1 IgLON perekonna valgud	21
1.3.1.1.1 Neurotrimiin	22
1.3.1.1.2 OBCAM	23
1.3.1.1.3 NEGR1	23
1.3.1.1.4 IgLON5	23
1.3.1.1.5 LSAMP.....	24

1.3.1.1.5.1 LSAMP puudulikkusega hiiremodelid	27
2. EKSPERIMENTAALNE TÖÖ	28
2.1. Töö eesmärgid.....	28
2.2. Materjal ja metoodika	28
2.2.1. Töös kasutatud katseloomad.....	28
2.2.2. <i>In situ</i> hübridisatsioon digoksügeniiniga (Dig) märgistatud riboprooviga vabalt ujuvatel ajulõikudel	29
2.2.3. Estsitalopraami krooniline manustamine	30
2.2.4 Käitumiskatsed	31
2.2.4.1 Tõstetud plusspuuri katse.....	31
2.2.4.2 Sabast riputamise katse	32
2.2.4.3 Liikumisaktiivsuse katse	32
2.2.5. 5-HT ja selle metaboliit 5-HIAA mõõtmine füsioloogilise lahuse ja estsitalopraami kroonilise manustamise järgselt	33
2.3 Tulemused.....	34
2.3.1 Dorsaalses ja mediaanses raphe tuumas võib <i>Lsamp</i> ekspresseeruda nii 1a kui 1b promootorilt.....	34
2.3.2 Kroonilise estsitalopraami mõju <i>Lsamp</i> geeni puudulikkusega ja metsiktüüpi hiirte kehakaalukõverale	35
2.3.3 Estsitalopraami kroonilise manustamise mõju käitumisele tõstetud plusspuuri katses	36
2.3.4 Estsitalopraami kroonilise manustamise mõju käitumisele liikumisaktiivsuse katses	39
2.3.5 Estsitalopraami kroonilise manustamise mõju käitumisele sabast riputamise katses	40
2.3.6 Serotoniini ja tema metaboliidi 5-HIAA tase	41
2.4 Arutelu	46
KOKKUVÕTE	51
SUMMARY	52

TÄNUSÕNAD	54
KIRJANDUSE LOETELU.....	55
LIHTLITSENTS.....	72

KASUTATUD LÜHENDID

5-HIAA – 5-hüdroksü-indoolatseethape

5-HT – 5-hüdroksütrüptamiin, serotoniin

5-HTT – 5-hüdroksütrüptamiini transporter, serotoniini transporter

bp – *base pair*, aluspaar

BR – blokeerimisreagent

BST – *bed nucleus of stria terminalis*, *stria terminalis*'e süngituum

CAM – *cell adhesion molecule*, raku adhesioonimolekul

Dig – digoksigeniin

DR – dorsaalne raphe tuum

DRG – *dorsal root ganglion*, dorsaaljuure ganglion

E – *embryonic day of development*, embrüonaalne arengupäev

ECM – *extracellular matrix*, ekstratsellulaarne maatriks

ESC – *escitalopram*, estsitalopraam

g – gramm

GABA – *gamma amino-butyric acid*, gamma-aminovõihape

GPCR – *G-protein coupled receptor*, G-valguga seotud retseptor

GPI – *glycosyl-phosphatidyl-inositol*, glükosüül-fosfatidüül-inositol

HPLC – *high performance liquid chromatography*, kõrgsurvevedelikkromatograafia

IC – *inferior colliculus*, alaküngas

IgSF – *immunoglobulin superfamily*, immunoglobuliinide superperekond

ISH – *in situ* Hübridisatsioon

kb – *kilobase*, kiloaluspaar

KNS – kesknärvisüsteem

LSAMP – *limbic system-associated membrane protein*, limbilise süsteemiga seotud membraanivalk

m – meeter

ml – *medial lemniscus*, mediaalne lemnisk

MnR – mediaanne raphe tuum

Negr1 – *neuronal growth regulator 1*, neuraalne kasvuregulaator 1

Ntm – neurotrimiin

OBCAM – *opioid binding cell adhesion molecule*, opioide siduv raku adhesioonimolekul

OPCML – *opioid binding protein/cell adhesion molecule like*, raku adhesioonimolekuli sarnane opioide siduv valk

P – postnataalne arengupäev

PAG – *periaqueductal gray*, ajuveejuha ümbritsev hallaine

PBS – *phosphate-buffered saline*, soolalahusega fosfaatpuhver

PFK – prefrontaalkorteks

PNS – piirdenärvisüsteem

s – sekund

SCG – *superior cervical ganglion*, ülemine kaelaganglion

SDS – *sodium dodecyl sulfate*, naatriumdodetsüülsulfaat

SEM – *standard error of the mean*, keskmise standardviga

SERT – serotoniini transporter

SP – signaalpeptiid

SSC – *saline-sodium citrate*, Na-tsitraadi puhverlahus

SSRI – *selective serotonin reuptake inhibitor*, selektiivne serotoniini tagasihaarde inhibiitor

TBE – Tris-Boraat-EDTA

SISSEJUHATUS

Serotonergiline süsteem on üks mitmetest projektsioonisüsteemidest ajus ning selle moodustavad erinevad neuroniterühmad. Nende neuronite rakukehad asuvad peamiselt ajutüve raphe tuumades ning aksonid innerveerivad praktiliselt kogu kesknärvisüsteemi, eriti näiteks limbilise süsteemi osasid. Raphe tuumadest on olulisemad dorsaalne ja mediaanne tuum, millest lähtuvad projektsioonid mitmetesse limbilise süsteemi osadesse: prefrontaalkorteksisse, mandeltuuma (amügdalasse), *striatum*'isse (juttkehasse) ja hipokampusesse. Serotonergilises süsteemis on keskseks virgatsaineks monoamiinide hulka kuuluv serotoniin, mis kasvavas organismis täidab ka kasvufaktori rolli. Serotoniin toimib erinevatele neuronite alatüüpidele membraansete serotoniini retseptorite vahendusel ning serotoniini tagasihaarde eest vastutab serotoniini transporter. Serotoniini transporterid on sihtmärgiks antidepressantidele, mille hulka kuuluvad ka selektiivsed serotoniini tagasihaarde inhibiitorid (SSRI, *selective serotonin reuptake inhibitor*), millest kõige selektiivsem on esitalopraam. Serotonergiline süsteem reguleerib mitmeid bioloogiliselt olulisi protsesse, näiteks ööpäevast rütmi ja kognitiivseid funktsioone. Häired süsteemi töös viivad paljude erinevate haiguslike seisunditeni, sh depressioon.

Serotonergilise süsteemiga on tihedalt seotud limbiline süsteem, mille moodustavad omavahel ühenduses olevad ajuosad, mis vastutavad emotsioonide reguleerimise, kognitiivsete funktsioonide ning autonoomsete reaktsioonide eest. Molekulaarsel tasemel osalevad nendes protsessides raku adhesioonimolekulid, mille ülesandeks on reguleerida närvisüsteemi arengut ja võimaldada süsteemi edasine toimimine. Raku adhesioonimolekulid jagunevad närvisüsteemis mitmesse gruppi, millest ühe moodustab immunoglobuliini (Ig) geeni superperekond. Ig superperekonna ühte alagruppi kuuluvad IgLON perekonna valgud, sh limbilise süsteemiga seotud membraanivalk (LSAMP, *limbic system-associated membrane protein*). LSAMP valku ekspresseeritakse kahelt alternatiivselt promootorilt neuronite pinnal imetajate KNS-i kortikaalsetes ja subkortikaalsetes regioonides, mis sisaldavad või võtavad vastu projektsioone limbilise süsteemi struktuuridelt. *Lsamp* geeni puudulikkus väljendub muutunud sotsiaalses käitumises. *Lsamp* geeni puudulikkusega hiired on uutes olukordades vähem ärevad, uudishimulikud ning aktiivsemad kui nende metsiktüüpi pesakonnakaaslased. Samuti on *Lsamp* geeni puudulikkusega hiirte ajus, võrreldes metsiktüüpi pesakonnakaaslastega, muutunud serotoniini baas- ja metabolismitase.

Käesoleva magistritöö esimeses osas antakse ülevaade serotonergilisest ja limbilisest süsteemist, raku adhesioonimolekulide IgLON alaperekonnast, milles keskendutakse enim

LSAMP valgule. Eksperimentaalses osas kirjeldatakse *Lsamp* geeni ekspressioonimustrit koduhiire (*Mus musculus*) kesk- ja tagaajus, fookusega raphe tuumadele, ning uuritakse *Lsamp* geeni puudulikkude hiireliini, selgitamaks välja muutusi serotoniinisüsteemis vastusena SSRI estsitalopraami kroonilisele manustamisele.

Käesolev töö on koostatud meditsiiniteaduste valdkonnas, Bio- ja siirdemeditsiini instituudi füsioloogia osakonnas.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Serotonergiline süsteem

Serotonergiline süsteem on üks hajusalt organiseeritud projektsioonisüsteemidest ajus (Törk, 1990). See koosneb morfoloogiliselt erinevatest neuronirühmadest, mille rakukehad asuvad ajutüve raphe tuumades ja mõnedes retikulaarformatsiooni piirkondades, ning mille aksonid innerveerivad praktiliselt kogu kesknärvisüsteemi (KNS), eriti tugevalt aga suuraju korteksit, limbilisi struktuure, paljusid ajutüve piirkondasid ja seljaaju hallainet (Törk, 1990). Serotonergiline süsteem jagatakse kaheks alaosaks: rostraalseks (dorsaalne ja mediaanne raphe tuum), kus rakukehad paiknevad keskajus ning ajusillas ja kust lähtuvad projektsioonid eesajju, ning kaudaalseks (raphe *pallidus*, *magnus*, *obscurus* ja *pontis*), mis asub peamiselt piklikajus ja kust lähtuvad projektsioonid seljaajju (Törk, 1990; Gaspar jt, 2003). Ajutüvi ja väikeaju jagunevad mõlema alaosa vahel (Törk, 1990).

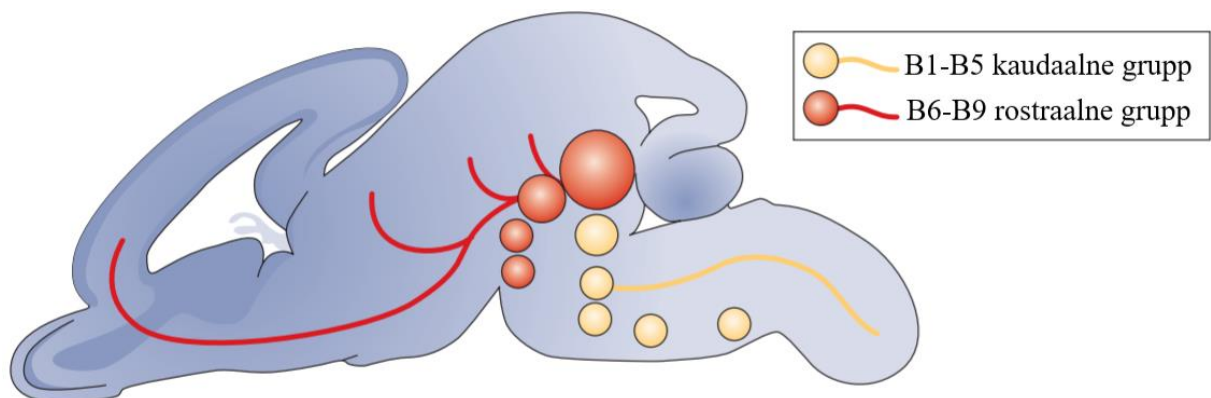
Serotonergiline süsteem mängib rolli mitmete bioloogiliste funktsioonide, näiteks une, söögiisu, tsirkadiaanse rütmi ja kognitiivsete funktsioonide kontrollimisel (Mann, 1999; Hensler, 2006b). Serotonergilise süsteemi häireid on seostatud paljude haiguslike seisunditega, näiteks depressiooni (Mann, 1999), suitsiidse käitumise (Mann, 1999), imiku äkksurma sündroomi (Nonnis Marzano jt, 2008), impulsiivse agressiooni (Seo ja Patrick, 2008), ärevushäire (Gordon ja Hen, 2004) ning alkoholismiga (LeMarquand jt, 1994; Sari jt, 2011; Sari, 2013).

1.1.1 Raphe tuumad

Serotonergilised neuronid jagunevad ajus üheksasse gruppi: B1-B9 (joonis 1; Jacobs ja Azmitia, 1992), mis moodustavad raphe tuumad. Enamustes raphe tuumades on suurem osa neuroneid mitterserotonergilised. Dorsaalne raphe tuum, mille moodustavad serotonergiliste neuronite grupid B6 ja B7, sisaldab suurimal arvul serotonergilisi neuroneid, kuid need moodustavad selles olevatest rakkudest vaid 40-50% (Hensler, 2006b). Grupid B5 ja B8 moodustavad koos mediaanse raphe tuuma ning grupi B9 serotonergilised neuronid moodustavad mediaanse raphe tuuma lateraalse pikenduse (Hensler, 2006a).

Dorsaalsest ja mediaansest raphe tuumast pärinevad limbilise süsteemi serotonergilised projektsioonid. Need moodustavad eesajus erinevaid, omavahel osaliselt kattuvaid innervatsioonimustreid. Dorsaalsest raphest pärinevad projektsioonid innerveerivad tugevalt prefrontaalkorteksit (PFK), külgmist vaheseina (*septum*'it), mandelkeha (amügdalat), juttkeha (*striatum*'it) ja ventraalset osa hipokampusest. Mediaansest raphest väljuvad aksonid innerveerivad hipokampust, aju *septum*'it ning hüpotalamust. Dorsaalse ja mediaanse raphe innervatsioonimustrid kattuvad enamustes korteksi piirkondades. (Molliver, 1987; Hensler, 2006a)

Kaudaalselt paiknevad raphe tuumad sisaldavad väiksemal arvul serotonergilisi rakke ning innerveerivad ajutüve ja seljaaju. Nendeks on raphe *obscurus* (B2 grupp), raphe *pallidus* (B1 ja B4 grupi rakud) ja raphe *magnus* (B3 grupp) (Jacobs ja Azmitia, 1992; Hensler, 2006a). Raphe tuumad vahetavad omavahel informatsiooni, lisaks saabub raphe tuumadesse info ka teistest rakugruppidest ajutüves ning hüpotalamusest, korteksist ja limbilistest struktuuridest, nagu amügdala (Hensler, 2006a).

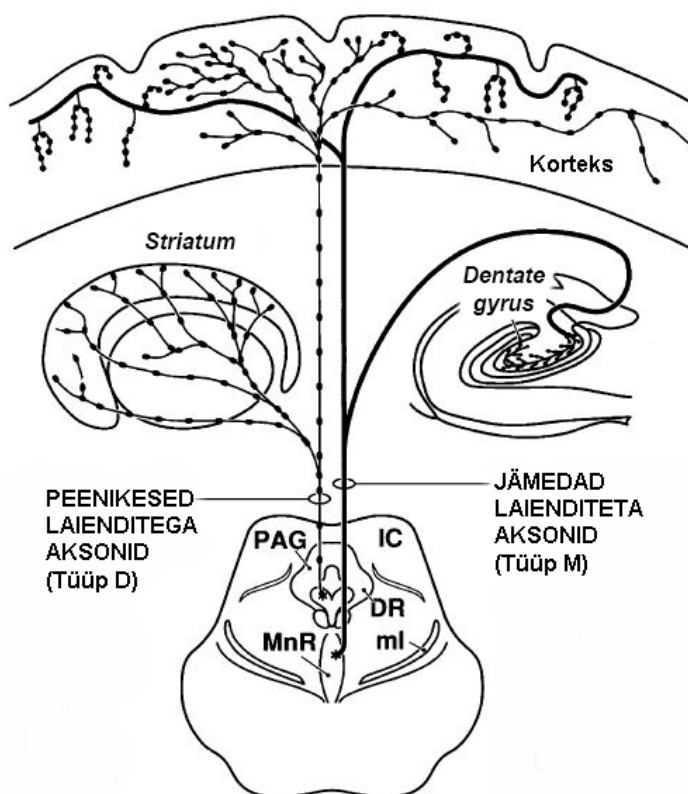


Joonis 1. Hiire serotonergiliste neuronite spetsifikatsioon. Serotonergilised neuronid jagunevad üheksasse gruppi (B1-B9). Kaudaalsed serotonergiliste neuronite grupid, B1-B5 (kollased pallid), projitseerivad oma aksonid ajutüve ja seljaaju (kollane jutt). Rostraalsete gruppide neuronid, B6-B9 (punased pallid), saadavad oma aksonid vahe- ja otsaju (punased jutid). Modifitseeritud Gaspar jt (2003) järgi.

Lisaks raphe tuumadele toodetakse serotoniini (5-HT, 5-hüdroksütrüptamiin) ka käbikahas (epifüüsis), soolestiku enterokromafiin-rakkudes, kopsu neuroepiteliaalsetes kehades ja kilpnäärme parafollikulaarrakkudes (Gaspar jt, 2003).

Serotonergiliste neuronite aksonid ja nende lõpposad erinevad morfoloogiliselt üksteisest, sõltuvalt sellest, millisest raphe tuumast nad pärinevad. Mediaansest raphe tuumast lähtuvad aksonid, tüüp M, on jämedamad ning sisaldavad ümaraid laiendeid aksonite lõpposades.

Aksonid, mis lähtuvad dorsaalsest raphe tuumast, tüüp D, on vastupidiselt väga peenikesed ja sisaldavad erikujulisi laiendeid. (Kosofsky ja Molliver, 1987; joonis 2)



Joonis 2. Serotonergiliste neuronite morfoloogia. Peenikesed laienditega aksonid (tüüp D) saavad alguse dorsaalses raphe tuumas (DR) paiknevatest rakukehadest. Jämedamad ilma laienditeta aksonid (tüüp M) saavad alguse mediaanses raphe tuumas (MnR) paiknevatest rakukehadest. Lühendid: PAG – ajuveejuha ümbritsev hallaine (*periaqueductal gray*); IC – alaküngas (*inferior colliculus*); ml – mediaalne lemnisk (*medial lemniscus*). Modifitseeritud Hensler (2006a) järgi.

Tüüp M ja tüüp D aksonitel ekspresseeritakse erineval tasemel serotoniini transporterit (SERT). On näidatud, et enamuses naalduva tuuma (*nucleus accumbens*) piirkondades ekspresseerivad SERT-i peenikesed D-tüüpi aksonid. *Nucleus accumbens*'i kaudaalses kooreosas on M-tüüpi aksonid, mis SERT-i ei ekspresseeri. (Brown ja Molliver, 2000) SERT-i ekspresseerivad peenikesed aksonid on vastuvõtlikud neurotoksilistele amfetamiini derivaatidele (Brown ja Molliver, 2000), mistõttu on nad võimalikud terapeutilised sihtmärgid depressiooni, ärevuse ja paanikahäirete ravis (Hensler, 2006a).

1.1.2 Serotoniin

Serotoniin (5-HT) on monoamiidne virgatsaine, mis avastati 1948. aastal (Rapport jt, 1948). Eelnevalt olid V. Erspamer ja B. Asero kirjeldanud ainet enteramiin juba 1930ndatel, kuid 1953. aastal leidsid nad, et enteramiin ja serotoniin on sama ühend (Erspamer ja Asero, 1953). Serotoniini prekursoriks on aminohape L-trüptofaan, mis konverteeritakse esmalt trüptofaani hüdroksülaasi poolt 5-hüdroksütrüptofaaniks ning seejärel L-aminohappe dekarboksülaasi poolt serotoniiniks. Serotoniini metaboliseerimisel osaleb ensüüm monoamiini oksüdaas, mis konverteerib serotoniini 5-hüdroksü-indoolatseetaldehüüdiks, mis oksüdeeritakse edasi 5-hüdroksü-indoolatseethappeks (5-HIAA). (Hensler, 2006b)

Serotoniin ilmnebaju arengus juba küllaltki varakult – hiire ajus tekivad esimesed serotonergilised neuronid 10.-12. embrüonaalsel arengupäeval (E10-E12; *embryonic day of development* E10-E12) (Gaspar jt, 2003). Inimese ajus on esimesi serotonergilisi neuroneid ajusillas, piklikajus ja seljaajus leitud alates 5.-6. arengunädalast (Sundström jt, 1993). Enne serotonergiliste neuronite tekkimist on serotoniin emapoolse päritoluga (Gaspar jt, 2003). Päev pärast serotonergiliste neuronite tekkimist suudavad raphe tuumades olevad neuronid sünteesida serotoniini ning kaudaalse osa neuronid (grupid B1-B5) suunavad oma aksonid seljaajju, samas kui rostraalse osa neuronid (grupid B6-B9) eesajju (Gaspar jt, 2003).

Serotoniin osaleb arengu käigus õppimise, mõtlemise ja stressivõrgustike kujunemises (Brummelte jt, 2017). Varases arengus käitub serotoniin kasvufaktorina, reguleerides serotonergilise süsteemi ning sellega seotud süsteemide arengut (Whitaker-Azmitia jt, 1996) rakujagunemise, neuraalse migratsiooni, raku diferentseerumise ja sünaptogeneesi moduleerimise kaudu (Gaspar jt, 2003). Enne sünapsite moodustumist vabastavad serotoniini kasvavad aksonid (Gaspar jt, 2003). On näidatud, et hiire aju arengus esineb neuronite seas ajutine serotonergiline fenotüüp – sellised neuronid saavad hoiustada ja vabastada 5-HT-d, kuid ei suuda seda ise sünteesida. 5-HT akumulatsiooni on detekteeritud talamuse, limbilise korteksi, hüpotalamuse, reetina ja oliivtuumade neuronites hiirtel vanuses E15-P10 (P, postnataalne arengupäev). (Gaspar jt, 2003)

1.1.2.1 Serotoniini retseptorid

Serotonergilises süsteemis on palju serotoniini retseptorite alatüüpe, mistõttu saab üks virgatsaine toimida erinevatele neuronite alatüüpidele erinevalt (Mann, 1999). 5-HT toimib KNS-is ja perifeerses närvisüsteemis (PNS), aga ka mitteneuraalsetes kudedes membraansete retseptorite kaudu (Hannon ja Hoyer, 2008). Serotoniini retseptorid on jagatud seitsmesse klassi: 5-HT₁–5-HT₇ (tabel 1), mis omakorda jagunevad mitmeteks alaklassideks (Hannon ja Hoyer, 2008). Kõik serotoniini retseptorite klassid peale 5-HT₃ kuuluvad G-valguga seotud retseptorite (GPCR, *G-protein coupled receptor*) hulka. 5-HT₃ on ligand-sõltuv ioonkanal. (Nichols ja Nichols, 2008) 2014. aastal kirjeldati putukates uut, 5-HT₈ klassi retseptorit (Qi jt, 2014).

Tabel 1. Serotoniini retseptorite klassid. Tabelis on välja toodud serotoniini retseptorite klassid, nende paiknemine organismis (sulgudes on toodud näited paiknemisest), ning näited 5-HT retseptorite kliinilisest olulisusest.

Klass	Paiknemine	Kliiniline olulisus
5-HT ₁	KNS (limbiline süsteem, hipokampus, korteks, raphe tuumad) PNS (Riad jt, 2000; Hannon ja Hoyer, 2008; Nichols ja Nichols, 2008)	Depressioon (Mann, 1999; Nichols ja Nichols, 2008), ärevushäired (Mann, 1999; Nichols ja Nichols, 2008), migreen, vasokonstriksioon (Nichols ja Nichols, 2008)
5-HT ₂	KNS (frontaalkorteks, <i>nucleus accumbens</i> , haistmissagar) Perifeeria (silelihased, trombotsüüdid) (Leysen ja Pauwels, 1990)	Aktiivsus- ja tähelepanuhäire, vastuvõtlikkus narkomaania suhtes, seos auditoorse süsteemiga, depressioon, ärevushäired, skisofreenia (Nichols ja Nichols, 2008)
5-HT ₃	KNS (hipokampus, ajutüvi, seljaaju) PNS	Ärevuskäitumine, oksendamisrefleks (Tyers ja Freeman, 1992), ärritatud soole sündroom (Thompson ja Lummis, 2009)
5-HT ₄	KNS (korteks, hipokampus) Perifeeria (seedetrakt)	Depressioon, mälu, insuliini tundlikkus (Ueno ja Satoh, 2009)

	(Nichols ja Nichols, 2008; Ueno ja Satoh, 2009)	
5-HT ₅	KNS (haistesibul, neokorteks, hipokampus, väikeaju) (Nichols ja Nichols, 2008)	Täpne funktsioon teadmata. Oletatakse rolli sõltuvuskäitumises, kognitiivsetes funktsioonides, tsirkadiaanse rütmi kontrollimises (Nichols ja Nichols, 2008)
5-HT ₆	KNS (korteks, haistmissagar, hipokampus, amügdala, glutamaat- ja GABAergiline (<i>gamma amino-butyric acid</i> , gamma-aminovõihape) süsteem) (Nichols ja Nichols, 2008; de Jong ja Mørk, 2017)	Kognitiivsed häired (nt skisofreenia (de Bruin ja Kruse, 2015), Alzheimeri tõbi (de Jong ja Mørk, 2017)), depressioon (Nichols ja Nichols, 2008)
5-HT ₇	KNS (hipokampus) PNS Perifeeria (silelihased)	Tsirkadiaanne rütm (Guscott jt, 2005), REM-uni (Bonaventure jt, 2007), depressioon (Guscott jt, 2005), ärevushäired (Wesolowska jt, 2006), skisofreenia (Galici jt, 2008), mälu (Meneses jt, 2008)

1.1.2.2 Serotoniini transporter ja SSRI-d

Serotoniini toimet reguleerib 12 transmembraanse domeeniga valk serotoniini transporter (SERT; 5-HTT, 5-HT transporter), mis vastutab ekstratsellulaarse serotoniini tagasihaarde eest ja peenhäälestab serotonergilist ülekannet sünapsi tasandil (Tao-Cheng ja Zhou, 1999). 5-HTT paikneb neuronite aksonite perisünaptilises plasmamembraanis, aga dorsaalses ja mediaanses raphe tuumas neuroni keha tsütoplasmas ning raphe tuumade läheduses dendriitide tsütoplasmas (Tao-Cheng ja Zhou, 1999). 5-HTT on sihtmärgiks mitmete antidepressantidele, eriti selektiivsetele serotoniini tagasihaarde inhibiitoritele (SSRI, *selective serotonin reuptake inhibitor*).

Paljud antidepressandid toimivad peamiselt läbi monoamiinide taseme suurendamise. Selleks nad kas blokeerivad serotoniini, noradrenaliini või dopamiini tagasihaarde või inhibeerivad monoamiini oksüdaasi, mis kataboliseerib monoamiine. Kliinilise depressiooni korral hakkavad antidepressandid toimima 1-2 nädalat peale ravimi manustamise algust. (Blier, 2001)

SSRI-d seonduvad serotoniini transporteriga ning takistavad serotoniini transporti või tagasihaaramist presünaptilisse rakku, mille tagajärjel suureneb sünaptilises pilus serotoniini hulk, mis saab seonduda oma postsünaptilise retseptoriga (Tao-Cheng ja Zhou, 1999; Owens jt, 2001). See omakorda takistab serotoniini juurdetootmist presünaptilises rakus (Tao-Cheng ja Zhou, 1999). Seega väheneb süsteemse SSRI manustamise korral esialgu märgatavalt serotonergiliste neuronite närviimpulsi edasikandmise võime (Blier, 2001). Paar nädalat peale ravimi manustamise algust muutuvad serotoniini retseptorid raphe tuumas aga ravimi suhtes tundetuks ning normaalne närviimpulsside edastamine serotonergiliste neuronite seas taastub (Blier, 2001). SSRI-sid kasutatakse ravina ka ärevushäirete puhul (Hensler, 2006a) ning testitakse potentsiaalse ravina skisofreenia puhul (Millan, 2000; Eggers, 2013; Yamazaki jt, 2018). Serotoniini transporteri hüperfunktsionaalsust on seostatud ka autismispektri häiretega (Sutcliffe jt, 2005; Veenstra-VanderWeele jt, 2012; Siemann jt, 2017).

1.1.2.2.1 Estsitalopraam

Algselt kasutati depressiooni raviks tritsüklilisi antidepressante ja monoamiini oksüdaase. Nende puhul on aga täheldatud, et ravim kaotab üsna pea oma mõju, sest organism muutub sellele tundetuks. 1980ndate lõpus hakati välja töötama uue põlvkonna antidepressante, mille hulka kuuluvad ka SSRI-d ning serotoniini ja noradrenaliini tagasihaarde inhibiitorid. (Sanchez jt, 2014) Estsitalopraam tuli turule 2002. aastal (*Drugsite Trust* kodulehekülg) ning on kõige selektiivsem SSRI (Owens jt, 2001).

Mitmetel juhtudel esinevad SSRI-d ratseemiliste segudena, mis ei pruugi alati olla täielikult puhtad, mistõttu esineb rohkem kõrvaltoimeid ning nende efektiivsus on madalam. Ühe enantiomeeri kasutamine võib tagada suurema selektiivsuse ja kaotab kõrvalnäidud, mida võib põhjustada vähem aktiivne enantiomeer. (Burke ja Kratochvil, 2002) Tsitalopraami puhul peitub bioloogiline efekt SERT-ile ja antidepressantne aktiivsus S-enantiomeeris (S-tsitalopraam ehk estsitalopraam), mis on palju aktiivsem antagonist SERT-ile kui R-enantiomeer (Hyttel jt, 1992).

Estsitalopraami kasutatakse ravina nii kliinilise depressiooni (Burke ja Kratochvil, 2002), sotsiaalse ärevushäire (Burke ja Kratochvil, 2002; Baldwin jt, 2016) kui ka premenstruaalse sündroomi (Marjoribanks jt, 2013) puhul ja katsetatakse obsessiiv-kompulsiivse häire (Hedges ja Woon, 2007; Bech jt, 2010; Lee jt, 2018) ning autismispektri häirete (Owley jt, 2005; Owley

jt, 2010; Najjar jt, 2015) ravina. On näidatud, et pingest tuleneva peavalu ja migreeni ravis pole estsitalopraamil mõju (Moja jt, 2005; Banzi jt, 2015).

1.2 Limbiline süsteem

Limbilise süsteemi moodustavad omavahel ühenduses olevad ajuosad, mis vastutavad emotsioonide reguleerimise, kognitiivsete funktsioonide ning autonoomsete reaktsioonide eest (Catania jt, 2008). Limbiline süsteem koosneb fülogeneetiliselt vanast limbilisest sagarast ja teistest subkortikaalsetest struktuuridest ning nende ühendustest (Kelly, 1973). Limbilist sarve mainis esmakordselt prantsuse teadlane Paul Pierre Broca juba aastal 1878 (Brabrook, 1881), kuid selle eeldatava rolli emotsioonide reguleerimises pakkus 1937. aastal välja ameerika arst James Papez (Rajmohan ja Mohandas, 2007). Järgnevatel aastatel leiti, et emotsioonide tekkimisega on seotud veel mitmed ajuosad ning 1952. aastal ühendas P. D. MacLean need ühtse termini „limbiline süsteem“ alla (Rajmohan ja Mohandas, 2007).

Põhilised limbilise süsteemi struktuurid on prefrontaalkorteks, piriformaalkorteks, vöökäär (*dentate gyrus*), entorinaalkorteks, hipokampus, võlv (*fornix*), septaaltuumad, naalduv tuum (*nucleus accumbens*), amügdala, anterioorne talamus ja hüpotalamus (Kelly, 1973). Kõik need struktuurid moodustavad kompleksse võrgustiku, mis osaleb otsuste vastuvõtmises, lõhnatajus, mälestuste talletamises, motivatsiooni ja emotsioonide kontrollimises (Zacco, 1990; Hensler, 2006a; Rajmohan ja Mohandas, 2007). Limbilisse süsteemi sissetulevat infot töödeldakse limbilises korteksis, amügdalas ja hipokampuses, info edastamisega limbilisest süsteemist väljapoole tegelevad septaaltuumad ja hüpotalamus (Swenson, 2006).

1.2.1 Limbilise süsteemiga seotud peamised ajuosad

1.2.1.1 Hüpotalamus

Hüpotalamus on peamine limbilisest süsteemist info väljasaatja. See on ühendatud frontaalsagara, septaaltuumade ja ajutüvega. Info hüpotalamusse tuleb hipokampusest ja amügdalast. (Swenson, 2006) Hüpotalamus tegeleb näiteks seksuaalkäitumise ning endokriinsete ja käitumuslike funktsioonide kontrollimisega (Swenson, 2006), aga on seotud

ka tsirkadiaanse rütmi hoidmisega, reguleerides une ja ärkveloleku tsüklit (Szymusiak ja McGinty, 2008). On näidatud, et limbiline süsteem on üks aktiivsemaid ajupiirkondi unenägude ajal. Arvatakse, et limbiline süsteem ühendab omavahel teadvustamata emotsioonid ning teadlikud kognitiivsed mõtted, tajud ja mälestused, mis koos põhjustavad REM-une tsüklis unenägusid. (Szymusiak ja McGinty, 2008)

Limbilise süsteemi stimulatsioon põhjustab muutusi hingamises ja vererõhus (Kelly, 1973). Hirnu ja raevu korral stimuleeritakse erinevaid hüpotalamuse piirkondasid, mis viivad „võitle või põgene“ vastuse genereerimiseni (Kelly, 1973). Kortikaalsete ja limbiliste ühenduste kaudu tekkiva stressi korral vabastatakse hüpotalamusest kortikotropiini vabastavat hormooni, mis omakorda osaleb endokriinsete ja immuunvastuste vahendamises. (Smith ja Vale, 2006)

1.2.1.2 Amügdala

Amügdala koordineerib käitumuslikke, autonoomseid ja endokriinseid vastuseid keskkonnastiimulitele, eriti nendele, mis eeldavad emotsionaalset reageerimist (Swenson, 2006). See on oluline, et vastata stressitingimustele ja kohandada käitumismustreid keskkonnamuutustele. Teistest ajuosadest tulev info suunatakse esmalt amügdala basolateraalsesse tuuma, sealt edasi tsentraalsesse tuuma, et vastata keskkonnastiimulitele (Heimer ja Van Hoesen, 2005). On näidatud, et amügdala kahjustuste korral väheneb organismi suutlikkus vastata stressile, eriti emotsionaalselt. (Swenson, 2006) Amügdalal on roll tähelepanu, orientatsiooni, õppimise, toitumise, joogijanu, seksuaalkäitumise ja agressiivsuse kontrollimises (Hitchcock ja Cairns, 1973). Koos hüpotalamusega osaleb amügdala hirmuvastuses (Hitchcock ja Cairns, 1973) ning lisaks on näidatud amügdalal rolli ka sõltuvuskäitumises (Childress jt, 1999).

1.2.1.3 Hipokampus

Hipokampus vastutab õppimisvõime, lühiajalise mälu ning mälujälgede meenutamise eest. Samuti on see oluline ruumilises tajus. Hipokampusesse saabub info peamiselt limbilisest korteksist ja amügdalast ning info väljub võlvi vahendusel või otse entorinaalkorteksile. (Swenson, 2006) Hipokampus teeb koostööd mitmete subkortikaalsete ajuosadega, nagu näiteks *nucleus accumbens*'i ja amügdalaga. Interaktsioonid hipokampuselt, amügdalast ja

prefrontaalkoorest tuleva info vahel aitavad valida sobivaid käitumisstrateegiaid näiteks õppimiseks. Amügdala ja hipokampuse vahelistel vastastikustel ühendustel on oluline osa motivatsioonisüsteemis, andes hipokampusele märku mälestuse tähtsusest ning võimaldades amügdalal pääseda ligi varem salvestatud mälestustele. (Witter, 2009)

1.2.1.4 Prefrontaalkorteks

Prefrontaalkorteksil on roll paljudes protsessides, näiteks eesmärgile suunatud käitumises, töömälus, tähelepanuvõimes ja otsuste vastuvõtmises (Fuster, 2001). Häired PFK töös esinevad mitmete psüühikahäirete patofüsioloogias, näiteks skisofreenia (Sapara jt, 2007), depressiooni (Samara jt, 2018), posttraumaatilise stressi häire (Arnsten jt, 2015) ning sõltuvuskäitumise puhul (Robinson jt, 2001).

Prefrontaalkorteks jaguneb kolmeks põhiliseks piirkonnaks: orbitaalseks, mediaalseks ja lateraalseks (Fuster, 2001). Orbitaal- ja mediaalne regioon on seotud emotsionaalse käitumisega (Öngür ja Price, 2000; Fuster, 2001; Gruber ja McDonald, 2012). PFK mediaalne piirkond osaleb ka empaatia-, liikumis- ja tähelepanuvõimes (Seitz jt, 2006; Benedetti jt, 2009). Kahjustused mediaalses PFK osas viivad spontaansuse kadumiseni ning raskendavad oluliselt liigutuste algatamist ja kõnet. (Fuster, 2001; Dollfus jt, 2008) Lateraalne regioon toetab käitumist, kõnet ja põhjuslikke seoseid. Kahjustused selles piirkonnas viivad võimetuseniplaane teha ja neid ellu viia. (Miller ja Cohen, 2001; Fuster, 2001; Tanji ja Hoshi, 2008; Ries jt, 2013) Käitumuslikult terviklikele funktsioonidele on oluline PFK ühendused amügdala, hüpotalamuse ja hipokampusega (Goldman-Rakic jt, 1984; Barbas ja De Olmos, 1990; Tanji ja Hoshi, 2008).

1.2.1.5 Striatum

Striatum ehk juttkeha osaleb liigutuste planeerimises ja täideviimises ning käitumise muutmises vastusena keskkonnastiimulitele (Apicella jt, 1992). Samuti on *striatum*'il roll motiveeritud käitumises (Apicella jt, 1991; Meffert jt, 2018).

Striatum jaguneb ventraalseks (sh *nucleus accumbens* ja *stria terminalis*'e sängituum (BST, *bed nucleus of stria terminalis*) ning dorsaalseks osaks (*caudate putamen*). Ventraalne *striatum* sisaldab väiksemaid ja tihedamalt pakitud neuroneid, kui dorsaalne *striatum* (Haber ja

McFarland, 1999). *Striatum*'isse saabub info peamiselt frontaalkorteksist (sensomotoorne korteks (Flaherty ja Graybiel, 1994), dorsolateraalne PFK (Ballard jt, 2012), mediaalne ja orbitaalne PFK (Haber jt, 1995)) ja talamusest (Giménez-Amaya jt, 1995) ning info *striatum*'ist suunatakse edasi talamusse (David, 2009).

Häireid *striatum*'i töös on täheldatud näiteks depressiooni (Takamura jt, 2017) ja Parkinsoni tõve (Chen jt, 2018; Garg jt, 2015) puhul.

1.3 Raku adhesioonimolekulid ja närvisüsteem

Raku adhesioonimolekulidel (CAM, *cell adhesion molecule*) on oluline roll närvisüsteemi arengu ja süsteemi edasise toimimise hoidmise juures. CAM-id osalevad näiteks neuraaloru ja neuraalharja moodustumises (Neale ja Trasler, 1994; Newgreen ja Tan, 1993), neuronite ja gliiarakkude migreerumises (Ono jt, 1994; Rousselot jt, 1995), aksonite väljakasvul ja nende suunamises (Williams jt, 1994; Gil jt, 2002; Raper ja Mason, 2010), sünapsi stabiilsuse ja plastilisuse tagamises (Stoenica jt, 2006), närvijätkete müeliniseerimises (Barbin jt, 2004) ja närvi regeneratsioonil pärast vigastust (Daniloff jt, 1986; Wallquist jt, 2004).

Raku adhesioonimolekulid koosnevad mitmetest perekondadest, mille alla kuuluvad ühiste primaarjärjestuste, struktuursete motiivide ja seondumisomadustega molekulid (Colman ja Filbin, 2006). Antud molekulid toimivad raku pinnal, kus nad saavad interakteeruda identsete molekulidega, luues homofiilse interaktsiooni, või erinevate teiste rakupinna- või ekstratsellulaarse maatriksi (ECM, *extracellular matrix*) osadega, luues heterofiilse interaktsiooni (Mauro jt, 1992; Pimenta jt, 1995; Atkins jt, 2001; Paratcha jt, 2003; Reed jt, 2004).

Närvisüsteemis on esindatud kolm suurt CAM-ide gruppi: immunoglobuliini (Ig) geeni superperekond (IgSF, *immunoglobulin superfamily*), integriinid ja kadheriinid. Kadheriinid ja IgSF perekonna CAM-id osalevad rakk-rakk või membraan-membraan interaktsioonides, samas kui integriinid vahendavad enamjaolt interaktsioone ECM-i komponentidega. (Gumbiner, 1996; Colman ja Filbin, 2006)

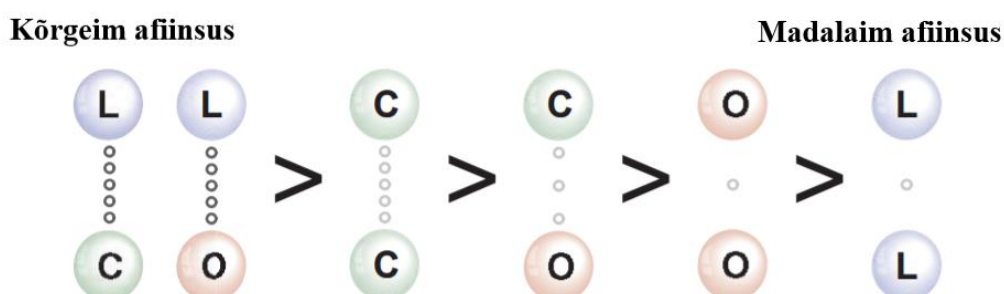
1.3.1 Immunoglobuliini geeni superperekond

Immunoglobuliinide superperekonna moodustavad valgud, mille domeenide aminohappeline järjestus on sarnane immunoglobuliinidele. IgSF oli üks esimesi valkude superperekondasid, mida kirjeldati ning mis on praeguseks selgroogsete genoomis üks suuremaid. (Barclay, 2003) 1980ndate lõpuks oli leitud, et IgSF liikmed on laialt levinud ning mängivad olulist rolli rakk-rakk interaktsioonides (Barclay, 2003).

1.3.1.1 IgLON perekonna valgud

IgLON perekonna valgud kuuluvad Ig superperekonna ühte alagruppi, mida iseloomustab kõrge glükosüleeritus, kolm Ig domeeni ning glükosüül-fosfatidüül-inositol (GPI, *glycosyl-phosphatidyl-inositol*) ankur, mis vahendab kinnitumist plasmamembraanile (Pimenta jt, 1995; Zhukareva ja Levitt, 1995; Gil jt, 2002). IgLON perekonda kuuluvad viis valku: limbilise süsteemiga seotud membraanivalk (LSAMP, *limbic system-associated membrane protein*; Pimenta jt, 1995), opioide siduv raku adhesioonimolekul (OBCAM, *opioid-binding cell adhesion molecule*; Schofield jt, 1989), neurotrimiin (NTM; Struyk jt, 1995), neuraalne kasvuregulaator 1 (NEGR1, *neuronal growth regulator 1*; Funatsu jt, 1999) ja IgLON5 (Sabater jt, 2014). OBCAM, neurotrimiin ja LSAMP on kahe esimese Ig domeeni ulatuses kõrge homoloogiaga (Pimenta jt, 1995). Erinevused valgu järjestustes ilmnevad kolmanda Ig domeeni osas, mida seostatakse nende valkude erineva funktsionaalsusega. (Pimenta jt, 1995)

IgLON perekonna valgud suudavad rakkude pinnal moodustada homofiilseid või heterofiilseid dimeere – digloneid (Pimenta jt, 1995; Zhukareva ja Levitt, 1995; Gil jt, 2002; Eagleson jt, 2003; Reed jt, 2004). On näidatud, et hetero- ja homofiilsed interaktsioonid on afiinsuselt erinevad ning enamjaolt on homofiilsed interaktsioonid nõrgemad kui heterofiilsed (Reed jt, 2004; joonis 3).



Joonis 3. IgLON perekonna valkude homofiilsete ja heterofiilsete interaktsioonide hierarhia. Kõige tugevama afiinsusega on LSAMP (L)–CEPU-1 (C; närilise *Ntm* ortoloog kanas) ja LSAMP–OBCAM (O) diglonid ning kõige nõrgema afiinsusega OBCAM-i ja LSAMP-i homofiilsed interaktsioonid. Modifitseeritud Reed jt (2004) järgi.

Täiskasvanud organismis on leitud IgLON-itel rolle veel mitmetes protsessides. Ajukoe kahjustuste tagajärjel reguleeritakse astrotsüütide regeneratsiooniprotsessis üles nii Kilon (*Negr1*; Schäfer jt, 2005) kui OBCAM (Sugimoto jt, 2010). *NEGR1* valku on inimese puhul seostatud ülekaalulisusega (Elks jt, 2010; Kim jt, 2017). Jacobseni sündroomi puhul on deleteerunud OPCML (*opioid binding protein/cell adhesion molecule like*, raku adhesioonimolekuli sarnane opioide siduv valk; närilise OBCAM-i ortoloog inimeses) ja neurotrimiini geeni piirkonnad (Ji jt, 2010). LSAMP on seotud ärevuse (Catania jt, 2008; Innos jt, 2011) ja teiste käitumisseisunditega, näiteks depressiivse häire ja paanikahäiretega (Koido jt, 2012; Innos jt, 2012), meeste suitsiidikäitumisega (Must jt, 2008) ning skisofreenia ja bipolaarse häirega (Behan jt, 2009). IgLON perekonna valkudel on näidatud ekspressiooni muutuseid neuraalsete kasvajate glioomide korral (Reed jt, 2007), aga ka mitteneuraalsetes kudedes agressiivse eesnäärme kasvaja puhul afro-ameerika meeste seas (Petrovics jt, 2015), epiteeliaalse munasarja kasvaja (Ntougkos jt, 2005) ning selgerakulise neeruraku kartsinoomi (Chen jt, 2003) puhul.

1.3.1.1.1 Neurotrimiin

Koduhiirel (*Mus musculus*) paikneb neurotrimiini geen 9. kromosoomis (NCBI 1) ning sellelt kodeeritakse 65 kDa massiga NTM valku (Struyk jt, 1995). *Ntm* geen on konserveerunud mitmetes liikides, sh inimeses (NCBI 1). Neurotrimiini hakatakse IgLON perekonna valkudest kõige varasemalt aju arengus ekspresseerima (Struyk jt, 1995) ning esmased ekspressioonialad on rostraalses dorsolateraalses *striatum*'is (Gil jt, 1998). Täiskasvanud ajus ekspresseeritakse NTM-i peamiselt korteksi sensorsetes ja motoorsetes regioonides, kusjuures ekspressioonialad kattuvad suuresti LSAMP-i ekspressioonialadega (Struyk jt, 1995; Gil jt, 2002). Lisaks korteksile ekspresseeritakse NTM-i ka seljaajus (Grijalva jt, 2006). Arvatakse, et NTM-i ekspressioon korteksi nooremates kihtides (kihid IV–VI), alusplaadil, rostraalses lateraalses talamuses ning ajusilla tuumades ja väikeajus mängib rolli talamuse-korteksi ja ajusilla-väikeaju vaheliste projektsioonide arengus (Gil jt, 1998). Neurotrimiin seondub

homofiilselt dorsaaljuure ganglioni (DRG, *dorsal root ganglion*) ja hipokampuse neuronitega, soodustades nende neuriitide väljakasvu (Gil jt, 1998; Gil jt, 2002). Ülemise kaelaganglioni (SCG, *superior cervical ganglion*) neuronitega seondub NTM heterofiilselt ning inhibeerib nende neuriitide väljakasvu (Gil jt, 2002). Lisaks on näidatud, et neurotrimiiniil on roll ka Schwanni rakkude jagunemisel ja migreerumisel närvikahjustuse järel (Yu jt, 2012).

1.3.1.1.2 OBCAM

Koduhiirel paikneb geen *Obcam/Opcml* 9. kromosoomis ning on konserveerunud mitmetes liikides, sh inimeses (NCBI 4). *Obcam* geenil on kaks alternatiivset promootorit, millelt kodeeritakse 51 kDa valku, mida ekspresseeritakse peamiselt suuraju korteksi, vaheaju ja hipokampuse piirkondades, ja 46 kDa valku, mida ekspresseeritakse peamiselt väikeajus ja haistesibulas (Struyk jt, 1995; Miyata jt, 2003; Reed jt, 2007; Vanaveski jt, 2017). OBCAM-i ekspressioon on kontsentreeritud dendriitidel ja neuronite kehal postsünaptiliselt (Miyata jt, 2003).

1.3.1.1.3 NEGR1

Koduhiirel paikneb *Negr1* geen 3. kromosoomis ning on paljude teiste liikide seas konserveerunud ka inimeses (NCBI 2). *Negr1* geen kodeerib 46 kDa massiga valku NEGR1, mis on vähem glükosüleeritud kui teised IgLON perekonna liikmed (Funatsu jt, 1999). NEGR1 sarnaneb 56% ulatuses LSAMP-iga, 49% ulatuses OBCAM-iga ja 48% ulatuses neurotrimiiniga (Miyata jt, 2003). Sarnaselt LSAMP-ile ekspresseeritakse ka NEGR1 neuronite dendriitidel ja kehal (Funatsu jt, 1999; Miyata jt, 2003). KNS-is ekspresseeritakse *Negr1* haistesibulas, suuraju korteksis, vaheajus, hipokampuses ja väikeajus ning ekspressioonitase kasvab peale sünni kuni täiskasvanueani (Miyata jt, 2003).

1.3.1.1.4 IgLON5

IgLON5 geen paikneb koduhiirel 7. kromosoomis ning ekspresseerub embrüonaalselt kesknärvisüsteemis ja jäsemetes (NCBI 5). Täiskasvanud organismis ekspresseeritakse

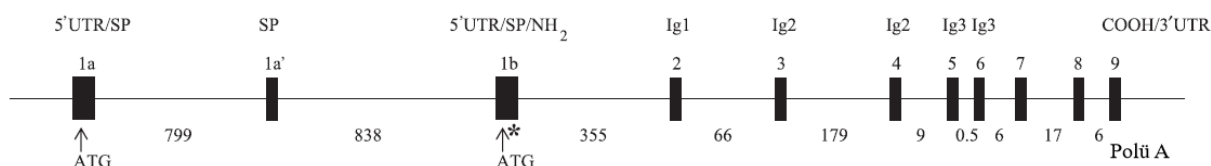
IgLON5 kesknärvisüsteemi DRG neuronitel ja seljaajus (Gu jt, 2015) ning lisaks ka testistes, maos ja piimanäärmetes (NCBI 5). IgLON5 homolooge leidub mitmetes organismides, sh inimeses (NCBI 5). IgLON5 on seostatud autoimmuunsuse (Leypoldt jt, 2015), neurodegeneratiivsete haiguste (Leypoldt jt, 2015) ja unehäiretega (Sabater jt, 2014; Leypoldt jt, 2015).

1.3.1.1.5 LSAMP

Limbilise süsteemiga seotud membraanivalk (LSAMP, *limbic system-associated membrane protein*) on IgLON perekonna raku adhesioonimolekulide hulka kuuluv (Funatsu jt, 1999) *Lsamp* geenilt kodeeritud 64-68 kDa kõrgelt glükosüleeritud valk (Zacco jt, 1990). *Lsamp*-i cDNA kodeerib 338 aminohappe pikkust polüpeptiidi (Pimenta ja Levitt, 2004), mille struktuuri iseloomustavad kolm immunoglobuliini (Ig) domeeni (Pimenta jt, 1995). LSAMP valk on imetajate seas konserveerunud, sarnanedes aminohappelise järjestuse poolest inimese ja närilise vahel 99% ulatuses. Erinevus seisneb vaid neljas aminohappes. (Pimenta jt, 1995; Pimenta jt, 1996) LSAMP on 55% ulatuses homoloogne OBCAM valguga ja 54% ulatuses neurotrimiiniga (Pimenta jt, 1996). LSAMP valku ekspresseeritakse neuronite pinnal imetajate KNS-i kortikaalsetes ja subkortikaalsetes regioonides, mis sisaldavad või võtavad vastu projektsioone limbilise süsteemi struktuuridelt ning millel on roll nii käitumises kui mälus (Zacco jt, 1990). Täpsemalt ekspresseeritakse LSAMP valku neuronite keha ja proksimaalsete dendriitide pinnal (Zacco jt, 1990). Rakumembraanile kinnitumist vahendavad kaks signaaljärjestust, signaalpeptiid ja hüdrofoobne C-terminus (Pimenta jt 1995; Pimenta jt, 1996), ning membraani integreerumiseks on oluline ka glükosüül-fosfatidüül-inositol (GPI, *glycosyl-phosphatidyl-inositol*) ankur (Pimenta jt, 1995; Zhukareva ja Levitt, 1995). On näidatud, et astrotsüütide ja mikroglia pinnal LSAMP valku ei ekspresseerita (Levitt, 1984; Zacco jt, 1990; Sharma jt, 2015). LSAMP valgu ekspresseerumises on erinevused täiskasvanud organismi ja areneva organismi vahel. Nii loote kui vastsündinu arenevas ajus ekspresseeritakse LSAMP-i sarnaselt nii aksonitel kui ka neuronite kasvukoonustel. Täiskasvanud organismis ekspresseeritakse LSAMP-i vaid neuronite keha ja dendriitidel. (Zacco jt, 1990) Lisaks närvisüsteemile ekspresseeritakse LSAMP-i vähesel määral ka munasarjades, piimanäärmetes, põies ning embrüonaalselt ka jäsemetes (NCBI 3).

Hiire *Lsamp* geen asub 16. kromosoomis umbes 2,28 Mbp pikkusel alal ning sisaldab 11 eksonit (Pimenta ja Levitt, 2004). *Lsamp* geenile on iseloomulik kahe esimese eksoni (1a ja 1b)

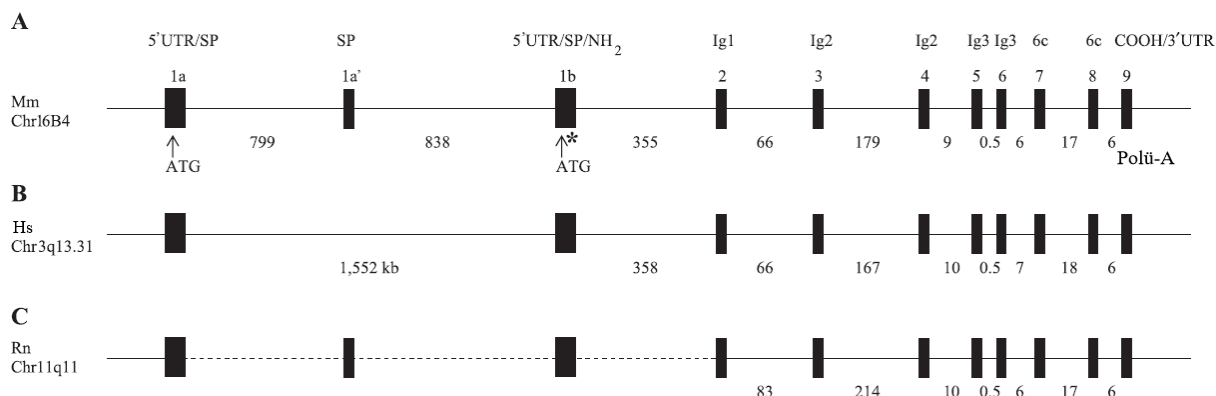
olemasolu, millele mõlemale eelneb funktsionaalne promootor. Promootor 1a on aktiivsem näiteks klassikalistes limbilise süsteemi piirkondades, eriti hipokampuses, ventraalses *striatum*'is ja amügdalas, samas kui promootor 1b on aktiivsem sensoorsetes tuumades ning primaarse korteksi alades. Mõlemad promootorid ekspresseeruvad maitse- ja haistmisinfo töötlemisega seotud ajuosades. (Philips jt, 2015) DNA järjestus, millelt kodeeritakse Ig esimene domeen, paikneb täielikult eksonis 2, Ig teist domeeni kodeerivad alad eksonites 3 ja 4 ning Ig kolmandat domeeni kodeerivad alad eksonites 5 ja 6 (Pimenta ja Levitt, 2004; joonis 4).



Joonis 4. Hiire *Lsamp* geeni struktuur. Eksonid on nummerdatud geeni 5'-otsast ning märgitud joonisele mustade kastidena (eksonid 1a, 1a' ja 1b, immunoglobuliini (Ig) domeene kodeerivad eksonid 2-6 ning eksonid 7-9). Intronite suurus on märgitud kilobasipaaridena. Tärn – 1b eksoni teine osa, mis esineb mõlemalt promootorilt kodeeritud transkriptides. Lühendid: SP – signaalpeptiid. Modifitseeritud Pimenta ja Levitt (2004) järgi.

Viiendalt eksonilt saadakse alternatiivset splaissimist kasutades kolm transkripti. Seitse eksonit (1b-6 ja 9) kodeerivad *Lsamp*-i cDNA-d (joonis 4). Eksonid 1a ja 1a' kodeerivad alternatiivset 5'-UTR signaalpeptiidi, ekson 1b sisaldab 5'-UTR-i, initsiaatorkoodonit ning LSAMP peptiidi N-terminuse ja signaalpeptiidi kodeerimiseks vajalikku nukleotiidsset järjestust (joonis 4). Ekson 9 sisaldab nukleotiidsset järjestust peptiidi C-terminuse kodeerimiseks ning 3'-UTR regiooni, mis sisaldab polüadenülatsoonisignaali. (Pimenta ja Levitt, 2004) Umbes 99,65% geenist moodustavad intronid. Eksonite 1a ja 1a' ning 1a' ja 1b vahele jäävad kaks väga ulatuslikku intronit. (Pimenta ja Levitt, 2004). Suured 5'-intronid on IgSF liikmetele iseloomulik omadus ning need sisaldavad reguleerivaid elemente, mis osalevad geeni vaigistamisel ning geeniekspressiooni muustrite reguleerimises (Edelman ja Jones, 1998; Kallunki jt, 1995; Kallunki jt, 1997; Pimenta ja Levitt, 2004).

Geeni intron-ekson struktuur on liikide vahel tugevalt konserveerunud (Pimenta ja Levitt, 2004; joonis 5). Kui võrrelda hiire *Lsamp* geeni struktuuri roti ja inimese *LSAMP* geeniga, siis kõigil kolmel ortoloogil on eksonite pikkus ja positsioon identne. Erandiks on ekson 1a', mis inimese *LSAMP* geenis puudub – mutatsioonide tagajärjel on tekkinud raaminihe, mis on viinud stoppkoodoni tekkele 1a' eksonist allavoolu, ning defekt 1a' eksoni aktseptorsaidis. Ka intronid on lähedase suurusega. (Pimenta ja Levitt, 2004)



Joonis 5. Koduhiire (Mm), nüüdisinimese (Hs) ja rändroiti (Rn) *Lsamp* geeni struktuuri võrdlus. Kõigi kolme liigi puhul on *Lsamp* geeni ekson-intron paigutus küllaltki konserveerunud (erandina inimene, kelle *LSAMP* geenis puudub ekson 1a'). Intronite suurused on märgitud kiloaluspaaridena (kb, kilobase). Tärn – 1b eksoni teine osa, mis esineb mõlemalt promootorilt kodeeritud transkriptides. Lühendid: SP – signaalpeptiid. Modifitseeritud Pimenta ja Levitt (2004) järgi.

Lsamp-i transkriptide ekspressiooni on vaadeldud ka E15-16 vanuse roti eesajus. Selles vanuses esineb *Lsamp*-i transkriptide ekspressioon tulevase limbilise korteksi piirkonnas, basaalses eesajus ning hüpotalamuses. Mittelimbilises dorsaalsemas korteksi osas on ekspressioon väike. Edasises embrüonaalses arengus (E20) jääb ekspressioonitase tulevases limbilises korteksis, talamuses ning hüpotalamuses väga kõrgeks. Täiskasvanud roti ajus jääb *Lsamp*-i transkriptide ekspressioonitase kõrgeks peririnaalses korteksis, amügdalas, hüpotalamuses ja mediaalses talamuse piirkonnas. Nõrk või olematu ekspressioonitase on tuvastatav primaarsetes sensoorsetes neokorteksi piirkondades. (Pimenta jt, 1995)

Esimesed signaalid *Lsamp* geeni promootoritelt 1a ja 1b on hiires tuvastatud juba E12.5 arengupäeval. Promootorilt 1a saadav LSAMP-i produkt on esialgu aktiveeritud keskajus, eriti neuraaltoru välimistes kihtides. Eesajust tulevad signaalid on detekteeritavad alates E13.5 vanusest. Promootorilt 1b saadav LSAMP-i produkt on tuvastatav külgvatsakese lateraalsel poolel. Hilisemas embrüonaalses arengus (E15.5) on tugev signaal tuvastatav ka ajuveejuha ümbruses ning neokorteksi sensoorsete regioonide sügavamates kihtides. E15.5 vanuses embrüos on *Lsamp* 1a promootor aktiivne läätstuumas (*caudate putamen*), mida täiskasvanud hiire ajus pole täheldatud. (Philips jt, 2015)

Rakukultuuris soodustab LSAMP läbi homofiilsete interaktsioonide limbiliste neuronite adhesiooni ning neuriitide väljakasvu (Pimenta jt, 1995; Zhukareva ja Levitt, 1995; Gil jt, 2002). Blokeerides LSAMP-i mõju anti-LSAMP antikehaga, ei kasva dendriidid rakukultuuri neuronitel nii pikaks kui kontrollgrupil, samuti on mõjutatud aksonite väljakasv (Pimenta jt,

1995; Zhukareva ja Levitt, 1995) ning limbilise süsteemi projektsioonide korrektne kujunemine erinevate rakkude vahel (Pimenta jt, 1995). On näidatud, et LSAMP-i esimene Ig domeen on vajalik neuriitide väljakasvu soodustamiseks hipokampuse neuronitel (Eagleson jt, 2003; Pimenta jt, 1995). LSAMP-i teine Ig domeen vahendab LSAMP-i heterofiilseid interaktsioone (Pimenta ja Levitt, 2004), mis vastutavad SCG neuronite neuriitide kasvu inhibeerimise eest (Eagleson jt, 2003). LSAMP inhibeerib ka DRG neuronite neuriitide kasvu, interakteerudes heterofiilselt neurotrimiiniga (Gil jt, 2002).

1.3.1.1.5.1 LSAMP puudulikkusega hiiremodelid

Esimene LSAMP puudulikkusega (edaspidi ka *Lsamp*^{-/-}) hiireliin loodi USA-s Vanderbilti ülikoolis (Catania jt, 2008). Selleks asendati 69 nukleotiidi ekson 2 ning 31 nukleotiidi intron 2 LacZNeo kassetiga (Catania jt, 2008), mille tulemusena saadi *Lsamp*^{-/-} hiireliin.

Eestis Tartu Ülikoolis loodi teine *Lsamp*^{-/-} hiireliin (Innos jt, 2011). Selleks asendati *Lsamp* geeni ekson 1b LacZNeo kassetiga (Innos jt, 2011).

Lsamp^{-/-} hiired on viljakad, elujõulised, normaalse välimuse, suuruse, kasvu ja arenguga (Catania jt, 2008; Innos jt, 2011). *Lsamp*^{-/-} hiired ei eristu sensomotoorse, auditoorse, lõhnatundmise ega nägemisvõimekuse poolest oma metsiktüüpi (*Lsamp*^{+/+}) pesakonnakaaslastest (Catania jt, 2008; Innos jt, 2011).

Sotsiaalne käitumine erineb metsiktüüpi ja *Lsamp*^{-/-} hiirte vahel. *Lsamp*^{-/-} hiired on uutes olukordades vähem ärevad, uudishimulikumad ning aktiivsemad kui nende metsiktüüpi pesakonnakaaslased (Catania jt, 2008). *Lsamp*^{-/-} hiirtel puudub pesakonnas kindel hierarhia – *Lsamp*^{-/-} hiirtel ei ole kirjeldatud vurrude pügamist, mis metsiktüüpi hiirtel esineb (Innos jt, 2011). Samuti on *Lsamp* geeni puudulikkusega hiired vähem agressiivsed kui nende metsiktüüpi pesakonnakaaslased (Innos jt, 2011).

On näidatud, et *Lsamp* geeni puudulikkusega hiirte ajus on võrreldes metsiktüüpi pesakonnakaaslastega kõrgem serotoniini metabolism dorsaalses *striatum*'is ja keskajus ning esineb muutusi serotoniini baastasemes (Innos jt, 2013a). *Lsamp* geeni anatoomilist ekspressiooni tagaajus ei ole senini detailselt kirjeldatud, seetõttu on käesoleva magistritöö üks eesmärkidest kirjeldada *Lsamp* geeni 1a ja 1b isovormide ning nende summaarset anatoomilist ekspressioonimustrit just kesk- ja tagaajus. LSAMP valgu ja serotoniinisüsteemi seoste uurimiseks teostati kroonilise estsitalopraami manustamise katse *Lsamp* puudulikkusega hiirtel.

2. EKSPERIMENTAALNE TÖÖ

2.1. Töö eesmärgid

1. Kirjeldada detailselt *Lsamp* geeni ekspressioonimustrit koduhiire kesk- ja tagaajus. Välja selgitada, kas *Lsamp* promootori spetsiifilised isovormid (1a või 1b) avalduvad raphe tuumades.
2. Varasemalt on näidatud, et *Lsamp* geeni puudulikkusega hiirte ajus on võrreldes metsiktüüpi pesakonnakaaslastega kõrgem serotoniini metabolism ning esineb muutusi serotoniini baastasemes, mistõttu oli eesmärgiks uurida serotoniinisüsteemi põhjalikumalt, seekord manustades *Lsamp*^{-/-} hiirtele ja nende metsiktüüpi pesakonnakaaslastele krooniliselt (18 päeva) SSRI-d estsitalopraami. Sellest lähtuvalt püstitati järgmised kitsamad eesmärgid:
 1. Iseloomustada katseloomade kehakaalu ja käitumise muutusi vastusena SSRI kroonilisele manustamisele.
 2. Iseloomustada monoamiin serotoniini ja selle metaboliidi muutusi *Lsamp*^{-/-} hiirte ajus vastusena SSRI kroonilisele manustamisele.

2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1. Töös kasutatud katseloomad

Käesolevas magistritöös kasutati katseloomadena Tartu Ülikoolis (meditsiiniteaduste valdkond, bio- ja siirdemeditsiini instituut, füsioloogia osakond) loodud *Lsamp* geeni puudulikkusega hiiri (Innos jt, 2011). Kontrollgrupina kasutati metsiktüüpi (edaspidi ka *Lsamp*^{+/+}) pesakonnakaaslast. Võrreldava geneetilise tausta jaoks kasutati segataustaga hiiri [(129S6/SvEvTac × C57BL/6) × (129S6/SvEvTac × C57BL/6)] (Innos jt, 2011) ning kõik katsed tehti F2 põlvkonna hübriididega vanuses 3-5 kuud. Katsetes kasutati vaid isaseid loomi. Katseloomi kasutati vastavalt Euroopa Liidus kehtestatud eeskirjadele (FELASA). Katseloomad elasid standardsetes loomapuurides (42,5 x 26,6 x 15,5 cm), 10 looma puuris temperatuuril 22±1°C 12 t/12 t valguse-pimeduse režiimil (kl 19 kustutati tuled). Toit ja vesi olid loomadele vabalt kättesaadavad. Puurides kasutati haavapuidust allapanu (2 cm kiht) ning

haavapuidust pesamaterjali (0,5 l), mida vahetati igal nädalal. Kõikide eksperimentide läbiviimine oli kooskõlas Euroopa Liidu direktiiviga (2010/63/EU) ning katsete teostamiseks oli olemas Eesti Vabariigi põllumajandusministeeriumi Loomkatseprojekti loakomisjoni luba (28. aprill 2014, nr 29). Loomkatsed viidi läbi koos vastavat luba omava isikuga.

2.2.2. *In situ* hübridisatsioon digoksügeniiniga (Dig) märgistatud riboprooviga vabalt ujuvatel ajulõikudel

In situ hübridisatsiooni (ISH) jaoks sünteesiti esmalt RNA riboproov. Digoksügeniiniga (Dig) märgistatud riboproovide *template*'ina kasutati *Lsmp* 1a promootori spetsiifilist cDNA fragmenti (400 aluspaari (bp, *base pair*)), mis sisaldas 1a spetsiifilist 5'UTR-i ja 1a ning 1a' eksoneid (Philips jt, 2015). Universaalne *Lsmp*'i sond (567 bp) transkribeeriti eksoneid 2-6 sisaldavalt cDNA fragmendilt (Philips jt, 2015). Riboproovi sünteesimiseks segati toatemperatuuril 2 µl 10X transkriptsioonipuhvrit (ThermoFisher Scientific), 2 µl 10X nukleotiidide segu (ThermoFisher Scientific), 1-1,5 µl lineariseeritud plasmidi (Philips jt, 2015), 0,5 µl ribonukleaasi inhibiitorit (ThermoFisher Scientific), 20 ühikut T3 RNA polümeraasi (Roche) ja ddH₂O (milliQ) vesi, et saavutada kogumaht 20 µl. Seejärel inkubeeriti segu 37°C juures 2-3 h. Edasi kanti 1 µl transkriptsioonisegu 1% agaros/TBE (Tris-Boraat-EDTA) geelile. Kui geelile ilmus vähemalt 10X tugevam RNA *band*, kui plasmiidil, oli sünteesitud 10-15 µl RNA proovi. Seejärel lisati 1 µl RNAasi vaba DNAas I (50 U/ µl; Thermo Scientific) ning segu inkubeeriti 37°C juures 15 min. Järgnevalt lisati 100 µl ddH₂O-d, 10 µl 4 M LiCl ja 300 µl etanooli. Segu inkubeeriti -20°C või -70°C juures 2 h. Seejärel tsentrifuugiti (Thermo Scientific Heraeus Fresco 17, 24 x 1,5/2,0 ml rootor ClickSeal kaanega) segu 4°C juures pöõretel 13000 p/min 20 min ning RNA proov pesti üks kord 70% etanooliga ja lasti õhu käes kuivada. Pärast kuivamist lahustati RNA proov 50% formamiidis kontsentratsioonini 0,1 µg/µl ja hoiustati -20°C juures.

ISH protokoll jaguneb kolme päeva vahel. Esimesel päeval lõigati krüomikrotoomiga (Microm HM-560) üleöö 4% paraformaldehüüdi/20% sahharoosi lahuses 4°C juures seisnud P23 vanuses dissekteeritud *Lsmp* hiirte ajudest 40 µm külmlõigud. *In situ* hübridisatsioon viidi läbi vabalt ujuvatel ajulõikudel, kasutades Dig-UTP (Roche) märgisega *sense* ja *antisense* RNA riboproove. Külmlõikudele kanti rakkude permeabiliseerimiseks soolalahusega fosfaatpuhvri (PBS, *phosphate-buffered saline*) ja 0,25% TritonX-100 lahus ning ajulõike hoiti 15 min loksutil. Järgnevalt pesti lõigud 5X Na-tsitraadi puhverlahusega (SSC, *saline-sodium citrate*

buffer), hoides lõike 5 min loksutil. Seejärel kanti lõikudele prehübridisatsioonilahus (50% formamiid, 5X SSC (pH 5), 2% blokeerimisreagent (BR; Roche)) ja lõike eelhübridiseeriti 65°C juures loksutil 1-3 h. Hübridisatsiooni jaoks kuumutati RNA riboproovi 5 min jooksul 85°C juures, misjärel jahutati see koheselt jääl. Proov (1 µg/ml) segati prehübridisatsioonilahusega ja lisati lõikudele. Lõike inkubeeriti loksutil 65°C juures üleöö. RNA riboproovide seondumise spetsiifilisuse kontrollimiseks inkubeeriti osasid ajalõike *sense*-prooviga.

Teisel päeval kanti lõikudele 30 minutiks lahus 1 (50% formamiid, 5X SSC (pH 5), 1% naatriumdodetsüülsulfaat (SDS, *sodium dodecyl sulfate*)) ning lõigud viidi 65°C juurde loksutile. Seejärel kanti lõikudele 2x30 minutiks lahus 2 (50% formamiid, 2X SSC (pH 5)) ja lõigud viidi 60°C juurde loksutile. Järgnevalt pesti lõike 3x5 min TBST puhvriga (1M Tris, 5M NaCl, 2M KCl, ddH₂O, Tween 20) ning kanti lõikudele antikeha mittespetsiifilise seondumise vältimiseks preblokeerimisegu (2% BR/TBST), milles lõigud olid loksutil 1 h. Seejärel kanti lõikudele anti-Dig antikeha, mis oli konjugeeritud aluselise fosfataasiga (Roche, lahjendus 1:2000), ja lõigud viidi 4°C ruumi loksutile 24 tunniks loksuma.

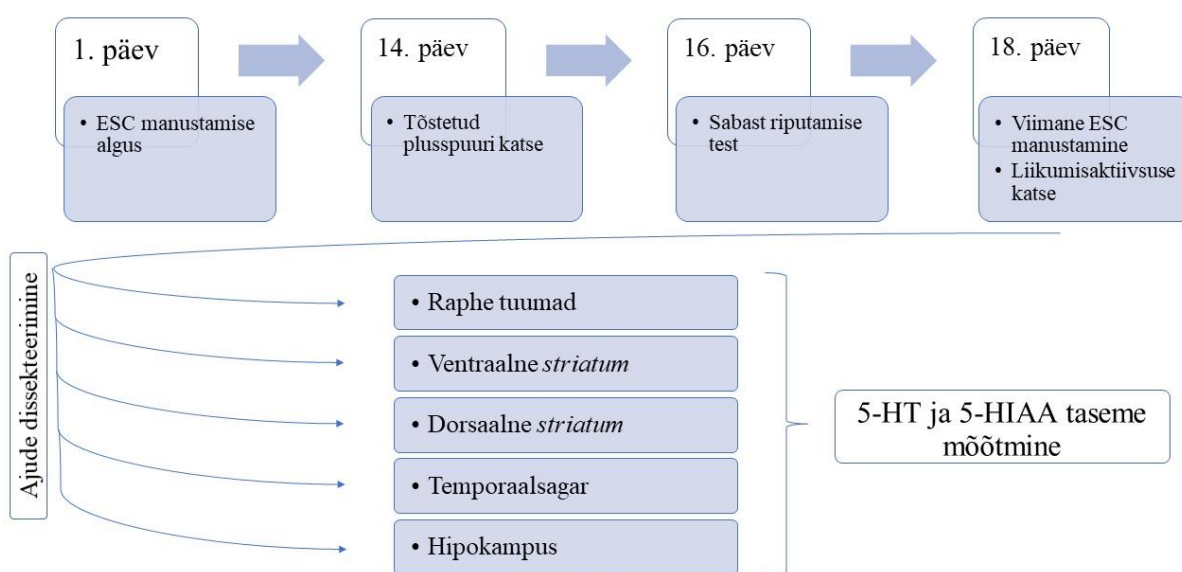
Kolmandal päeval pesti lõike 3x10 min TBST puhvriga ja 2x10 min aluselise fosfataasi puhvriga (NTMT; 5M NaCl, 1M Tris (pH 9), 2M MgCl₂, 10% Tween). Peale pesu kanti lõikudele aluselise fosfataasi lahus (BM *Purple AP Substrate*, Roche) ja lõigud asetati toatemperatuurile loksuma seniks, kuni lõigud värvusid sinakalt. Seejärel kanti lõikudele PBS, mis lõpetas värvumisreaktsiooni ja kus lõigud olid kuni alusklaasile (mitteadhesiivsed; Hirschmann) kandmiseni. Enne alusklaasile kandmist tõsteti lõigud ümber 0,5 % želatiini/milliQ lahusesse ja sealt edasi klaasile. Lõikudel lasti õhu käes klaasil kuivada ning lõpuks sulundati Pertexiga (HistoLab) ja kaeti kattedklaasiga (Deltalab).

2.2.3. Estsitalopraami krooniline manustamine

Käesolevas töös kasutati SSRI-d estsitalopraami (Sigma Aldrich), mis oli lahustatud füsioloogilises lahuses (0,9% NaCl). Kontroll-lahusena kasutati füsioloogilist lahust. Lahust süstiti kõhuõõnde ehk intraperitoneaalselt (i.p.) 18 järjestikusel päeval annuses 10 mg/kg mahus 10 ml/kg.

2.2.4 Käitumiskatsed

Kõik käitumiskatsed viidi läbi kl 11:00 ja 19:00 vahel. Loomad viidi katseruumi 30 minutit enne katse algust, et nad saaksid katseruumi tingimustega kohaneda. Käitumiskatsed sooritati järgmiselt: 14. süstimispäev – tõstetud plusspuuri katse, 16. süstimispäev – sabast riputamise test, 18. süstimispäev – liikumisaktiivsuse katse (joonis 6). Katse viimasel päeval (18. süstimispäev) surmati loomad peale katse lõppu tservikaalse dislokatsiooni teel ning neilt dissekteeriti ajud, millest eraldati viis ajuosa: raphe tuumad, ventraalne *striatum*, dorsaalne *striatum*, temporaalsagar ja hipokampus (joonis 6).



Joonis 6. Katsedisaini plaan. Lühendid: 5-HT – serotoniin; 5-HIAA – 5-hüdroksü-indoolatseethape, serotoniini metaboliit; ESC – estsitalopraam (*escitalopram*).

2.2.4.1 Tõstetud plusspuuri katse

Tõstetud plusspuur on neljast õlast koosnev plussi-kujuline platvorm, kus vaheldumisi paiknevad 14 cm kõrguste seintega suletud ning ilma seinteta avatud õlad. Kõik õlad on 17,5 cm pikkused ja 5 cm laiused. Platvorm on tõstetud 30 cm kõrgusele.

Tõstetud plusspuur on levinud meetod näriliste ärevuse uurimiseks (Lister, 1987). Katse raames mõõdeti järgmisi parameetreid: avatud ja suletud õlgadele sisenemiste arv, avatud õlgadel

veedetud aeg sekundites, avatud ja suletud õlgade külastuskordade suhe, suletud õlast avatud õlale „piilumiste“ arv ehk riskihindamiskäitumine ning suletud ja avatud õlgadelt allavaatamiste arv.

Katses alguses asetati loom platvormi keskele peaga suletud õla suunas. Avatud õlale sisenemiseks loeti hetk, kui loom astus platvormile kõigi nelja jäsemega. Platvormid puhastati iga looma järel etanoolilahusega ja kuivatati lappidega. Katselooma käitumist filmiti 5 minuti jooksul ning seda hindas video põhjal kogenud spetsialist, kes ei teadnud katseloomade genotüüpi.

2.2.4.2 Sabast riputamise katse

Sabast riputamise katse on levinud meetod antidepressantide mõju hindamiseks (Porsolt jt, 1987). Katse põhineb õpitud abituse mudelil – asetades looma väljapääsmatusse olukorda, näiteks pannes ta sabapidi rippuma, otsib loom algul pääseteed, üritab ennast üles vinnata ja sipleb. Mõne aja pärast, kui loom ei leia võimalust põgeneda, jääb ta tardunult rippuma. On näidatud, et mida tõhusam on antidepressant, seda tõhusamalt vähendab ta tardumist selles katses.

Katses vaadeldi järgmisi parameetreid: tardumisseisundis viibitud aeg, tardumiseepisoodide arv ning hetkeliste ehk mikrotardumiste arv. Mikrotardumisteks loeti katselooma lühiajalist (1-2 s) tardumist.

Katseloomad riputati sabast tööstusteibi abil 60 cm kõrgusele. Korraga filmiti 3-4 looma, kes olid omavahel paberseintega eraldatud. Ühte gruppi filmiti 6 minutit, millest analüüsiti viimast nelja. Videoid hindas kogenud spetsialist.

2.2.4.3 Liikumisaktiivsuse katse

Katseloomade liikumisaktiivsust mõõdeti 44,8 x 44,8 x 45 cm mõõtmetega helikindlates pleksiklaasist kastides (TSE Systems, Saksamaa) (Denenberg, 1969). Iga kast on ühendatud aparadi ja arvutiga, mis võimaldavad spetsiaalse programmi abil mõõta hiire poolt läbitud üldist teepikkust, nurkade külastuste arvu ning kasti keskel veedetud aega ja selles piirkonnas läbitud teepikkust.

2.2.5. 5-HT ja selle metaboliit 5-HIAA mõõtmine füsioloogilise lahuse ja estsitalopraami kroonilise manustamise järgselt

Kolme kuu vanustele (± 1 nädal) *Lsmp*^{-/-} ja *Lsmp*^{+/+} hiirtele manustati 18. süstimispäeva hommikul viimast korda füsioloogilist lahust või estsitalopraami, mille järgselt 30 min möödudes läbisid katseloomad liikumisaktiivsuse testi. Peale liikumisaktiivsuse testi hiired surmati tservikaalse dislokatsiooni teel. Hiirte ajud dissekteeriti (nagu eelnenud uurimuse puhul: Innos jt, 2013a) ja eraldati hiire aju atlase koordinaatide põhjal (Franklin ja Paxinos, 1997) viis ajuosa: raphe tuumad (dorsaalne ja mediaanne koos), ventraalne *striatum* (sh BST ja *nucleus accumbens*), dorsaalne *striatum* (*caudate putamen*), hipokampus ja temporaalsagar (temporaalkorteks ja amügdala tuumad). Kõik ajuosad külmutati vedela lämmastikuga. Serotoniini ja tema metaboliidi 5-hüdroksüindoolatseethappe (5-HIAA) taset hinnati elektrokeemiliselt kõrgsurvevedelikkromatograafia (HPLC, *high performance liquid chromatography*) meetodit kasutades (kromatograafia viidi läbi TÜ Psühholoogia instituudi neuropsühhofarmakoloogia osakonnas; metoodika kirjeldus: Innos jt, 2013a). Metabolismi intensiivsuse hindamiseks jagati metaboliidi tase serotoniini tasemega (5-HIAA/5-HT).

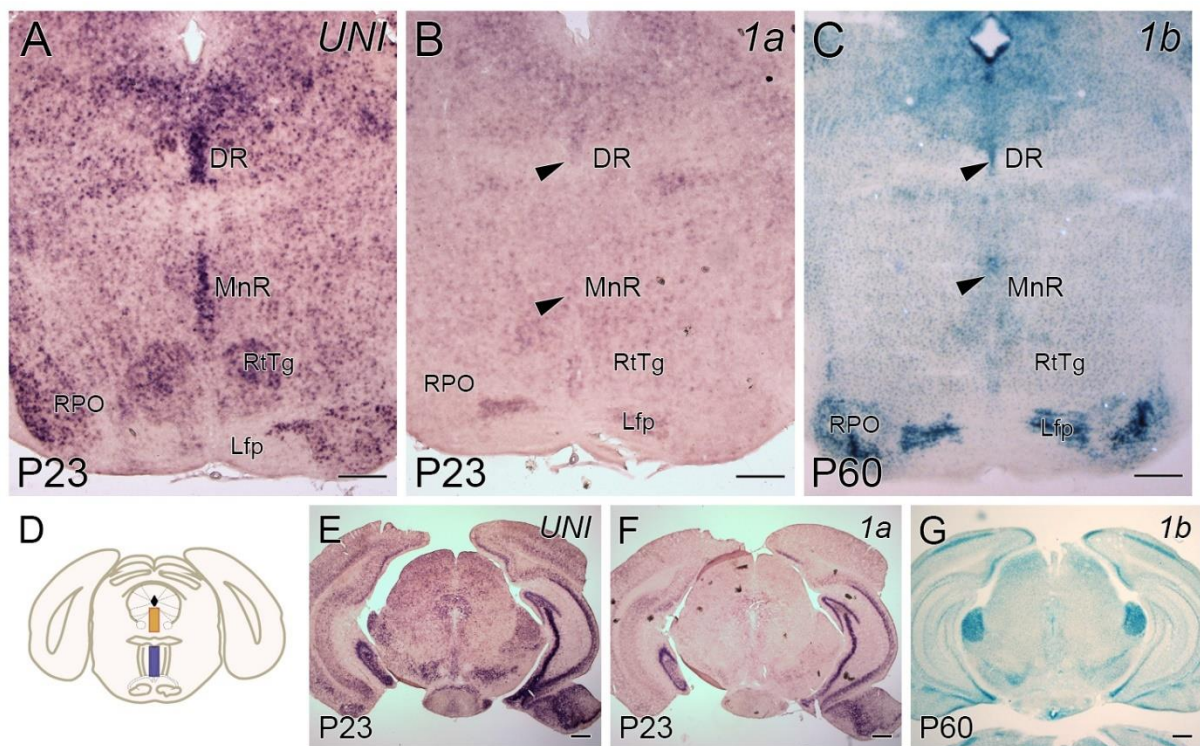
2.3 Tulemused

2.3.1 Dorsaalses ja mediaanses raphe tuumas võib *Lsamp* ekspresseeruda nii 1a kui 1b promootorilt

Käesolevas magistritöös uuriti *Lsamp* geeni ekspressiooni kesk- ja tagaajus, et määrata, kas *Lsamp* promootoritelt pärit transkriptid võiksid ekspresseeruda dorsaalses ja mediaanses raphe tuumas. Varasemalt on näidatud, et *Lsamp* geeni 1a promootorilt pärit transkript ekspresseerub n-ö klassikalistes limbilise süsteemi osades ja 1b promootorilt pärit transkript sensoorse süsteemi alades (Philips jt, 2015). *Lsamp* geeni ekspressiooni ei ole varasemalt serotonergilise süsteemiga seotud raphe tuumades kirjeldatud. Ekspressioonimustri kirjeldamiseks teostati *in situ* hübridisatsioon nii *Lsamp* 1a kui universaalse (*Lsamp* 1a ja 1b) *Lsamp* sondiga P23 vanuse hiire kesk- ja tagaajus. *Lsamp* 1b promootorilt ekspresseeruva transkripti lokalisatsiooni kirjeldamiseks hiire kesk- ja tagaajus kasutati juba olemasolevaid X-gal meetodil värvitud lõike. Nii *Lsamp* 1a kui 1b spetsiifilise kui universaalse värvingu korrektne töötamine on valideeritud Philips jt (2015) poolt radioaktiivse *in situ* meetodil.

Tulemusi analüüsid selgus, et P23 vanuses hiirtel (n=2) andis universaalse *Lsamp* transkripti spetsiifiline *in situ* sond tugeva signaali nii dorsaalse kui mediaanse raphe tuuma piirkonnas (joonis 7A). *Lsamp* 1a ja 1b isovormide spetsiifilised värvingud on tunduvalt vähem intensiivsed (joonis 7B ja C). *In situ* värvingu valideerimiseks on joonisele 7 lisatud rostraalsest piirkonnast tehtud lõiguseeria, kus on näha ka hipokampus (joonis 7E, F, G). Hipokampuse piirkond, mille puhul on varasemalt näidatud *Lsamp*'i ekspressiooni 1a promootorilt (Philips jt, 2015), on tugevalt värvunud nii universaalse kui *Lsamp* 1a sondiga, mis näitab, et värving on õnnestunud ning *Lsamp* 1a promootori ekspressioon kesk- ja tagaajus ongi minimaalne. Käesolevas töös ei tuvastatud teisi *Lsamp* transkripte ekspresseerivaid struktuure peale raphe tuumade, mida poleks juba varem (Philips jt, 2015) kirjeldatud.

Antud tulemused näitavad, et dorsaalses ja mediaanses raphes ekspresseeruvad nii *Lsamp* 1a kui 1b promootorilt pärit transkriptid.

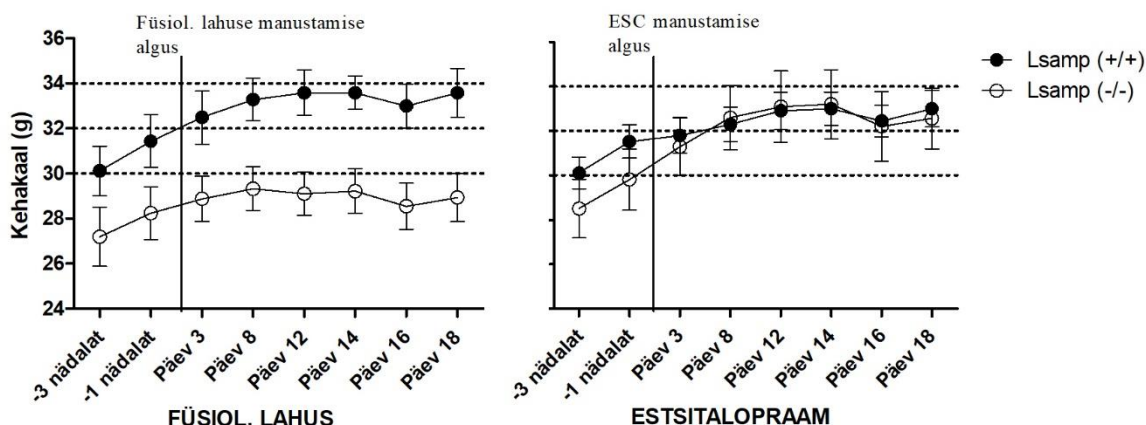


Joonis 7. *Lsamp* geeni transkripti summaarne ning 1a ja 1b isovormi spetsiifiline ekspressioon hiire keskajus. Universaalse (UNI) *Lsamp* sondiga (A) ja *Lsamp* 1a sondiga (B) töödeldud koronaallõik P23 vanuse hiire keskajust. (C) X-gal värving P60 vanuse hiire keskajust *Lsamp* 1b promootorilt ekspresseeruva transkripti kirjeldamiseks. (D) Skeem keskajus asuvate dorsaalse (DR; oranž) ja mediaanse raphe tuuma (MnR; sinine) anatoomilisest paiknemisest (modifitseeritud Dorocic jt, 2014 järgi). (E, F, G) Rostraalsest piirkonnast tehtud lõiguseeria, kus on näha ka hipokampus. (B, C) Mustad noolepead tähistavad dorsaalset (DR) ja mediaanset (MnR) raphe tuuma. Lühendid: Lfp – pikisuunalised ajusilla kiud (*longitudinal pontine fasciculi*), RPO – rostraalne periolivaarne piirkond (*rostral periolivary region*), RtTg – ajusilla tegmentaalne retikulaartuum (*reticulotegmental nucleus of the pons*). Mõõtkava: A, B, C 250 μ m, E, F, G 100 μ m.

2.3.2 Kroonilise estsitalopraami mõju *Lsamp* geeni puudulikkusega ja metsiktüüpi hiirte kehakaalukõverale

Metsiktüüpi ja *Lsamp*^{-/-} hiirte kehakaalu hakati jälgima juba enne käitumiskatsete seeria algust ning jälgiti ka terve katseperioodi vältel (joonis 8). Katseperioodi 14. süstimispäeval viidi läbi tõstetud plusspuuri katse, mille järgselt märgati 2 päeva möödudes kõikidel hiirtel (nii metsiktüüpi kui *Lsamp* geeni puudulikkusega ja nii füsioloogilist lahust kui estsitalopraami saanud hiirte puhul) kaalulangust. Tulemusi analüüsides selgus aga, et kehakaalu osas ei ilmnenu *Lsamp*^{-/-} ja metsiktüüpi hiirte vahel statistiliselt olulisi erinevusi üheski ajapunktis ei füsioloogilist lahust saanud kontrollgrupis ega ka estsitalopraami saanud katsegrupis. Samuti ei

olnud estsitalopraami kroonilisel süstimisel statistiliselt olulist efekti ei metsiktüüpi ega *Lsamp* geeni puudulikkusega hiirte kehakaalule.



Joonis 8. Füsioloogilist lahust ja estsitalopraami saanud hiirte kaalukõverad. 14. päeval viidi läbi tõstetud plusspuuri katse, mille järgselt oli 2 päeva hiljem kõikides gruppides täheldatav väike, statistiliselt ebaoluline kaalulangus, mis on tüüpiline reaktsioon stressivale sündmusele hiirtel. 16. päeval viidi läbi sabast riputamise test ja 18. päeval liikumisaktiivsuse katse. 18. päeval eraldati katseloomadelt ajuosad (5), millest määrati monoamiini serotoniini (5-HT) ja selle metaboliidi (5-HIAA) tasemed. Metsiktüüpi (*Lsamp*^{+/+}) estsitalopraami ja füsioloogilist lahust saanud hiiri oli mõlemas grupis 10 (n=10), *Lsamp*^{-/-} estsitalopraami saanud hiiri oli 10 (n=10), füsioloogilist lahust saanud *Lsamp*^{-/-} hiiri oli 9 (n=9). Katse tulemused on esitatud kujul $\pm$ SEM. Lühendid: ESC – estsitalopraam, g – gramm, SEM – standard error of the mean, keskmise standardviga.

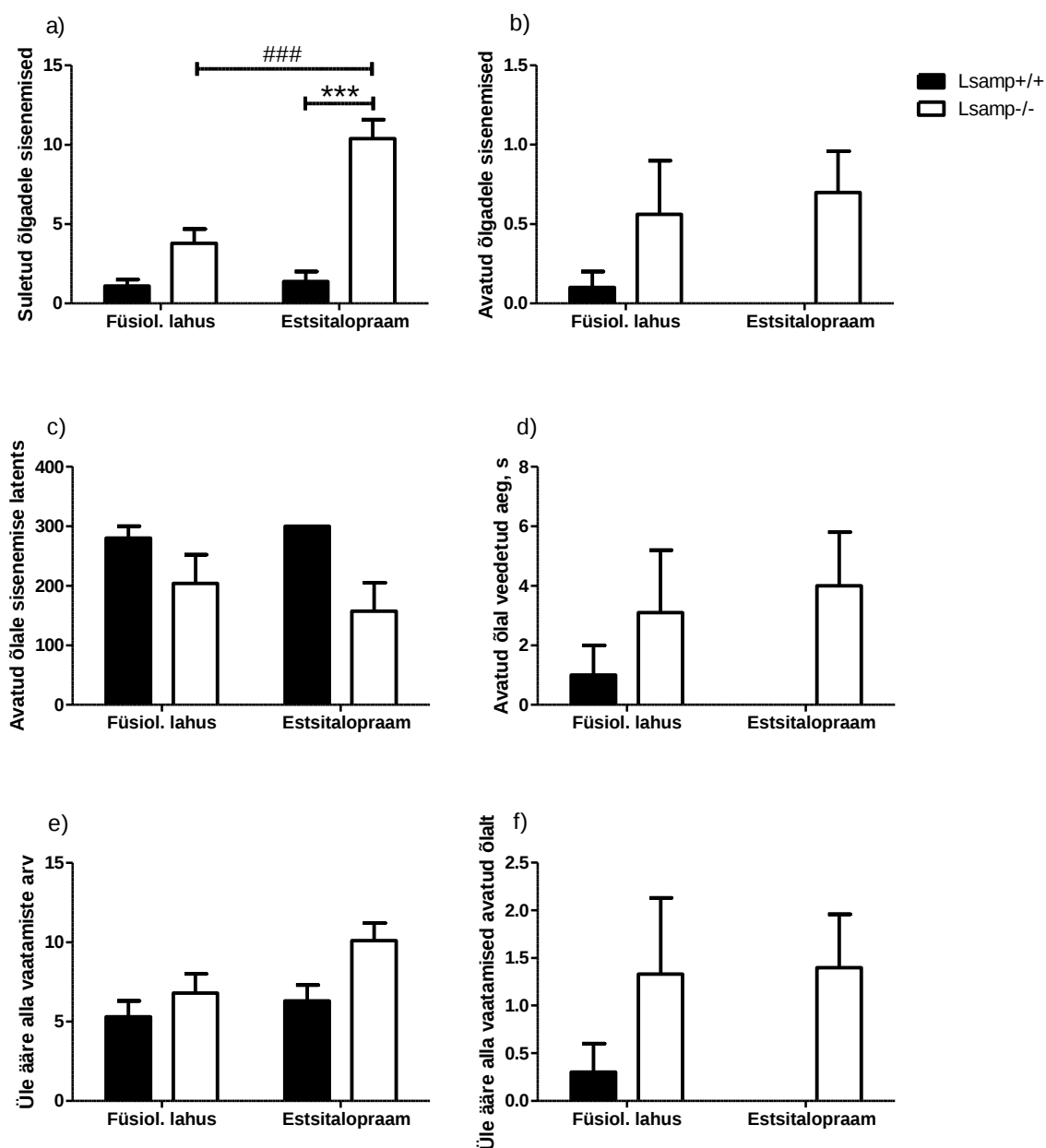
2.3.3 Estsitalopraami kroonilise manustamise mõju käitumisele tõstetud plusspuuri katses

Lsamp geeni puudulikkuse mõju hiire serotoniinisüsteemile uuriti käitumiskatsete seeriaga, milles analüüsiti *Lsamp* geeni puudulikkusega hiirte käitumise muutusi, võrreldes metsiktüüpi (*Lsamp*^{+/+}) pesakonnakaaslastega vastusena estsitalopraami kroonilisele manustamisele. Kõikides käitumiskatsetes oli metsiktüüpi estsitalopraami ja füsioloogilist lahust saavaid hiiri 10, *Lsamp*^{-/-} estsitalopraami saavaid hiiri 10 ning *Lsamp*^{-/-} füsioloogilist lahust saavaid hiiri 9. Kõik käitumiskatsete ja monoamiini metabolismi katse tulemused on esitatud kujul $\pm$ SEM (standard error of the mean, keskmise standardviga).

Suletud õlgadele sisenemiste arv, mis peegeldab liikumisaktiivsust, olenes väga oluliselt nii genotüübist ($F_{1,35}=49,8$; $p=0,00000$), estsitalopraami manustamisest ($F_{1,35}=17,5$; $p=0,00018$) kui ka nende kahe teguri koosmõjust ($F_{1,35}=14,6$; $p=0,00052$). *Post hoc* võrdlus Tukey HSD

testiga näitas, et estsitalopraami manustamine suurendas *Lsamp*^{-/-} grupis suletud õlgadele sisenemiste arvu väga oluliselt ($p < 0,001$) nii võrreldes füsioloogilist lahust saanud *Lsamp*^{-/-} grupiga kui ka estsitalopraami saanud *Lsamp*^{+/+} hiirtega (joonis 9a). Avatud õlgadele sisenemiste arv sõltus samuti genotüübist ($F_{1,35}=7,5$; $p=0,01$), aga mitte estsitalopraami manustamisest ($F_{1,35}=0,011$; $p=0,92$) ega nende tegurite koosmõjust ($F_{1,35}=0,33$; $p=0,57$) (joonis 9b). Avatud õlale sisenemise latents sõltus oluliselt genotüübist ($F_{1,35}=10,1$; $p=0,003$), aga mitte estsitalopraami manustamisest ($F_{1,35}=0,16$; $p=0,7$) ega nende tegurite koosmõjust ($F_{1,35}=0,93$; $p=0,34$) (joonis 9c). Avatud õlgadel viibitud aeg sõltus genotüübist ($F_{1,35}=4,5$; $p=0,04$), aga mitte estsitalopraami manustamisest ($F_{1,35}=0,002$; $p=0,97$) ega nende kahe teguri koosmõjust ($F_{1,35}=0,43$; $p=0,52$) (joonis 9d). Üle ääre alla vaatamiste arv sõltus samuti genotüübist ($F_{1,35}=5,7$; $p=0,023$), aga mitte estsitalopraami manustamisest ($F_{1,35}=3,8$; $p=0,059$) ega nende kahe teguri koosmõjust ($F_{1,35}=1,1$; $p=0,3$) (joonis 9e). Avatud õlgadelt üle ääre alla vaatamiste arv sõltus samuti genotüübist ($F_{1,35}=6,1$; $p=0,018$), aga mitte estsitalopraami manustamisest ($F_{1,35}=0,056$; $p=0,81$) ega nende kahe teguri koosmõjust ($F_{1,35}=0,14$; $p=0,71$) (joonis 9f).

Nende tulemuste põhjal võib öelda, et *Lsamp*^{-/-} hiired on võrreldes metsiktüüpi pesakonnakaaslastega 18-päevase kroonilise süstimise järel aktiivsemad ja vähem ärevad ning estsitalopraami krooniline manustamine võimendas seda efekti.

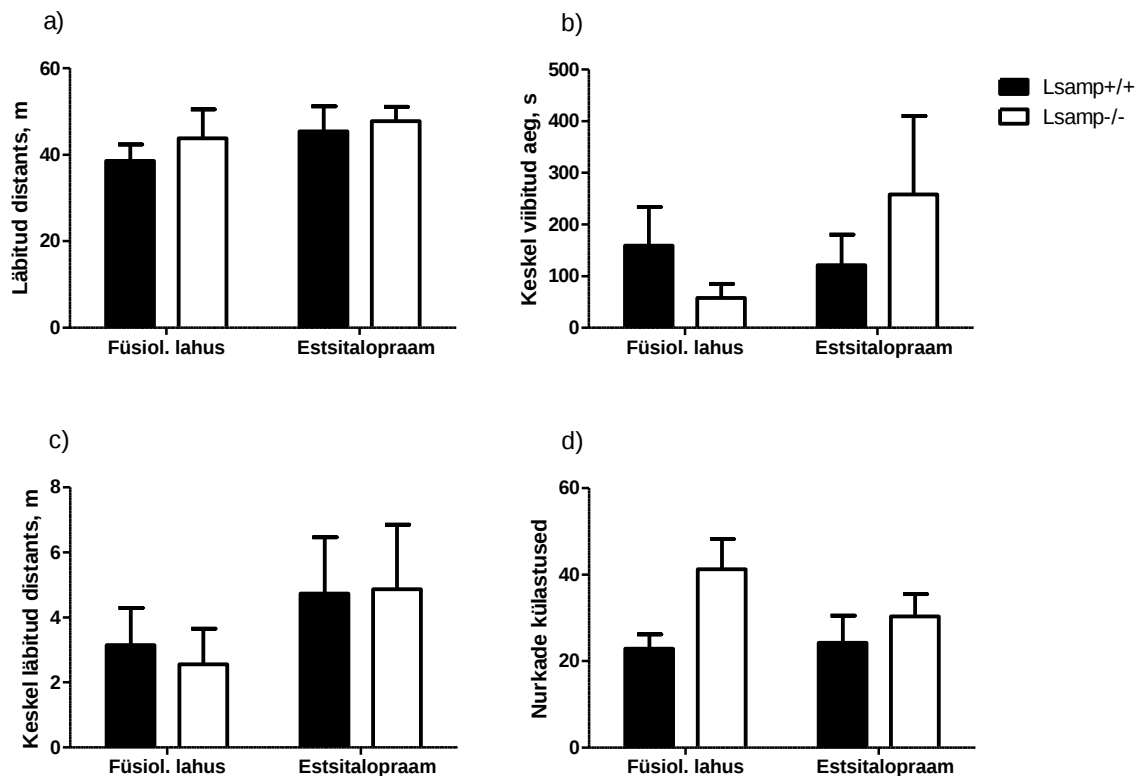


Joonis 9. Metsiktüüpi ($Lsamp^{+/+}$) ja $Lsamp^{-/-}$ hiirte võrdlevad graafikud plusspuuri katses vastusena estsitalopraamile. ### p<0,001 – $Lsamp^{-/-}$ füsioloogilist lahust saanud grupp vs $Lsamp^{-/-}$ estsitalopraami grupp; * p<0,001 – estsitalopraami saanud metsiktüüpi hiired vs estsitalopraami saanud $Lsamp^{-/-}$ hiired. $Lsamp^{+/+}$ estsitalopraami ja füsioloogilist lahust saanud hiiri oli mõlemas grupis 10 (n=10), $Lsamp^{-/-}$ estsitalopraami saanud hiiri oli 10 (n=10), füsioloogilist lahust saanud $Lsamp^{-/-}$ hiiri oli 9 (n=9). Katse tulemused on esitatud kujul $\pm$ SEM. Lühendid: s – sekund, SEM – standard error of the mean, keskmise standardviga.**

2.3.4 Estsitalopraami kroonilise manustamise mõju käitumisele liikumisaktiivsuse katses

Liikumisaktiivsuse katse tulemustest selgus, et poole tunni jooksul läbitud meetrite arv, mis väljendab hiirte liikumisaktiivsust, ei sõltunud ei genotüübist ($F_{1,39}=0,59$; $p=0,45$), estsitalopraami manustamisest ($F_{1,39}=1,19$; $p=0,28$) ega ka nende kahe teguri koostoimest ($F_{1,39}=0,08$; $p=0,78$) (joonis 10a). Kasti keskosas viibitud aeg, mis peegeldab loomade ärevuse taset, ei sõltunud samuti ei genotüübist ($F_{1,39}=0,037$; $p=0,85$), estsitalopraami manustamisest ($F_{1,39}=0,78$; $p=0,38$) ega ka nende tegurite koosmõjust ($F_{1,39}=1,68$; $p=0,2$). Absoluutarvudes estsitalopraami manustamine küll pikendas kasti keskel viibitud aega *Lsmp*^{-/-} hiirtel mitu korda, erinevalt metsiktüüpi hiirtest, kuid suure varieeruvuse tõttu ei ole see tõus oluline (joonis 10b). Teise ärevust peegeldava parameetri, kasti keskel liigutud meetrite arvu, osas ei ilmnenud samuti ei genotüübiefekti ($F_{1,39}=0,024$; $p=0,88$), estsitalopraami efekti ($F_{1,39}=1,68$; $p=0,2$) ega ka nende kahe teguri koosmõju efekti ($F_{1,39}=0,057$; $p=0,81$) (joonis 10c). Nurkade külastuste arvu osas, mis on teine liikumisaktiivsust peegeldav parameeter ning võib sisaldada ka stereotüüpia komponenti, ilmnes statistiliselt oluline genotüübiefekt ($F_{1,39}=5,24$; $p=0,028$), mis tulenes peamiselt sellest, et füsioloogilist lahust saanud grupis tegid *Lsmp* geeni puudulikkusega hiired rohkem nurkade külastusi. Seevastu estsitalopraami manustamine ($F_{1,39}=0,78$; $p=0,38$) ning estsitalopraami ja genotüübi koosmõju ($F_{1,39}=1,29$; $p=0,26$) nurkade külastuste arvu oluliselt ei mõjutanud (joonis 10d).

Katse tulemustest võib järeldada, et krooniline estsitalopraami süstimine ei mõjuta oluliselt metsiktüüpi ega *Lsmp*^{-/-} hiirte ärevuse parameetreid avarväljal ega liikumisaktiivsust. Füsioloogilist lahust saanud *Lsmp*^{-/-} hiired olid mõnevõrra suurema liikumisaktiivsusega kui metsiktüüpi pesakonnakaaslased, tehes rohkem nurkade külastusi.



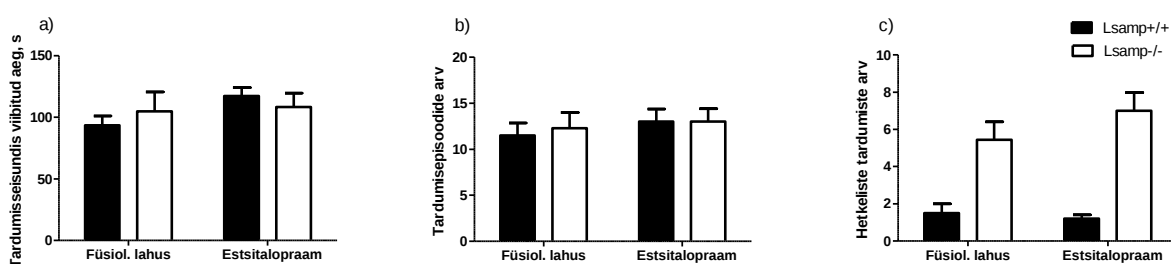
Joonis 10. Füsioloogilise lahuse ja estsitalopraami kroonilise manustamise mõju metsiktüüpi (*Lsamp*^{+/+}) ja *Lsamp*^{-/-} hiirte liikumisaktiivsusele. ### $p < 0,001$ – *Lsamp*^{-/-} füsioloogilist lahust saanud grupp vs *Lsamp*^{-/-} estsitalopraami grupp; *** $p < 0,001$ – estsitalopraami saanud metsiktüüpi hiired vs estsitalopraami saanud *Lsamp*^{-/-} hiired. *Lsamp*^{+/+} estsitalopraami ja füsioloogilist lahust saanud hiiri oli mõlemas grupis 10 ($n=10$), *Lsamp*^{-/-} estsitalopraami saanud hiiri oli 10 ($n=10$), füsioloogilist lahust saanud *Lsamp*^{-/-} hiiri oli 9 ($n=9$). Katse tulemused on esitatud kujul $\pm$ SEM. Lühendid: m – meeter, s – sekund, SEM – standard error of the mean, keskmise standardviga.

2.3.5 Estsitalopraami kroonilise manustamise mõju käitumisele sabast riputamise katses

Tardumisseisundis viibitud aeg, mida peetakse õpitud abitust peegeldavaks parameetriks, ei sõltunud genotüübist ($F_{1,34}=0,014$; $p=0,91$), estsitalopraami manustamisest ($F_{1,34}=1,65$; $p=0,21$) ega ka nende kahe teguri koosmõjust ($F_{1,34}=0,9$; $p=0,35$) (joonis 11a). Tardumiseepisoodide arv ei sõltunud samuti ei genotüübist ($F_{1,34}=0,46$; $p=0,5$), estsitalopraami manustamisest ($F_{1,34}=0,19$; $p=0,67$) ega nende kahe teguri koosmõjust ($F_{1,34}=0,038$; $p=0,95$) (joonis 11b). Hetkeliste tardumiste (mikrotardumiste) arv olenes väga olulisel määral genotüübist ($F_{1,34}=46,5$; $p=0,00000$), kuid mitte estsitalopraami manustamisest ($F_{1,34}=0,77$;

$p=0,39$) ega ka nende kahe teguri koosmõjust ($F_{1,34}=1,69$; $p=0,2$) (joonis 11c). *Lsamp*^{-/-} hiirtel esines mitu korda rohkem hetkelise tardumise episoodide kui metsiktüüpi hiirtel, olenemata manustatud ainest.

Nendest tulemustest võib järeldada, et estsitalopraami krooniline süstimine ei avaldanud mõju ei metsiktüüpi ega ka *Lsamp* geeni puudulikkusega hiirte käitumisele sabast riputamise katses klassikaliste parameetrite (tardumisseisundis viibitud aeg ja tardumiseepisoodide arv) osas. Erinevuse ei ilmnunud ka genotüüpide vahel. *Lsamp* geeni puudulikkusega hiirtel ilmnus uudne käitumismuster – hetkelised tardumised („mikrotardumised“), mida esines neil mitu korda rohkem kui metsiktüüpi hiirtel nii estsitalopraami grupis kui ka kontrollgrupis.



Joonis 11. Tardumisseisundite arv ja aeg metsiktüüpi (*Lsamp*^{+/+}) ja *Lsamp*^{-/-} hiirtel vastusena kroonilisele estsitalopraami ja füsioloogilise lahuse manustamisele sabast riputamise testi puhul. *Lsamp*^{+/+} estsitalopraami ja füsioloogilist lahust saanud hiiri oli mõlemas grupis 10 ($n=10$), *Lsamp*^{-/-} estsitalopraami saanud hiiri oli 10 ($n=10$), füsioloogilist lahust saanud *Lsamp*^{-/-} hiiri oli 9 ($n=9$). Katse tulemused on esitatud kujul $\pm$ SEM. Lühendid: s – sekund, SEM – standard error of the mean, keskmise standardviga.

2.3.6 Serotoniini ja tema metaboliidi 5-HIAA tase

Serotoniini ja tema metaboliidi 5-HIAA taset mõõdeti viies ajuosas ning analüüsides saadi järgnevad tulemused.

Raphe tuumad. 5-HT metabolismi tase ei sõltunud ei genotüübist ($F_{1,32}=0,44$; $p=0,51$) ega estsitalopraami manustamisest ($F_{1,32}=1,99$; $p=0,17$), küll aga oli statistiliselt oluline nende kahe teguri koosmõju ($F_{1,32}=10,78$; $p=0,0025$). *Post hoc* analüüs Tukey HSD testiga näitas, et füsioloogilist lahust saanud *Lsamp*^{-/-} hiirte grupis oli 5-HT metabolismi tase oluliselt ($p=0,034$) kõrgem kui füsioloogilist lahust saanud metsiktüüpi hiirte grupis. Estsitalopraami manustamine vähendas 5-HT metabolismi taset oluliselt ($p=0,011$) ainult *Lsamp*^{-/-} hiirtel (joonis 12a). 5-HT tase sõltus genotüübist ($F_{1,32}=10,4$; $p=0,0029$) ja estsitalopraami manustamisest ($F_{1,32}=5,1$;

$p=0,031$), kuid tegurite koosmõju jäi tendentsi tasemele ($F_{1,32}=3,35$; $p=0,077$). Estsitalopraami manustamine vähendas 5-HT taset oluliselt ($p=0,032$) ainult *Lsmp*^{-/-} hiirtel (joonis 12b). 5-HIAA tase sõltus väga oluliselt nii genotüübist ($F_{1,33}=7,56$; $p=0,0096$), estsitalopraami manustamisest ($F_{1,33}=8,12$; $p=0,0075$) kui ka nende tegurite koosmõjust ($F_{1,33}=13,4$; $p=0,00087$). *Post hoc* analüüs näitas, et füsioloogilist lahust saanud *Lsmp*^{-/-} hiirte grupis oli 5-HIAA tase oluliselt ($p=0,00048$) kõrgem kui füsioloogilist lahust saanud metsiktüüpi hiirte grupis. Estsitalopraami manustamine vähendas 5-HIAA taset statistiliselt oluliselt ($p=0,00053$) ainult *Lsmp*^{-/-} hiirtel (joonis 12c).

Ventraalne striatum. 5-HT metabolismi tase ei sõltunud genotüübist ($F_{1,32}=0,71$; $p=0,41$), kuid estsitalopraami manustamise mõju ($F_{1,32}=5,1$; $p=0,031$) ning genotüübi ja estsitalopraami manustamise koosmõju ($F_{1,32}=10,46$; $p=0,0028$) olid statistiliselt olulised. Tukey HSD *post hoc* test näitas, et füsioloogilist lahust saanud *Lsmp*^{-/-} hiirte grupis oli 5-HT metabolismi tase oluliselt ($p=0,028$) kõrgem kui füsioloogilist lahust saanud metsiktüüpi hiirte grupis. Estsitalopraami manustamine vähendas 5-HT metabolismi taset oluliselt ($p=0,0026$) ainult *Lsmp*^{-/-} hiirtel (joonis 12d). 5-HT tase sõltus tendentsi tasemel genotüübist ($F_{1,30}=3,65$; $p=0,066$), kuid mitte estsitalopraami manustamisest ($F_{1,30}=2,23$; $p=0,15$) ega nende kahe teguri koosmõjust ($F_{1,30}=0,38$; $p=0,54$) (joonis 12e). 5-HIAA tase ei sõltunud ei genotüübist ($F_{1,31}=2,27$; $p=0,14$) ega estsitalopraami manustamisest ($F_{1,31}=2,74$; $p=0,11$) ning genotüübi ja estsitalopraami koosmõju efekt jäi tendentsi tasemele ($F_{1,31}=3,58$; $p=0,068$) (joonis 12f).

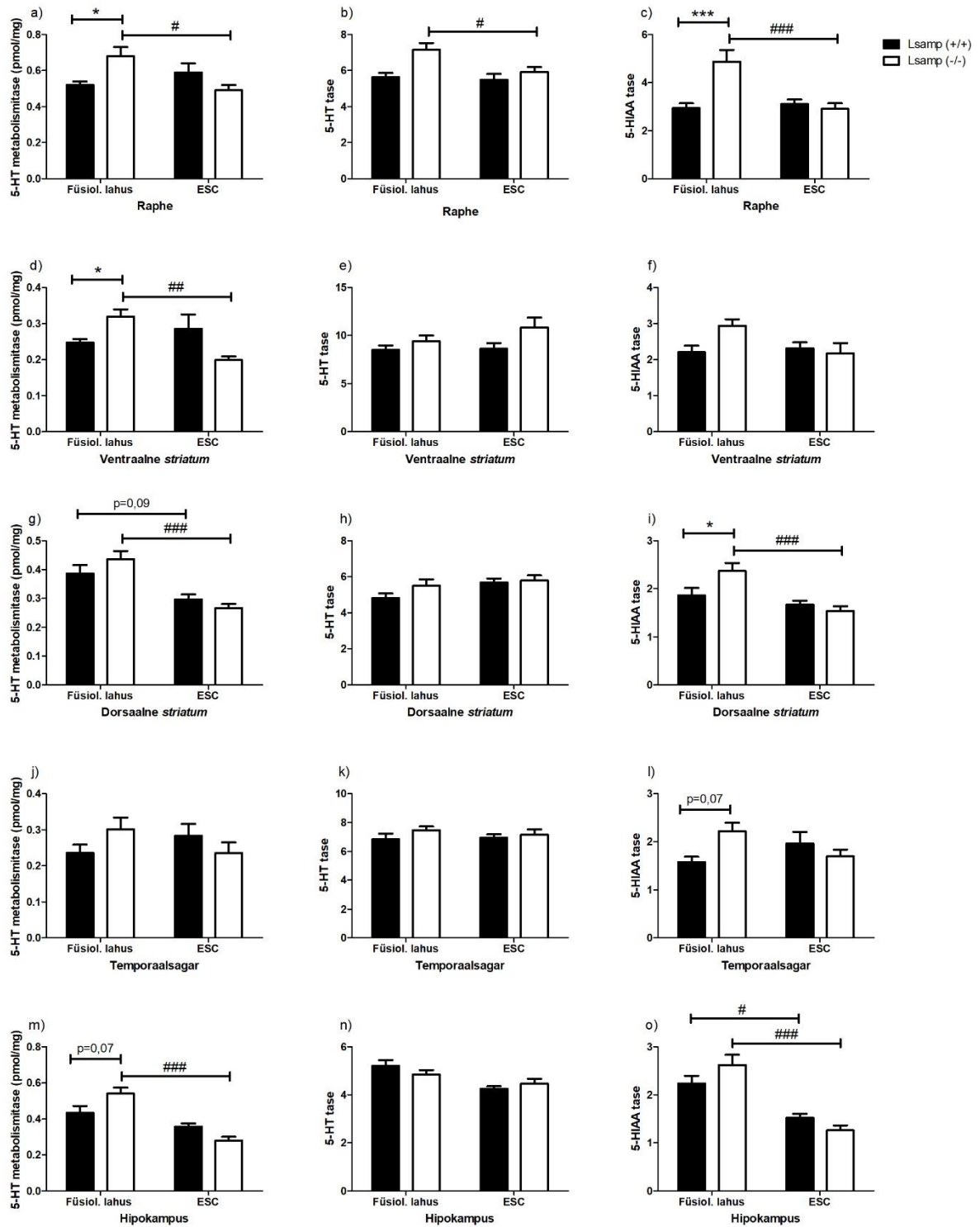
Dorsaalne striatum. 5-HT metabolismi tase ei sõltunud genotüübist ($F_{1,34}=0,046$; $p=0,83$), kuid estsitalopraami manustamise mõju oli väga oluline ($F_{1,34}=29,2$; $p=0,00001$). Genotüübi ja estsitalopraami manustamise koosmõju efekt jäi tendentsi tasemele ($F_{1,34}=3,92$; $p=0,056$). Estsitalopraami manustamine vähendas 5-HT metabolismi taset *Lsmp*^{-/-} hiirtel väga oluliselt ($p=0,0002$), kuid metsiktüüpi hiirtel jäi langus nõrga tendentsi tasemele ($p=0,09$) (joonis 12g). 5-HT tase ei sõltunud genotüübist ($F_{1,34}=2,02$; $p=0,16$) ega genotüübi ja estsitalopraami manustamise koosmõjust ($F_{1,34}=1,0$; $p=0,33$), estsitalopraami manustamise efekt jäi tendentsi tasemele ($F_{1,34}=4,02$; $p=0,053$) (joonis 12h). 5-HIAA tase ei sõltunud genotüübist ($F_{1,34}=1,55$; $p=0,22$), kuid estsitalopraami manustamise efekt ($F_{1,34}=13,9$; $p=0,0007$) ja kahe teguri koosmõju ($F_{1,34}=7,2$; $p=0,011$) olid väga olulised. Tukey HSD *post hoc* test näitas, et füsioloogilist lahust saanud *Lsmp*^{-/-} hiirte grupis oli 5-HIAA tase oluliselt ($p=0,042$) kõrgem kui füsioloogilist lahust saanud metsiktüüpi hiirte grupis. Estsitalopraami manustamine vähendas 5-HIAA taset statistiliselt oluliselt ($p=0,00052$) ainult *Lsmp*^{-/-} hiirtel (joonis 12i).

Temporaalsagar. 5-HT metabolismi tase ei sõltunud ei genotüübist ($F_{1,34}=0,79$; $p=0,78$) ega estsitalopraami manustamisest ($F_{1,34}=0,89$; $p=0,77$) ning nende kahe teguri koosmõju efekt jäi

tendentsi tasemele ($F_{1,34}=3,57$; $p=0,067$) (joonis 12j). 5-HT tase ei sõltunud ei genotüübist ($F_{1,33}=1,61$; $p=0,21$), estsitalopraami manustamisest ($F_{1,33}=0,1$; $p=0,75$) ega ka genotüübi ja estsitalopraami manustamise koosmõjust ($F_{1,33}=0,41$; $p=0,53$) (joonis 12k). 5-HIAA tase ei sõltunud genotüübist ($F_{1,34}=1,06$; $p=0,31$) ega estsitalopraami manustamisest ($F_{1,34}=0,12$; $p=0,73$), kuid kahe teguri koosmõju oli statistiliselt oluline ($F_{1,34}=6,44$; $p=0,016$). Tukey HSD *post hoc* test näitas, et füsioloogilist lahust saanud *Lsmp*^{-/-} hiirte grupis oli 5-HIAA tase mõnevõrra, kuid mitte statistiliselt oluliselt ($p=0,074$) kõrgem kui füsioloogilist lahust saanud metsiktüüpi hiirte grupis (joonis 12l).

Hipokampus. 5-HT metabolismi tase ei sõltunud genotüübist ($F_{1,33}=0,21$; $p=0,65$), kuid estsitalopraami manustamise mõju ($F_{1,33}=32,7$; $p=0,00000$) ning nende kahe teguri koosmõju efekt ($F_{1,33}=10,5$; $p=0,0027$) olid väga olulised. Tukey HSD *post hoc* test näitas, et füsioloogilist lahust saanud *Lsmp*^{-/-} hiirte grupis oli 5-HT metabolismi tase mõnevõrra, kuid mitte statistiliselt oluliselt ($p=0,066$) kõrgem kui füsioloogilist lahust saanud metsiktüüpi hiirte grupis. Estsitalopraami manustamine vähendas 5-HT metabolismi taset oluliselt ($p=0,00016$) ainult *Lsmp*^{-/-} hiirtel (joonis 12m). 5-HT tase sõltus ainult estsitalopraami manustamisest ($F_{1,33}=11,5$; $p=0,0018$), kuid mitte genotüübist ($F_{1,33}=0,19$; $p=0,67$) ega genotüübi ja estsitalopraami manustamise koosmõjust ($F_{1,33}=1,92$; $p=0,18$) (joonis 12n). 5-HIAA tase ei sõltunud genotüübist ($F_{1,34}=0,12$; $p=0,73$), kuid estsitalopraami manustamise efekt ($F_{1,34}=49,4$; $p=0,00000$) ja kahe teguri koostoime efekt ($F_{1,34}=5,26$; $p=0,028$) olid statistiliselt olulised. *Post hoc* analüüs näitas, et estsitalopraami manustamine vähendas 5-HIAA taset mõlemas grupis, kuid *Lsmp*^{-/-} hiirtel oli langus suurem ($p=0,00016$) kui metsiktüüpi hiirtel ($p=0,01$) (joonis 12o).

Nende tulemuste põhjal võib öelda, et *Lsmp*^{-/-} hiirtel oli serotoniini metabolismi tase raphe tuumades, ventraalses ja dorsaalses *striatum*'is oluliselt ning hipokampuses tendentsi tasemel kõrgem kui metsiktüüpi hiirtel. Nendes ajupiirkondades vähendas estsitalopraami manustamine oluliselt 5-HT metabolismi taset *Lsmp* geenipuudulikkusega hiirtel. Estsitalopraami manustamine vähendas *Lsmp*^{-/-} hiirtel serotoniini taset oluliselt vaid raphe tuumades. Raphe tuumades ja dorsaalses *striatum*'is oli *Lsmp* puudulikkusega hiirtel 5-HIAA tase oluliselt ning temporaalsagaras tendentsi tasemel kõrgem kui see oli metsiktüüpi hiirtel. Raphe tuumades, dorsaalses *striatum*'is ja hipokampuses langetas estsitalopraam 5-HIAA taset oluliselt vaid *Lsmp*^{-/-} hiirtel.



Joonis 12. Serotoniini metabolismi (5-HIAA/5-HT), 5-HT ja 5-HIAA tasemed viies ajuosas metsiktüüpi (*Lsamp*^{+/+}) ja *Lsamp*^{-/-} hiirtel mõõdetuna peale kroonilist estsitalopraami süstimist. ### p<0,001 – *Lsamp*^{-/-} füsioloogilist lahust saanud grupp vs *Lsamp*^{-/-} estsitalopraami grupp; * p<0,001 – estsitalopraami saanud metsiktüüpi hiired vs estsitalopraami saanud *Lsamp*^{-/-} hiired. *Lsamp*^{+/+} estsitalopraami saanud hiirte arv (n) viies ajuosas vastavalt metabolismitaseme, 5-HT ja 5-HIAA taseme mõõtmisele: raphes (8, 8, 10), ventraalses *striatum*'is (9, 9, 9), dorsaalses *striatum*'is (10, 10, 10), temporaalsagaras (10, 10, 10) ja hipokampuses (10, 10, 10). *Lsamp*^{+/+} füsioloogilist lahust saanud hiirte arv (n) viies ajuosas vastavalt metabolismitaseme, 5-HT ja 5-**

HIAA taseme mõõtmisele: raphes (10, 10, 10), ventraalses *striatum*'is (9, 9, 10), dorsaalses *striatum*'is (10, 10, 10), temporaalsagaras (10, 10, 10) ja hipokampuses (9, 9, 10). *Lsmp*^{-/-} estsitalopraami saanud hiirte arv (n) viies ajuosas vastavalt metabolismitaseme, 5-HT ja 5-HIAA taseme mõõtmisele: raphes (9, 9, 9), ventraalses *striatum*'is (9, 9, 9), dorsaalses *striatum*'is (10, 10, 10), temporaalsagaras (10, 9, 10) ja hipokampuses (10, 10, 10). *Lsmp*^{-/-} füsioloogilist lahust saanud hiirte arv (n) viies ajuosas vastavalt metabolismitaseme, 5-HT ja 5-HIAA taseme mõõtmisele: raphes (9, 9, 9), ventraalses *striatum*'is (8, 8, 8), dorsaalses *striatum*'is (9, 9, 9), temporaalsagaras (9, 9, 9) ja hipokampuses (9, 9, 9). Katse tulemused on esitatud kujul $\pm$ SEM. Lühendid: 5-HT – serotoniin, 5-HIAA – 5-hüdroksü-indoolatseethape, serotoniini metaboliit; ESC – estsitalopraam, SEM – *standard error of the mean*, keskmise standardviga.

2.4 Arutelu

Käesolevas töös uuriti estsitalopraami kroonilise manustamise mõju *Lsamp* geeni puudulikkusega hiiremudelil. Vähenenud ärevus on üks selgemini väljendunud käitumuslik fenotüüp *Lsamp* puudulikkusega hiirtel – see fenotüüp esineb mõlemal alternatiivsel *Lsamp* puudulikkusega hiireliinil (Catania jt, 2008; Innos jt, 2011). Kõrget baasärevuse taset närilistel on seevastu seostatud kõrgema *Lsamp* transkripti tasemega amügdalas, ajuveejuha ümbritsevas hallaines (Nelovkov jt, 2006) ning raphe tuumades, hipokampuses ja frontaalkoores (Alttoa jt, 2010). Kõrgenenud *Lsamp* transkripti taset amügdala piirkonnas on näidatud vastusena akuutsele hirmureaktsioonile (Köks jt, 2004) ja LSAMP valgu akuutset tõusu on näidatud vastusena hirmu tingimisele (Lamprecht jt, 2009). Seega viitavad varasemad tulemused, et madalam *Lsamp* geeni aktiivsus (sh *Lsamp* puudulikkusega hiire fenotüüp) seostub madalama ärevusega, kõrgem *Lsamp* mRNA ja valgu tase seevastu seostub kõrgema ärevusega. On näidatud, et dorsaalsest raphe tuumast lähtuv serotonergiline närviringe indutseerib ärevusreaktsiooni ning stimuleerib kortikotropiini vabastavaid neuroneid *stria terminalis*'e süngituumas (Marcinkiewicz jt, 2017). Selle ärevust indutseeriva serotonergilise närviringe olemasolu võiks selgitada kliinilist fenomeni, kus ärevushäirega patsientidel võib seisundi ravimisel SSRI tüüpi ravimitega ärevus esialgu kasvada (Harada jt, 2008; Marcinkiewicz jt, 2017), kuigi pikaajaline ravi SSRI-dega mõjub enamasti ärevust leevendavalt (Zohar ja Westenberg, 2000). Varasemates uuringutes on näidatud, et *Lsamp* geeni puudulikkusega hiirte ajus on võrreldes pesakonnakaaslastega kõrgem serotoniini metabolism ning esineb muutusi serotoniini baastasemes (Innos jt, 2013a). Eelnevat kokku võttes võib oletada, et LSAMP kui neuraalne raku adhesioonimolekul võib mõjutada ärevusseisundit läbi serotonergilise närviringe kujunemise moduleerimise. Seni puudus info *Lsamp*'i ekspressiooniaktiivsuse kohta kesk- ja tagaajus, sh raphe tuumades, mistõttu oli käesoleva töö üheks eesmärgiks *Lsamp*'i isovormide kirjeldamine selles ajupiirkonnas.

In situ hübridisatsiooni katse tulemusena selgus, et universaalse *Lsamp* transkripti spetsiifiline *in situ* sond andis tugeva signaali nii dorsaalse kui mediaanse raphe tuuma piirkonnas. Värvingutel näib, et *Lsamp* 1b isovorm annab mõnevõrra intensiivsemat värvingut kui 1a. Tuleb aga märkida, et 1a ja 1b värvingute intensiivsus ei ole erinevate meetodite kasutamise tõttu täielikult võrreldav ning varasem kogemus näitab, et 1b promootori aktiivsus on proportsionaalselt pigem madal. Tõenäoliselt ekspresseeritakse LSAMP valgu raphes mõlemalt *Lsamp* promootorilt, mis summaarselt annab intensiivse signaali, mis dorsaalses raphe tuumas on tugevam ning mediaanses tuumade grupis mõõdukam. Kuna käesolevas katses ei ole hiirte

vanused võrreldavad, siis nende andmete avaldamiseks artikli kujul plaanitakse värvinguid korrata, valides katsesse võrreldavate vanustega hiired.

Juba varem on teada, et *Lsamp* geen ekspresseerub ajuosades, mis saavad sisendit raphe tuumadest või annavad ise sisendit raphe tuumadesse. On näidatud, et nii dorsaalne kui mediaanne raphe tuum annavad sisendit dorsaalsesse ja ventraalsesse *striatum*'isse, kusjuures projektsioonid on tugevamad ventraalsesse *striatum*'isse ja dorsaalsest raphe tuumast lähtuvad sinna intensiivsemad juhteteed kui mediaansest raphe tuumast (Hassanzadeh ja Behzadi, 2007). Dorsaalsest raphe tuumast lähtuv serotonergiline projektsioon stimuleerib kortikotropiini vabastavaid neuroneid *stria terminalis*'e süngituumas (Marcinkiewicz jt, 2017) ning BST-st lähtub projektsioon, mille sihtmärgiks on dorsaalse raphe serotonergilised neuronid, kuid mille funktsioon pole veel selge (Dorocic jt, 2014). Ventraalses *striatum*'is (nii *nucleus accumbens* kui BST-s) on näidatud tugevat *Lsamp* 1a ekspressiooni, nõrk *Lsamp* 1b ekspressioon on tuvastatud BST-s (Philips jt, 2015). DR-ist lähtuvad veel projektsioonid basolateraalsesse amügdala tuuma (Gao jt, 2002), kus esineb samuti tugev ekspressioon *Lsamp* 1a promootorilt (Philips jt, 2015). *Lsamp* 1b intensiivset ekspressiooni on kirjeldatud amügdala tsentraalses tuumas (Philips jt, 2015), kust lähtuvad just amügdalast raphe tuumadesse sisendit toovad projektsioonid (Dorocic jt, 2014). Amügdala tsentraalne ja basolateraalne tuum on eriti olulised just ärevuse reguleerimises (Janak jt, 2015). Hipokampusesse lähtuvad projektsioonid nii dorsaalsest (Kocsis jt, 2006) kui mediaansest raphe tuumast (Cui jt, 2013). Hipokampuse puhul on kirjeldatud *Lsamp* ekspressiooni 1b promootorilt *dentate gyrus*'e subgranulaartsoonis, mis on täiskasvanud närilistel peamine neurogeneesi toimumiskoht. Vastupidiselt 1b promootorile ekspresseerub 1a promootor hipokampuse püramidaal- ja granulaarrakkude kihtides. (Heinla jt, 2015)

Kirjandusest lähtuvalt valiti käesolevas töös *Lsamp*'i ja serotonergilise süsteemi seoste uurimiseks viis ajuosa, millest määrati serotoniini ja serotoniini metaboliidi (5-HIAA) tasemed. Uuritavateks ajuosadeks olid: raphe tuumad (dorsaalne ja mediaanne), dorsaalne *striatum* (*caudate putamen*), ventraalne *striatum* (sh *nucleus accumbens* ning BST), temporaalsagar koos amügdala tuumadega ning hipokampus. Kui teistes ajuosades ekspresseerub üks või mõlemad *Lsamp*'i isovormid täiskasvanud ajus, siis dorsaalses *striatum*'is (*caudate putamen*) on *Lsamp* 1a promootor aktiivne spetsiifiliselt E15.5 vanuses embrüos ning täiskasvanud hiire ajus on samas piirkonnas *Lsamp* ekspressioon minimaalne (Philips jt, 2015). Innos jt (2013a) leidsid, et just dorsaalses *striatum*'is oli *Lsamp* hiirte serotoniini metabolism kõige olulisemalt tõusnud, mistõttu analüüsiti käesolevas töös ka seda ajuosa.

Käesolevas magistritöös uuriti esmalt estsitalopraami mõju metsiktüüpi ja *Lsamp* geeni puudulikkusega hiirte kaalukõverale. Varem on näidatud, et *Lsamp* puudulikkusega hiirte kehakaal on metsiktüüpi pesakonnakaaslastega võrreldes 5-10% madalam (Innos jt, 2011). Kuigi kaalukõveraid kujutavalt jooniselt näib, et estsitalopraam kaotab ära genotüüpide kaaluerinevuse, ei ilmnenud ka füsioloogilist lahust saanud *Lsamp*^{-/-} ja metsiktüüpi hiirte vahel statistiliselt olulisi erinevusi üheski ajapunktis (joonis 8). Lisaks viitab kaalugraafik, et metsiktüüpi hiirtel tekib estsitalopraami süstmisel teatud kaaluseisak, see efekt ei saa olla tingitud süstimise stressist, kuna füsioloogilist lahust saanud grupi hiirte kasvukõver jätkab tõusu. Vaatamata jooniselt näha olevale esmapilgul suurtele erinevustele tuleb andmete tõlgendamisega olla ettevaatlik, sest füsioloogilise lahuse grupis oli kaaluerinevus juba süstimisega seotud perioodil pisut madalam. Siiski on kaalude tulemused huvipakkuvad ning katse kordamisel tuleks kaaluivet kindlasti jälgida.

On teada, et krooniline süstimine on hiirtele suur stress ning võib oluliselt muuta nende käitumist ning sellega seotud biokeemilisi markereid (Narvik jt, 2018). Siiski ilmnes käitumiskatsetes *Lsamp* puudulikkusega hiirtel varem kirjeldatud fenotüübile iseloomulik käitumisprofiil: nagu juba ülal kirjeldatud, on *Lsamp*^{-/-} hiired vähem ärevad kui nende metsiktüüpi pesakonnakaaslased. Plusspuuri katses viibisid *Lsamp* puudulikkusega hiired erinevalt metsiktüüpi pesakonnakaaslastest rohkem julgust nõudvas piirkonnas (avatud õlal). Liikumisaktiivsuse testis ei ilmnenud *Lsamp*^{-/-} hiirte puhul varem korduvalt kirjeldatud iseloomulikku kõrgemat liikumisaktiivsust, kuid füsioloogilist lahust saanud grupis külastasid *Lsamp* geeni puudulikkusega hiired rohkem nurkasid, mis samuti peegeldab liikumisaktiivsust ning võib sisaldada ka stereotüüpia komponenti.

Käitumiskatsetes avaldas kroonilise estsitalopraami süstimine mõju käitumisele vaid plusspuuri katses, kuid mitte sabast riputamise katses ja liikumisaktiivsuse testis. Krooniline estsitalopraami manustamine tõstis *Lsamp* puudulikkusega hiirtel oluliselt üldist liikumisaktiivsust plusspuuris, mis väljendus oluliselt kõrgemas suletud õlgadele sisenemiste arvus, samas kui nende metsiktüüpi pesakonnakaaslastele estsitalopraam sarnast mõju ei avaldanud. Sabast riputamise test on üks enam levinud käitumuslik test näriliste stressi mõõtmiseks ning antidepressantide mõju uurimiseks (Cryan jt, 2005). Käesolevas magistritöös sooritatud katses ei avaldanud estsitalopraami krooniline manustamine immobiilsusajale mõju. Kroonilist estsitalopraami mõju käitumisele on vaadatud vähe, siiski võib leida katseid, kus ka krooniline madal annus (0,1 mg/kg) immobiilsusajale mõju ei avaldanud (O'Brien jt, 2015). Rohkem on tehtud katseid akuutse süstimisega, mille puhul on näidatud, et estsitalopraami mõju sabast riputamise testis sõltub suuresti hiirte geneetilisest taustast (Jin jt, 2017). Küll aga

täheldati *Lsamp* geeni puudulikkusega hiirte juures huvitavat uudset käitumist. Nimelt esines neil mitu korda rohkem hetkelisi (1-2 s) tardumisi kui metsiktüüpi hiirtel nii estsitalopraami grupis kui ka kontrollgrupis. Kirjandusest ei olnud selle parameetri kohta informatsiooni leida, kuid kuna erinevus kahe genotüübi vahel oli vaadeldavas käitumise osas silmaga eristatav ja drastiliselt erinev, otsustati lisada hetkelise tardumise parameeter analüüsi. Kindlasti tasuks selle nähtuse tagapõhja edasistes katsetes põhjalikumalt uurida.

Serotoniini ja tema metaboliidi (5-HIAA) mõõtmise tulemused näitasid, et *Lsamp* puudulikkusega hiirtel esines kõrgem serotoniini metabolismi tase raphe tuumades ja ventraalses *striatum*'is ning teistes ajuosades esineb samasuunaline tendents. Varasemalt on Innos jt (2013a) vastusena akuutsele süstimisele näidanud *Lsamp* puudulikkusega hiirte dorsaalses *striatum*'is ning keskajus oluliselt kõrgemat serotoniini metabolismi ning samasuunalist tendentsi ka ventraalses *striatum*'is, frontaalkoores ja temporaalkoores. Seega võib öelda, et tõusnud serotoniini metabolism on farmakoloogiliselt mitte mõjustatud (füsioloogilist lahust saanud grupis) *Lsamp* puudulikkusega hiirtele iseloomulik ja seda nii akuutse kui kroonilise süstimise järgselt. Serotoniini metaboliidi (5-HIAA) kõrgeenenud tase esines käesolevas katses *Lsamp* puudulikkusega hiirte raphe tuumade piirkonnas ning dorsaalses *striatum*'is, teistes ajuosades esines samasuunaline tendents. Inimestel on näidatud, et suurenenud serotoniini metaboliidi tase on iseloomulik kliinilise depressiooniga patsientidele. Inimestel esineb polümorfismi tõttu serotoniini transporteri (5-HTT) geenist ülesvoolu serotoniini transporteri kaks genotüüpi – pikk ja lühike (Lesch jt, 1996). Kliinilist depressiooni on seostatud lühikese 5-HTT genotüübiga. Patsientide ravimisel 12 nädala jooksul SSRI-ga (tsitalopraam, sertraliin, fluoksetiin) langes patsientide serotoniini metabolismi tase kontrollgrupiga (terved katsealused) samale tasemele (Barton jt, 2008). Ka käesolevas katses alandas SSRI estsitalopraami krooniline süstimine *Lsamp* puudulikkusega hiirtel serotoniini metabolismi metsiktüüpi pesakonnakaaslastega samale tasemele. See leid kinnitab varasemaid järeldusi, et *Lsamp* puudulikkusega hiiri saab kasutada psühhiaatriliste häirete uurimisel hiiremudelina (Innos jt, 2013b). Mehhanism, miks estsitalopraam *Lsamp*^{-/-} hiirtel serotoniini metabolismi kontrollhiirtega samale tasemele viib, vajab edasisi uuringuid. Kõrgeenenud serotoniini metabolismi ajus on sünapsi tasemel seostatud suurenenud neuraalse aktiivsuse, vesiikulitest vabastatava serotoniini tõusu ja serotoniini tagasihaarde häiretega (Barton jt, 2008). Lisaks kliinilisele depressioonile on kõrgeenenud serotoniini metabolismi kirjeldatud ka paanikahäirete puhul (Esler jt, 2007), mida seostatakse raphe tuumadest lähtuvate serotonergiliste neuronite suurenenud projektsiooniaktiivsusega amügdalasse ja frontaalkorteksisse (Graeff jt, 1997). Kuna 5-HT metaboliiti tekib *Lsamp* puudulikkusega

hiirtel rohkem ja suurenenud on serotoniini metabolism, siis võib olla *Lsmp* puudulikkusega hiire ajus serotonergiline ülekannepigem intensiivsem, kuid seda peaks kindlasti kinnitama edasistes uuringutes.

Kokkuvõttes kinnitati käesolevas töös tõusnud serotoniini metabolismi *Lsmp* puudulikkusega hiirtel ning lisaks kirjeldati esmakordselt *Lsmp* värvingut raphe tuumades. Kuna varasemalt on teada, et *Lsmp* ekspresseerub ka ajuosades/tuumades, millel on olulised funktsionaalsed ühendused raphega, kinnitavad käesoleva töö tulemused hüpoteesi, et *Lsmp* valk osaleb serotonergiliste närviringete moduleerimises. Käesoleva töö tulemused ei võimalda teha kindlaid järeldusi selle kohta, kuidas *Lsmp* täpselt närviülekannet reguleerib, ent kuna tegemist on neuraalse rakuadhesioonimolekuliga, siis on tõenäoline, et *Lsmp* võib moduleerida sünapside stabiilsust, pre- ja postsünaptiliste membraanide seoseid või sünapstogeneesi (Heinla jt, 2015; Singh jt, 2018).

Käesolevas magistritöös saadud tulemustest lähtudes võiks kindlasti edaspidi täpsemalt uurida, kas *Lsmp* kustutamine mõjutab serotonergilisi projektsioone ja sünapside tihedust ajus. Samuti oleks oluline uurida, milline molekulaarne kõrvalekalle põhjustab kõrgeenenud serotoniini metabolismi *Lsmp* puudulikkusega hiirtel ja millise mehhanismiga estsitalopraam *Lsmp*^{-/-} hiirtel serotoniini metabolismi kontrollhiirtega samale tasemele viib. Lisaks tuleks uurida, millised ensüümid ja teised faktorid määravad serotoniini metabolismi kiiruse ning kas need faktorid on muutunud *Lsmp* puudulikkusega hiirel. Näiteks võiks esmalt keskenduda monoamiini oksüdaasi taseme ja aktiivsuse uurimisele *Lsmp* puudulikkusega hiirtel. Samuti peaks kordama kroonilise estsitalopraami süstimise katset, et teha kindlaks, kas metabolismi mõjutavad faktorid muutuvad estsitalopraami mõjul, ja kinnitada, kas estsitalopraami süstimine kaotab ära kaaluerinevuse *Lsmp*^{+/+} ja *Lsmp*^{-/-} hiirte vahel. Käesolevas magistritöös kasutatud meetodid ei võimalda eristada ekstra- ja intratsellulaarset serotoniini taset, mistõttu oleks tulevikus vaja teostada mikrodialüüsi katse, mis näitaks serotoniini taset just sünaptilises pilus, et teha kindlaks, kas ja kuidas täpselt mõjutab estsitalopraami krooniline manustamine serotoniini taset koduhiire ajus.

KOKKUVÕTE

Serotonergiline süsteem on üks mitmetest projektsioonisüsteemidest imetaja ajus ning see on raphe tuumade vahendusel tugevalt seotud limbilise süsteemiga. Koos vastutavad need süsteemid mitmete bioloogiliste protsesside eest. Info edasikandmise eest serotonergilises süsteemis vastutab monoamiidne virgatsaine serotoniin, mille toime tagavad serotoniini retseptorid ning serotoniini transporter. Lisaks on nende süsteemide toimimises oluline roll raku adhesioonimolekulidel, mille hulka kuuluvad ka IgLON perekonna adhesioonimolekulid. LSAMP on üks IgLON perekonda kuuluvatest valkudest, mis ühendab serotonergilist ja limbilist süsteemi ning mille puudumine põhjustab sotsiaalse käitumise erisusi ja muutusi serotoniini baas- ja metabolismitasemes. Serotonergilise ja limbilise süsteemi häired viivad mitmete haiguslike seisunditeni, sh depressioonini. Serotoniini transporter on üks levinud uue põlvkonna antidepressantide, SSRI-de, sihtmärkidest.

Käesoleva magistritöö üheks eesmärgiks oli kirjeldada *Lsamp* geeni ekspressioonimustrit koduhiire kesk- ja tagaajus, milleks teostati *in situ* hübriidisatsiooni katse. Lisaks oli eesmärgiks uurida *Lsamp* geeni puudulikkuse mõju hiirte käitumisele ja serotoniinisüsteemile kroonilise SSRI estsitalopraami manustamise järel. Selleks viidi läbi käitumiskatsete seeria nii *Lsamp*^{-/-} kui metsiktüüpi hiirtega, mille lõppedes loomad ohverdati ning neilt dissekteeriti ajud, mille viies osas määrati serotoniini ja selle metaboliidi (5-HIAA) tasemed.

Magistritöö kokkuvõtteks saadi järgmised järeldused:

- Dorsaalses ja mediaanses raphe tuumas ekspresseerub *Lsamp* nii 1a kui 1b promootorilt.
- Kroonilisel estsitalopraami manustamisel ei ole statistiliselt olulist efekti *Lsamp* geeni puudulikele hiirtele ega nende metsiktüüpi pesakonnakaaslaste kaalukõverale.
- Käitumiskatsete seeria näitas, et estsitalopraamil on antidepressantne toime *Lsamp* geeni puudulikele hiirtele, kes on kroonilise estsitalopraami manustamise järel julgemad ja pigem aktiivsemad kui nende metsiktüüpi estsitalopraami saanud pesakonnakaaslased.
- *Lsamp* geeni puudulikel hiirtel esinesid muutused serotoniini metaboliidi (5-HIAA) baastasemetes. Saadi kinnitus varasemale leiule (Innos jt, 2013a), et *Lsamp*^{-/-} hiirte ajus esineb kõrgem 5-HT metabolism. Kroonilise estsitalopraami süstimine viis *Lsamp*^{-/-} hiirtel nii 5-HIAA taseme kui serotoniini metabolismi kontrollhiirtega samale tasemele.

SUMMARY

Lsmp adhesion molecule – relations with the serotonergic system

Eva-Maria Oja

Summary

The serotonergic system is one of the many projection systems in the brain, formed by various neuron groups. The cell bodies of these neurons are located mainly in the raphe nuclei in the brain stem and the axons of these neurons innervate practically the entire central nervous system, especially parts of the limbic system, for instance. Dorsal and median raphe nuclei are responsible for the projections to and receive innervation from the prefrontal cortex, amygdala, hippocampus and dorsal and ventral *striatum*. Together with the limbic system, serotonin system regulates several biologically relevant processes.

Information in the serotonergic system is mediated by monoamine neurotransmitter serotonin, which itself is controlled by serotonin transporter and receptors. In addition to that, cell adhesion molecules, such as the members of the IgLON family of proteins, play a crucial role in the functioning of these systems. LSAMP is one of the proteins in the IgLON family and the lack of it affects both the limbic and serotonergic systems by inducing alterations in social behaviour and changing the levels of serotonin and its metabolite and the rate of serotonin metabolism. Such changes lead to various pathological states, including depression. The serotonin transporter is one of the targets of new generation antidepressants, the SSRIs. Escitalopram is the most selective serotonin reuptake inhibitor, which is the reason for it being included in behavioural testing in this master's thesis.

One of the aims of this master's thesis was to describe the expression of LSAMP in mid- and hindbrain of *Mus musculus* by *in situ* hybridisation assay. A behavioural test battery was carried out to study the influence of *Lsmp* deficiency on the behaviour and serotonergic system of mice after chronic administration of SSRI escitalopram.

The results of this study include the following:

- *Lsmp* is expressed both from 1a and 1b promoter in dorsal and median raphe nuclei;
- Chronic administration of escitalopram has no statistically significant effect on the weight of *Lsmp* deficient mice and their wild type littermates;

- Behavioural testing revealed an antidepressant effect of chronic administration of escitalopram on *Lsamp* deficient mice, who were less anxious and more active as compared to their wild type escitalopram group littermates; and
- *Lsamp* gene deficiency contributes to the alteration of the base level of serotonin metabolite 5-HIAA. The results of the master's thesis confirm earlier findings on changes of serotonin metabolism in *Lsamp*^{-/-} mice by Innos et al (2013a). Chronic administration of escitalopram brings the level of 5-HIAA and the rate of serotonin metabolism to the same level as in wild type littermates.

The future of this study lies in exploring more thoroughly whether the deletion of *Lsamp* influences serotonergic projections and synapse density in the brain. It would also be necessary to study what mechanism or which enzymes and other factors lie behind upregulated serotonin metabolism in *Lsamp* deficient mice. One of the possibilities would be focusing on the level of monoamine oxidase and its activity in *Lsamp*^{-/-} mice. Experiments with chronic administration of escitalopram should be repeated to determine whether the factors interfering with metabolism change due to escitalopram administration and if escitalopram administration loses the weight difference between *Lsamp*^{+/+} and *Lsamp*^{-/-} mice. The methods used in the master's thesis do not enable distinguishing between extra- and intracellular serotonin levels. Therefore, an experiment with microdialysis would be advisable since it would show us serotonin levels in the synaptic cleft.

TÄNUSÕNAD

Täna oma juhendajaid Aleksandr Breginit, Jürgen Innost, Mari-Anne Philipsit ja Tambet Tõnissood igakülgse abi ja väga huvitava lõputöö teema eest. Lisaks sooviksin tänada Kersti Lillevälja, kes aitas mul läbi viia *in situ* hübriidisatsiooni katset.

Artiklid

Alttoa, A., Kõiv, K., Hinsley, T. A., Brass, A., Harro, J. (2010). Differential gene expression in a rat model of depression based on persistent differences in exploratory activity. *Eur Neuropsychopharmacol* 20(5): 288–300.

Apicella, P., Ljungberg, T., Scarnat, E., Schultz, W. (1991). Responses to reward in monkey dorsal and ventral striatum. *Exp Brain Res* 85(3): 491–500.

Apicella, P., Scarnati, E., Ljungberg, T., Schultz, W. (1992). Neuronal activity in monkey striatum related to the expectation of predictable environmental events. *J Neurophysiol* 68(3): 945–960.

Arnsten, A. F. T., Raskind, M. A., Taylor, F. B., Connor, D. F. (2015). The effects of stress exposure on prefrontal cortex: Translating Basic research into successful treatments for post-traumatic stress disorder. *Neurobiol Stress* 1: 89–99.

Atkins, A. E., Chung, J., Deechongkit, S., Little, E. B., Edelman, G. M., Wright, P. E., Cunningham, B. A., Dyson, H. J. (2001). Solution structure of the third immunoglobulin domain of the neural cell adhesion molecule N-CAM: can solution studies define the mechanism of homophilic binding? *J Mol Biol* 311(1): 161–172.

Baldwin, D. S., Asakura, S., Koyama, T., Hayano, T., Hagino, A., Reines, E., Larsen, K. (2016). Efficacy of escitalopram in the treatment of social anxiety disorder: A meta-analysis versus placebo. *Eur Neuropsychopharmacol* 26(6): 1062–1069.

Ballard, I. C., Murty, V. P., McKell Carter, R., MacInnes, J. J., Huettel, S. A., Adcock, R. A. (2012). Dorsolateral Prefrontal Cortex Drives Mesolimbic Dopaminergic Regions to Initiate Motivated Behavior. *J Neurosci* 31(28): 10340–10346.

Banzi, R., Cusi, C., Randazzo, C., Sterzi, R., Tedesco, D., Moja, L. (2015). Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) and serotonin-norepinephrine reuptake inhibitors (SNRIs) for the prevention of tension-type headache in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 5: CD011681.

Barbas, H., De Olmos, J. (1990). Projections from the amygdala to basoventral and mediodorsal prefrontal regions in the rhesus monkey. *J Comp Neurol* 300(4): 549–571.

- Barbin, G., Aigrot, M. S., Charles, P., Foucher, A., Grumet, M., Schachner, M., Zalc, B., Lubetzki, C. (2004). Axonal cell-adhesion molecule L1 in CNS myelination. *Neuron Glia Biol* 1(1): 65–72.
- Barclay, A. N. (2003). Membrane proteins with immunoglobulin-like domains – a master superfamily of interaction molecules. *Semin Immunol* 15: 215–223.
- Barton, D. A., Esler, M. D., Dawood, T. ... Lambert, G. W. (2008). Elevated brain serotonin turnover in patients with depression: effect of genotype and therapy. *Arch Gen Psychiatry* 65(1): 38–46.
- Bech, P., Lönn, S. L., Overø, K. F. (2010). Relapse prevention and residual symptoms: a closer analysis of placebo-controlled continuation studies with escitalopram in major depressive disorder, generalized anxiety disorder, social anxiety disorder, and obsessive-compulsive disorder. *J Clin Psychiatry* 71(2): 121–129.
- 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): 601–613.
- Benedetti, F., Bernasconi, A., Bosia, M. ... Smeraldi, E. (2009). Functional and structural brain correlates of theory of mind and empathy deficits in schizophrenia. *Schizophr Res* 114(1–3): 154–160.
- Blier, P. (2001). Possible neurobiological mechanisms underlying faster onset of antidepressant action. *J Clin Psychiatry* 62(S4): 7–11.
- Bonaventure, P., Kelly, L., Aluisio, L., Shelton, J. Lord, B., Galici, R., Miller, K., Atack, J., Lovenberg, T. W., Dugovic, C. (2007). Selective blockade of 5-hydroxytryptamine (5-HT)₇ receptors enhances 5-HT transmission, antidepressant-like behavior, and rapid eye movement sleep suppression induced by citalopram in rodents. *J Pharmacol Exp Ther* 321(2): 690–698.
- Brabrook, E. W. (1881). Memoir of Paul Broca. *J R Anthropol Inst* 10: 242–261.
- Brown, P., Molliver, M. E. (2000). Dual serotonin (5-HT) projections to the nucleus accumbens core and shell: relation of the 5-HT transporter to amphetamine-induced neurotoxicity. *J Neurosci* 20(5): 1952–1963.

- Brummelte, S., McGlanaghy, E., Bonnin, A., Oberlander, T. F. (2017). Developmental changes in serotonin signaling: Implications for early brain function, behavior and adaptation. *Neuroscience* 342: 212–231.
- Burke, W. J., Kratochvil, C. J. (2002). Stereoisomers in Psychiatry: The Case of Escitalopram. *Prim Care Companion J Clin Psychiatry* 4(1): 20–24.
- Catania, E. H., Pimenta, A., Levitt, P. (2008). Genetic deletion of *Lsmp* causes exaggerated behavioral activation in novel environments. *Behav Brain Res* 188: 380–390.
- Chen, J., Lui, W-O., Vos, M. D., ... Teh, B. T. (2003). The t(1;3) breakpoint-spanning genes *LSAMP* and *NORE1* are involved in clear cell renal carcinomas. *Cancer Cell* 4(5): 405–413.
- Chen, H., Lei, H., Xu, Q. (2018). Neuronal activity pattern defects in the striatum in awake mouse model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res* 341: 135–145.
- Childress, A. R., Mozley, P. D., McElgin, W., Fitzgerald, J., Reivich, M., O'Brien, C. P. (1999). Limbic Activation During Cue-Induced Cocaine Craving. *Am J Psychiatry* 156(1): 11–18.
- Cryan, J. F., Mombereau, C., Vassout, A. (2005). The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neurosci Biobehav Rev* 29(4–5): 571–625.
- Cui, Z., Gerfen, C. R., Young, W. S. 3rd. (2013). Hypothalamic and Other Connections with the Dorsal CA2 Area of the Mouse Hippocampus. *J Comp Neurol* 521(8): 1844–1866.
- Daniloff, J. K., Levi, G., Grumet, M., Rieger, F., Edelman, G. M. (1986). Altered Expression of Neuronal Cell Adhesion Molecules Induced by Nerve Injury and Repair. *J Cell Biol* 103(3): 929–945.
- David, H. N. (2009). Towards a Reconceptualization of Striatal Interactions Between Glutamatergic and Dopaminergic Neurotransmission and Their Contribution to the Production of Movements. *Curr Neuropharmacol* 7: 132–141.
- De Bruin, N. M., Kruse, C. G. (2015). 5-HT₆ Receptor Antagonists: Potential Efficacy for the Treatment of Cognitive Impairment in Schizophrenia. *Curr Pharm Des* 21(26): 3739–3759.
- De Jong, I. E. M., Mørk, A. (2017). Antagonism of the 5-HT₃ receptor – Preclinical rationale for the treatment of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* 125: 50–63.
- Denenberg, V. H. (1969). Open-field behavior in the rat: what does it mean? *Ann NY Acad Sci* 159(3): 852–859.

- Dollfus, S., Razafimandimby, A., Maiza, O., Lebain, P., Brazo, P., Beauconsin, V., Lecardeur, L., Delamillieure, P., Mazoyer, B., Tzourio-Mazoyer, N. (2009). Functional deficit in the medial prefrontal cortex during a language comprehension task in patients with schizophrenia. *Schizophr Res* 99(1–3): 304–311.
- Dorocic, I. P., Fürth, D., Xuan, Y., Johansson, Y., Pozzi, L., Silberberg, G., Carlén, M., Meletis, K. (2014). A Whole-Brain Atlas of Inputs to Serotonergic Neurons of the Dorsal and Median Raphe Nuclei. *Neuron* 83: 663–678.
- 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. *Mol Cell Neurosci* 24: 725–740.
- Edelman, G. M., Jones, F. S. (1998). Gene regulation of cell adhesion: a key step in neural morphogenesis. *Brain Res Brain Res Rev* 26(2–3): 337–352.
- Eggers, A. E. (2013). A serotonin hypothesis of schizophrenia. *Med Hypotheses* 80(6): 791–794.
- Elks, C. E., Loos, R. J. F., Sharp, S. J., ... Ong, K. K. (2010). Genetic Markers of Adult Obesity Risk Are Associated with Greater Early Infancy Weight Gain and Growth. *PLoS Med* 7(5): e1000284.
- Erspamer, V., Asero, B. (1953). Isolation of Enteramine from Extracts of Posterior Salivary Glands of *Octopus Vulgaris* And of *Discoglossus Pictus* Skin. *J Biol Chem* 200: 311–318.
- Esler, M., Lambert, E., Alvarenga, M., ... Lambert, G. (2007). Increased brain serotonin turnover in panic disorder patients in the absence of a panic attack: reduction by a selective serotonin reuptake inhibitor. *Stress* 10(3): 295–304.
- Flaherty, A. W., Graybiel, A. M. (1994). Input-output organization of the sensorimotor striatum in the squirrel monkey. *J Neurosci* 14(2): 599–610.
- Funatsu, N., Miyata, S., Kumanogoh, H., Shigeta, M., Hamada, K., Endo, Y., Sokawa, Y., Maekawa, S. (1999). Characterization of a Novel Rat Brain Glycosylphosphatidylinositol-anchored Protein (Kilon), a Member of the IgLON Cell Adhesion Molecule Family. *J Biol Chem* 274(12): 8224–8230.
- Fuster, J. M. (2001). The Prefrontal Cortex – an Update: Time Is of the Essence. *Neuron* 30(2): 319–333.

- Galici, R., Boggs, J. D., Miller, K. L., Bonaventure, P., Atack, J. R. (2008). Effects of SB-269970, a 5-HT₇ receptor antagonist, in mouse models predictive of antipsychotic-like activity. *Behav Pharmacol* 19(2): 153–159.
- Gao, J., Zhang, J.-X., Xu, T.-L. (2002). Modulation of serotonergic projections from dorsal raphe nucleus to basolateral amygdala on sleep-waking cycle of rats. *Brain Res* 945(1): 60–70.
- Garg, A., Appel-Cresswell, S., Popuri, K., McKeown, M. J., Beg, M. F. (2015). Morphological alterations in the caudate, putamen, pallidum, and thalamus in Parkinson's disease. *Front Neurosci* 9: 101.
- Gaspar, P., Cases, O., Maroteaux, L. (2003). The Developmental Role of Serotonin: News from Mouse Molecular Genetics. *Nat Rev Neurosci* 4(12): 1002–1012.
- Gil, O. D., Zanzazzi, G., Struyk, A. F., Salzer, J. L. (1998). Neurotrimin mediates bifunctional effects on neurite outgrowth via homophilic and heterophilic interactions. *J Neurosci* 18(22): 9312–9325.
- Gil, O. D., Zhang, L., Chen, S., Ren, Y. Q., Pimenta, A., Zanzazzi, G., Hillman, D., Levitt, P., Salzer, J. L. (2002). Complementary Expression and Heterophilic Interactions between IgLON Family Members Neurotrimin and LAMP. *J Neurobiol* 51(3): 190–204.
- Giménez-Amaya, J. M., McFarland, N. R., De Las Heras, S., Haber, S. N. (1995). Organization of thalamic projections to the ventral striatum in the primate. *J Comp Neurol* 354(1): 127–149.
- Goldman-Rakic, P. S., Selemon, L. D., Schwartz, M. L. (1984). Dual pathways connecting the dorsolateral prefrontal cortex with the hippocampal formation and parahippocampal cortex in the rhesus monkey. *Neuroscience* 12(3): 719–743.
- Gordon, J. A., Hen, R. (2004). The serotonergic system and anxiety. *Neuromolecular Med* 5(1): 27–40.
- Graeff, F. G., Viana, M. B., Mora, P. O. (1997). Dual role of 5-HT in defense and anxiety. *Neurosci Biobehav Rev* 21(6): 791–799.
- Grijalva, I., Li, X., Marcillo, A., Salzer, J. L., Levi, A. D. (2006). Expression of neurotrimin in the normal and injured adult human spinal cord. *Spinal Cord* 44(5): 280–286.
- Gruber, A. J., McDonald, R. J. (2012). Context, emotion, and the strategic pursuit of goals: interactions among multiple brain systems controlling motivated behavior. *Front Behav Neurosci* 6: 50.

- Gu, Z., Imai, F., Kim, I. J., Fujita, H., Katayama, K., Mori, K., Yoshihara, Y., Yoshida, Y. (2015). Expression of the Immunoglobulin Superfamily Cell Adhesion Molecules in the Developing Spinal Cord and Dorsal Root Ganglion. *PLoS One* 10(3): e0121550.
- Gumbiner, B. M. (1996). Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 84(3): 345–357.
- Guscott, M., Bristow, L. J., Hadingham, K. ... McAllister, G. (2005). Genetic knockout and pharmacological blockade studies of the 5-HT₇ receptor suggest therapeutic potential in depression. *Neuropharmacology* 48(4): 492–502.
- Haber, S. N., Kunishio, K., Mizobuchi, M., Lynd-Balta, E. (1995). The orbital and medial prefrontal circuit through the primate basal ganglia. *J Neurosci* 15(7 Pt 1): 4851–4867.
- Haber, S. N., McFarland, N. R. (1999). The concept of the ventral striatum in nonhuman primates. *Ann N Y Acad Sci* 877: 33–48.
- Hannon, J., Hoyer, D. (2008). Molecular biology of 5-HT receptors. *Behav Brain Res* 195(1): 198–213.
- Hassanzadeh, G. R., Behzadi, G. (2007). Projections of dorsal and median raphe nuclei to dorsal and ventral striatum. *Acta Med Iranica* 45(5): 339–344.
- Harada, T., Sakamoto, K., Ishigooka, J. (2008). Incidence and predictors of activation syndrome induced by antidepressants. *Depress Anxiety* 25: 1014–1019.
- Hedges, D. W., Woon, F. L. M. (2007). An emerging role for escitalopram in the treatment of obsessive-compulsive disorder. *Neuropsychiatr Dis Treat* 3(4): 455–461.
- Heimer, L., Van Hoesen, G. W. (2006). The limbic lobe and its output channels: Implications for emotional functions and adaptive behavior. *Neurosci Biobehav Rev* 30: 126–147.
- Heinla, I., Leidmaa, E., Kongi, K. ... Philips, M.-A. (2015). Gene expression patterns and environmental enrichment-induced effects in the hippocampi of mice suggest importance of Lsamp in plasticity. *Front Neurosci* 9: 205.
- Hensler, J. G. (2006a). Serotonergic modulation of the limbic system. *Neurosci Biobehav Rev* 30(2): 203–214.
- Hitchcock, E., Cairns, V. (1973). Amygdalotomy. *Postgrad Med J* 49: 894–904.
- Hyttel, J., Bøgesø, K. P., Perregaard, J., Sanchez, C. (1992). The pharmacological effect of citalopram resides in the (S)-(+)-enantiomer. *J Neural Transm Gen Sect* 88(2): 157–160.

- Innos, J., Philips, M.-A., Leidmaa, E., ... Vasar, E. (2011). Lower anxiety and a decrease in agonistic behaviour in *Lsamp*-deficient mice. *Behav Brain Res* 217: 21–31.
- 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. *Behav Brain Res* 228: 74–81.
- Innos, J., Leidmaa, E., Philips, M.-A., Sütt, S., Alttoa, A., Harro, J., Kõks, S., Vasar, E. (2013a). *Lsamp*^{-/-} mice display lower sensitivity to amphetamine and have elevated 5-HT turnover. *Biochem Biophys Res Commun* 430: 413–418.
- Innos, J., Koido, K., Philips, M.-A., Vasar, E. (2013b). Limbic system associated membrane protein as a potential target for neuropsychiatric disorders. *Front Pharmacol* 4: 32.
- Jacobs, B. L., Azmitia, E. C. (1992). Structure and Function of the Brain Serotonin System. *Physiol Rev* 72(1): 165–229.
- Janak, P. H. ja Tye, K. M. (2015). From circuits to behaviour in the amygdala. *Nature* 517: 284–292.
- Ji, T., Wu, Y., Wang, H., Wang, J., Jiang, Y. (2010). Diagnosis and fine mapping of a deletion in distal 11q in two Chinese patients with developmental delay. *J Hum Genet* 55(8): 486–489.
- Jin, Z. L., Chen, X. F., Ran, Y. H., Li, X. R., Xiong, J., Zheng, Y. Y., Gao, N. N., Li, Y. F. (2017). Mouse strain differences in SSRI sensitivity correlate with serotonin transporter binding and function. *Sci Rep* 7(1): 8631.
- Kallunki, P., Jenkinson, S., Edelman, G. M., Jones, F. S. (1995). Silencer Elements Modulate the Expression of the Gene for the Neuron-Glia Cell Adhesion Molecule, Ng-CAM. *J Biol Chem* 270: 21291–21298.
- Kallunki, P., Edelman, G. M., Jones, F. S. (1997). Tissue-specific Expression of the L1 Cell Adhesion Molecule Is Modulated by the Neural Restrictive Silencer Element. *J Cell Biol* 138(6): 1343–1354.
- Kelly, D. (1973). Psychosurgery and the limbic system. *Postgrad Med J* 49(578): 825–833.
- Kim, H., Chun, Y., Che, L., Kim, J., Lee, S., Lee, S. (2017). The new obesity-associated protein, neuronal growth regulator 1 (NEGR1), is implicated in Niemann-Pick disease Type C (NPC2)-mediated cholesterol trafficking. *Biochem Biophys Res Commun* 482: 1367–1374.

- Kocsis, B., Varga, V., Dahan, L., Sik, A. (2006). Serotonergic neuron diversity: Identification of raphe neurons with discharges time-locked to the hippocampal theta rhythm. *PNAS* 103(4): 1059–1064.
- Koido, K., Traks, T., Balōtšev, R., ... Vasar, E. (2012). Associations between *LSAMP* gene polymorphisms and major depressive disorder and panic disorder. *Transl Psychiatry* 2(8): e152.
- Kosofsky, B. E., Molliver, M. E. (1987). The serotonergic innervation of cerebral cortex: different classes of axon terminals arise from dorsal and median raphe nuclei. *Synapse* 1(2): 153–168.
- Köks, S., Luuk, H., Nelovkov, A., Areda, T., Vasar, E. (2004). A screen for genes induced in the amygdaloid area during cat odor exposure. *Genes Brain Behav* 3(2): 80–89.
- Lamprecht, R., Dracheva, S., Assoun, S., LeDoux, J. E. (2009). Fear conditioning induces distinct patterns of gene expression in lateral amygdala. *Genes Brain Behav* 8(8): 735–743.
- Lee, J., Kim, B. H., Kim, E., Hows, O. D., Cho, K. I. K., Yoon, Y. B., Kwon, J. S. (2018). Higher serotonin transporter availability in early-onset obsessive-compulsive disorder patients undergoing escitalopram treatment: A [11 C]DASB PET study. *Hum Psychopharmacol* 33(1), doi: 10.1002/hup.2642.
- LeMarquand, D., Pihl, R. O., Benkelfat, C. (1994). Serotonin and alcohol intake, abuse, and dependence: findings of animal studies. *Biol Psychiatry* 36(6): 395–421.
- Lesch, K. P., Bengel, D., Heils, A., Sabol, S. Z., Greenberg, B. D., Petri, S., Benjamin, J., Müller, C. R., Hamer, D. H., Murphy, D. L. (1996). Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science* 274(5292): 1527–1531.
- Levitt, P. (1984). A Monoclonal Antibody to Limbic System Neurons. *Science* 223(4633): 299–301.
- Leypoldt, F., Armangue, T., Dalmau, J. (2015). *Ann N Y Acad Sci* 1338(1): 94–114.
- Leysen, J. E., Pauwels, P. J. (1990). 5-HT₂ receptors, roles and regulation. *Ann N Y Acad Sci* 600: 183–191.
- Lister, R. G. (1987). The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl)* 92(2): 180–185.

- Mann, J. J. (1999). Role of the Serotonergic System in the Pathogenesis of Major Depression and Suicidal Behavior. *Neuropsychopharmacology* 21(2S): 99S–105S.
- Marcinkiewicz, C. A., Mazzone, C. M., D’Agostino, G. ... Kash, T. L. (2017). Serotonin engages an anxiety and fear-promoting circuit in the extended amygdala. *Nature* 537(7618): 97–101.
- Marjoribanks, J., Brown, J., O’Brien, P. M., Wyatt, K. (2013). Selective serotonin reuptake inhibitors for premenstrual syndrome. *Cochrane Database Syst Rev* 6: CD001396.
- Mauro, V. P., Krushel, L. A., Cunningham, B. A., Edelman, G. M (1992). Homophilic and Heterophilic Binding Activities of Nr-CAM, a Nervous System Cell Adhesion Molecule. *J Cell Biol* 119(1): 191–202.
- Meffert, H., Penner, E., VanTieghem, M. R., Sypher, I., Leshin, J., Blair, R. J. R. (2018). The role of ventral striatum in reward-based attentional bias. *Brain Res* 1689: 89–97.
- Meneses, A., Perez-Garcia, G., Liy-Salmeron, G., Flores-Galvez, D., Castillo, C., Castillo, E. (2008). The effects of the 5-HT(6) receptor agonist EMD and the 5-HT(7) receptor agonist AS19 on memory formation. *Behav Brain Res* 195(1): 112–119.
- Millan, M. J. (2000). Improving the Treatment of Schizophrenia: Focus on Serotonin (5-HT)_{1A} Receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 295(3): 853–861.
- Miller, E. K., Cohen, J. D. (2001). An Integrative Theory of Prefrontal Cortex Function. *Annual Rev Neurosci* 24(1): 167–202.
- Miyata, S., Matsumoto, N., Taguchi, K., Akagi, A., Iino, T., Funatsu, N., Maekawa, S. (2003). Biochemical and ultrastructural analyses of IgLON cell adhesion molecules, Kilon and OBCAM in the rat brain. *Neuroscience* 117: 645–658.
- Moja, P. L., Cusi, C., Sterzi, R. R., Canepari, C. (2005). Selective serotonin re-uptake inhibitors (SSRIs) for preventing migraine and tension-type headaches. *Cochrane Database Syst Rev* 3: CD002919.
- Molliver, M. E. (1987). Serotonergic neuronal systems: what their anatomic organization tells us about function. *J Clin Psychopharmacol* 7(6S): 3S–23S.
- 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 Med Genet* 9: 34.

- Najjar, F., Owley, T., Mosconi, M. W., Jacob, S., Hur, K., Guter, S. J., Sweeney, J. A., Gibbons, R. D., Cook, E. H., Bishop, J. R. (2015). Pharmacogenetic Study of Serotonin Transporter and 5HT2A Genotypes in Autism. *J Child Adolesc Psychopharmacol* 25(6): 467–474.
- Narvik, J., Vanaveski, T., Innos, J., Philips, M.-A., Ottas, A., Haring, L., Zilmer, M., Vasar, E. (2018). Metabolic profile associated with distinct behavioral coping strategies of 129Sv and Bl6 mice in repeated motility test. *Sci Rep* 8(1): 3405.
- Neale, S. A., Trasler, D. G. (1994). Early sialylation on N-CAM in splotch neural tube defect mouse embryos. *Teratology* 50(2): 118–124.
- Nelovkov, A., Areda, T., Innos, J., Kõks, S., Vasar, E. (2006). Rats displaying distinct exploratory activity also have different expression patterns of gamma-aminobutyric acid- and cholecystokinin-related genes in brain regions. *Brain Res* 1100(1): 21–31.
- Newgreen, D. F., Tan, S. S. (1993). Adhesion molecules in neural crest development. *Pharmacol Ther* 60(3): 517–537.
- Nichols, D. E., Nichols, C. D. (2008). Serotonin Receptors. *Chem Rev* 108: 1614–1641.
- Nonnis Marzano, F., Maldini, M., Filonzi, L., Lavezzi, A. M., Parmigiani, S., Magnani, C., Bevilacqua, G., Matturri, L. (2008). Genes regulating the serotonin metabolic pathway in the brain stem and their role in the etiopathogenesis of the sudden infant death syndrome. *Genomics* 91(6): 485–491.
- 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. *Clin Cancer Res* 11(16): 5764–5768.
- O'Brien, F. E., Moloney, G. M., Scott, K. A., O'Connor, R. M., Clarke, G., Dinan, T. G., Griffin, B. T., Cryan, J. F. (2015). Chronic P-glycoprotein inhibition increases the brain concentration of escitalopram: potential implications for treating depression. *Pharmacol Res Perspect* 3(6): e00190.
- Ono, K., Tomasiewicz, H., Magnuson, T., Rutishauser, U. (1994). N-CAM mutation inhibits tangential neuronal migration and is phenocopied by enzymatic removal of polysialic acid. *Neuron* 13(3): 595–609.
- Owens, M. J., Knight, D. L., Nemeroff, C. B. (2001). Second-Generation SSRIs: Human Monoamine Transporter Binding Profile of Escitalopram and R-Fluoxetine. *Biol Psychiatry* 50: 345–350.

- Owley, T., Walton, L., Salt, J., Guter, S. J. Jr, Winnega, M., Leventhal, B. L., Cook, E. H. Jr. (2005). An open-label trial of escitalopram in pervasive developmental disorders. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 44(4): 343–348.
- Owley, T., Brune, C. W., Salt, H., Walton, L., Guter, S., Ayuyao, N., Gibbons, R. D., Leventhal, B. L., Cook, E. H. (2010). A Pharmacogenetic Study of Escitalopram in Autism Spectrum Disorders. *Autism Res* 3(1): 1–7.
- Paratcha, G., Ledda, F., Ibáñez, C. F. (2003). The Neural Cell Adhesion Molecule NCAM Is an Alternative Signaling Receptor for GDNF Family Ligands. *Cell* 113(7): 867–879.
- Petrovics, G., Li, H., Stümpel, T., ... Srivastava, S. (2015). A novel genomic alteration of *LSAMP* associates with aggressive prostate cancer in African American men. *EBioMedicine* 2(12): 1957–1964.
- Philips, M-A., Lilleväli, K., Heinla, I., Luuk, H., Hundahl, C. A., Kongi, K., Vanaveski, T., Tekko, T., Innos, J., Vasar, E. (2015). *Lsamp* is implicated in the regulation of emotional and social behavior by use of alternative promoters in the brain. *Brain Struct Funct* 220: 1381–1393.
- Pimenta, A. F., Zhukareva, V., Barbe, M. F., Reinoso, B. S., Grimley, C., Henzel, W., Fischer, I., Levitt, P. (1995). The Limbic System-Associated Membrane Protein Is an Ig Superfamily Member That Mediates Selective Neuronal Growth and Axon Targeting. *Neuron* 15: 287–297.
- Pimenta, A. F., Fischer, I., Levitt, P. (1996). cDNA cloning and structural analysis of the human limbic-system-associated membrane protein (LAMP). *Gene* 170: 189–195.
- Pimenta, A. F. ja Levitt, P. (2004). Characterization of the genomic structure of the mouse limbic system-associated membrane protein (*Lsamp*) gene. *Genomics* 83: 790–801.
- Porsolt, R. D., Chermat, R., Lenègre, A., Avril, I., Janvier, S., Stéru, L. (1987). Use of the automated tail suspension test for the primary screening of psychotropic agents. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 288(1): 11–30.
- Qi, Y.-X., Xia, R.-Y., Wu, Y.-S., Stanley, D., Huang, J., Ye, G.-Y. (2014). Larvae of the small white butterfly, *Pieris rapae*, Express a novel serotonin receptor. *J Neurochem* 131: 767–777.
- Rajmohan, V. ja Mohandas, E. (2007). The Limbic system. *Indian J Psychiatry* 49: 132–139.
- Raper, J., Mason, C. (2010). Cellular Strategies of Axonal Pathfinding. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(9): a001933.

- Rapport, M. M., Green, A. A., Page, I. H. (1948). Crystalline Serotonin. *Science* 108(2804): 329–330.
- Reed, J., McNamee, C., Rackstraw, S., Jenkins, J., Moss, D. (2004). Diglons are heterodimeric proteins composed of IgLON subunits, and Diglon-CO inhibits neurite outgrowth from cerebellar granule cells. *J Cell Sci* 117: 3961–3973.
- Reed, J. E., Dunn, J. R., du Plessis, D. G., Shaw, E. J., Reeves, P., Gee, A. L., Warnke, P. C., Sellar, G. C., Moss, D. J., Walker, C. (2007). Expression of cellular adhesion molecule 'OPCML' is down-regulated in gliomas and other brain tumours. *Neuropathol Appl Neurobiol* 33: 77–85.
- Riad, M., Gracia, S., Watkins, K. C., Jodoin, N., Doucet, E., Langlois, X., el Mestikawy, S., Hamon, M., Descarries, L. (2000). Somatodendritic localization of 5-HT_{1A} and preterminal axonal localization of 5-HT_{1B} serotonin receptors in adult rat brain. *J Comp Neurol* 417(2): 181–194.
- Ries, S. K., Xie, K., Haaland, K. Y., Dronkers, N. F., Knight, R. T. (2013). Role of the lateral prefrontal cortex in speech monitoring. *Front Hum Neurosci* 7: 703.
- Robinson, T. E., Gorny, G., Mitton, E., Kolb, B. (2001). Cocaine self-administration alters the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and neocortex. *Synapse* 39(3): 257–266.
- Rousselot, P., Lois, C., Alvarez-Buylla, A. (1995). Embryonic (PSA) N-CAM reveals chains of migrating neuroblasts between the lateral ventricle and the olfactory bulb of adult mice. *J Comp Neurol* 351(1): 51–61.
- Sabater, L., Gaig, C., Gelpi, E., ... Graus, F. (2014). A novel NREM and REM parasomnia with sleep breathing disorder associated with antibodies against IgLON5: a case series, pathological features, and characterization of the antigen. *Lancet Neurol* 13(6): 575–586.
- Samara, Z., Evers, E. A. T., Peeters, F., Uylings, H. B. M., Rajkowska, G., Ramaekers, J. G., Stiers, P. (2018). Orbital and Medial Prefrontal Cortex Functional Connectivity of Major Depression Vulnerability and Disease. *Biol Psychiatry Cogn Neurosci Neuroimaging* 3(4): 348–357.
- Sanchez, C., Reines, E. H., Montgomery, S. A. (2014). A comparative review of escitalopram, paroxetine, and sertraline: are they all alike? *Int Clin Psychopharmacol* 29(4): 185–196.

- Sapara, A., Cooke, M., Fannon, D., Francis, A., Buchanan, R. W., Anilkumar, A. P. P., Barkataki, I., Aasen, I., Kuipers, E., Kumari, V. (2007). Prefrontal cortex and insight in schizophrenia: A volumetric MRI study. *Schizophr Res* 89(1–3): 22–34.
- Sari, Y., Johnson, V. R., Weedman, J. M. (2011). Role of the Serotonergic System in Alcohol Dependence: From Animal Models to Clinics. *Prog Mol Biol Transl Sci* 98: 401–443.
- Sari, Y. (2013). Role of 5-hydroxytryptamine 1B (5-HT_{1B}) receptors in the regulation of ethanol intake in rodents. *J Psychopharmacol* 27(1): 3–12.
- Schofield, P. R., McFarland, K. C., Hayflick, J. S., Wilcox, J. N., Cho, T. M., Roy, S., Lee, N. M., Loh, H. H., Seeburg, P. H. (1989). Molecular characterization of a new immunoglobulin superfamily protein with potential roles in opioid binding and cell contact. *EMBO J* 8(2): 489–495.
- Schäfer, M., Bräuer, A. U., Savaskan, N. E., Rathjen, F. G., Brümmendorf, T. (2005). Neurotractin/kilon promotes neurite outgrowth and is expressed on reactive astrocytes after entorhinal cortex lesion. *Mol Cell Neurosci* 29(4): 580–590.
- Seitz, R. J., Nickel, J., Azari, N. P. (2006). Functional modularity of the medial prefrontal cortex: involvement in human empathy. *Neuropsychology* 20(6): 743–751.
- Seo, D., Patrick, C. J. (2008). Role of Serotonin and Dopamine System Interactions in the Neurobiology of Impulsive Aggression and its Comorbidity with other Clinical Disorders. *Aggress Violent Behav* 13(5): 383–395.
- Sharma, K., Schmitt, S., Bergner, C. G. ... Simons, M. (2015). Cell type- and brain region-resolved mouse brain proteome. *Nature Neurosci* 18: 1819–1831.
- Siemann, J. K., Muller, C. L., Forsberg, C. G., Blakely, R. D., Veenstra-VanderWeele, J., Wallace, M. T. (2017). *Transl Psychiatry* 7(3): e1067.
- Singh, K., Lilleväli, K., Gilbert, S. F. ... Philips, M.-A. (2018). The combined impact of IgLON family proteins Lsamp and Neurotrimin on developing neurons and behavioral profiles in mouse. *Brain Res Bull* 140: 5–18.
- Smith, S. M., Vale, W. W. (2006). The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues Clin Neurosci* 8(4): 383–395.
- Szymusiak, R., McGinty, D. (2008). Hypothalamic Regulation of Sleep and Arousal. *Ann N Y Acad Sci* 1129: 275–286.

- Stoenica, L., Senkov, O., Gerardy-Schahn, R., Weinhold, B., Schachner, M., Dityatev, A. (2006). In vivo synaptic plasticity in the dentate gyrus of mice deficient in the neural cell adhesion molecule NCAM or its polysialic acid. *Eur J Neurosci* 23(9): 2255–2264.
- 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. *J Neurosci* 15(3): 2141–2156.
- Sugimoto, C., Maekawa, S., Miyata, S. (2010). OBCAM, an immunoglobulin superfamily cell adhesion molecule regulates morphology and proliferation of cerebral astrocytes. *J Neurochem* 112: 818–828.
- Sundström, E., Kölare, S., Souverbic, F., Samuelsson, E.-B., Pschera, H., Lunell, N.-O., Seiger, Å. (1993). Neurochemical differentiation of human bulbospinal monoaminergic neurons during the first trimester. *Dev Brain Res* 75(1): 1–12.
- Sutcliffe, J., S., Delahanty, R. J., Prasad, H. C., McCauley, J. L., Han, Q., Jiang, L., Li, C., Folstein, S. E., Blakely, R. D. (2005). Allelic Heterogeneity at the Serotonin Transporter Locus (*SLC6A4*) Confers Susceptibility to Autism and Rigid-Compulsive Behaviors. *Am J Hum Genet* 77(2): 265–279.
- Zacco, A., Cooper, V., Chantler, P. D., Fisher-Hyland, S., Horton, H. L., Levitt, P. (1990). Isolation, Biochemical Characterization and Ultrastructural Analysis of the Limbic System-Associated Membrane Protein (LAMP), a Protein Expressed by Neurons Comprising Functional Neural Circuits. *J Neurosci* 10(1): 73–90.
- Zhukareva, V., Levitt, P. (1995). The limbic system-associated membrane protein (LAMP) selectively mediates interactions with specific central neuron populations. *Development* 121: 1161–1172.
- Zohar, J., Westenberg, H. G. (2000). Anxiety disorders: a review of tricyclic antidepressants and selective serotonin reuptake inhibitors. *Acta Psychiatr Scand Suppl* 403: 39–49.
- Takamura, M., Okamoto, Y., Okada, G. ... Yamawaki, S. (2017). Patients with major depressive disorder exhibit reduced reward size coding in the striatum. *Biol Psychiatry* 79B: 317–323.
- Tanji, J., Hoshi, E. (2008). Role of the Lateral Prefrontal Cortex in Executive Behavioral Control. *Physiol Rev* 88: 37–57.

- Tao-Cheng, J. H., Zhou, F. C. (1999). Differential polarization of serotonin transporters in axons versus soma-dendrites: an immunogold electron microscopy study. *Neuroscience* 94(3): 821–830.
- Thompson, A. J., Lummis, S. C. R. (2009). 5-HT₃ Receptors. *Curr Pharm Des* 12(28): 3615–3630.
- Törk, I. (1990). Anatomy of the serotonergic system. *Ann N Y Acad Sci* 600: 9–34.
- Tyers, M. B., Freeman, A. J. (1992). Mechanism of the anti-emetic activity of 5-HT₃ receptor antagonists. *Oncology* 49: 263–268.
- Ueno, N., Satoh, Y. (2009). Rapid effect of mosapride citrate, 5-HT₄ receptor agonist, on fasting blood glucose in Type 2 diabetes patients. *J Dabet Complications* 23(4): 255–256.
- Vanaveski, T., Singh, K., Narvik, J. ... Vasar, E. (2017). Promoter-Specific Expression and Genomic Structure of IgLON Family Genes in Mouse. *Front Neurosci* 11: 38, doi: 10.3389/fnins.2017.00038.
- Veenstra-VanderWeele, J., Muller, C. L., Iwamoto, H., ... Blakely, R. D. (2012). Autism gene variant causes hyperserotonemia, serotonin receptor hypersensitivity, social impairment and repetitive behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(14): 5469–5474.
- Wallquist, W., Zelano, J., Plantman, S., Kaufman, S. J., Cullheim, S., Hammarberg, H. (2004). Dorsal root ganglion neurons up-regulate the expression of laminin-associated integrins after peripheral but not central axotomy. *J Comp Neurol* 480(2): 162–169.
- Wesolowska, A., Nikiforuk, A., Stachowicz, K., Tatarcynska, E. (2006). Effect of the selective 5-HT₇ receptor antagonist SB 269970 in animal models of anxiety and depression. *Neuropharmacology* 51(3): 578–586.
- Whitaker-Azmitia, P. M., Druse, M., Walker, P., Lauder, J. M. (1996). Serotonin as a developmental signal. *Behav Brain Res* 73: 19–29.
- Williams, E. J., Walsh, F. S., Doherty, P. (1994). Tyrosine Kinase Inhibitors Can Differentially Inhibit Integrin-dependent and CAM-stimulated Neurite Outgrowth. *J Cell Biol* 124(6): 1029–1037.
- Öngür, D., Price, J. L. (2000). The organization of networks within the orbital and medial prefrontal cortex of rats, monkeys and humans. *Cerebral Cortex* 10: 206–219.

Yamazaki, M., Yamamoto, N., Yarimizu, J., Okabe, M., Moriyama, A., Furutani, M., Marcus, M. M., Svensson, T. H., Harada, K. (2018). Functional mechanism of ASP5736, a selective serotonin 5-HT_{2A} receptor antagonist with potential utility for the treatment of cognitive dysfunction in schizophrenia. *Eur Neuropsychopharmacol* doi: 10.1016/j.euroneuro.2018.03.003.

Yu, B., Qian, T., Wang, Y., Zhou, S., Ding, G., Ding, F., Gu, X. (2012). miR-182 inhibits Schwann cell proliferation and migration by targeting FGF9 and NTM, respectively at an early stage following sciatic nerve injury. *Nucleic Acids Res* 40(20): 10356–10365.

Raamatud

Colman, D. R. ja Filbin, M. T. 2006. Cell Adhesion Molecules, p. 111–121. G. J. Siegel, R. W. Albers, S. T. Brady, D. L. Price, Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects, 7th ed., Elsevier Academic Press, Amsterdam jne.

Franklin, K. B. J., Paxinos, G. 1997. The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, Academic Press, San Diego, London.

Hensler, J. G. 2006b. Serotonin, p. 227–248. G. J. Siegel, R. W. Albers, S. T. Brady, D. L. Price, Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects, 7th ed., Elsevier Academic Press, Amsterdam jne.

Witter, M. P. 2009. Hippocampal Formation. Binder, M. D., Hirokawa, N., Windhorst, U. Encyclopedia of Neuroscience. Springer, Berlin, Heidelberg.

Veebilehed

1. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/235106>, külastatud 14.03.2018
2. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/320840>, külastatud 14.03.2018
3. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/268890>, külastatud 14.03.2018
4. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/330908>, külastatud 21.03.2018
5. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/210094>, külastatud 21.03.2018

6. http://www.dartmouth.edu/~rswenson/NeuroSci/chapter_9.html, Swenson, R. S. 2006. Limbic system. Review of Clinical and Functional Neuroscience. Dartmouth Medical School. Külastatud 22.03.2018
7. <https://www.drugs.com/escitalopram.html>, külastatud 28.03.2018

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Eva-Maria Oja (sünnikuupäev: 16. märts 1994)

annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

***Lsmp* adhesioonimolekuli seosed serotonergilise süsteemiga**

mille juhendajad on Aleksandr Bregin, Jürgen Innos, Mari-Anne Philips ja Tambet Tõnissoo

- 1.1 reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2 üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates 25.05.2021 kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 25. mai 2018