TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT
FÜSIOLOOGIA OSAKOND

# Parvalbumiini interneuronid roti ajus ja inimese hipokampuses ekspresseerivad närvirakkude adhesioonimolekuli NEGR1

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Liisi Promet

Juhendaja MSc Toomas Jagomäe

Kaasjuhendajad PhD Mari-Anne Philips, PhD Tambet Tõnissoo

TARTU 2022

Infoleht

**Parvalbumiini interneuronid roti ajus ja inimese hipokampuses ekspresseerivad närvirakkude adhesioonimolekuli NEGR1**

Närvirakkude adhesioonimolekul NEGR1 on oluline närvisüsteemi struktuuri kujundaja, mida seostatakse psüühikahäirete ja ülekaalulisusega. Hiljutised tööd on leidnud seoseid NEGR1 ja GABA-ergilise süsteemi vahel. Bakalaureusetöös uuritakse lähemalt NEGR1 seoseid GABA-ergiliste parvalbumiini (PV) interneuronitega. Roti aju ja inimese hipokampuse immunohistokeemilisel värvimisel näidati NEGR1 ja PV kolokalisatsiooni roti aju mitmetes piirkondades ning inimese hipokampuse rakkudes. Tulemuste kvantifitseerimisel selgus, et ~93% PV ekspresseerivatest rakkudest roti hipokampuses ekspresseerisid ka NEGR1. Töö tulemused lubavad järeldada, et NEGR1 mõju psüühikahäirete väljakujunemisele võib vähemalt osaliselt olla vahendatud parvalbumiini interneuronite poolt.

Märksõnad: rakuadhesiooni molekul, IgLON, NEGR1, parvalbumiin, psüühikahäired, hipokampus

CERCS kood: B640 Neuroloogia, neuropsühholoogia, neurofüsioloogia

**Parvalbumin interneurons in the rat brain and human hippocampus express neural cell adhesion molecule NEGR1**

Neuronal cell adhesion molecule NEGR1 is important in shaping the structure of the nervous system and is associated with psychiatric disorders and obesity. Recent work has found associations between NEGR1 and the GABAergic system. The aim of the bachelor's thesis was to further investigate the association of NEGR1 with parvalbumin-expressing (PV) GABAergic interneurons. Immunohistochemical staining of the rat brain and human hippocampus showed colocalization of NEGR1 and PV in several areas of the rat brain and in human hippocampal cells. Quantification of the results revealed that ~93% of PV-expressing cells in the rat hippocampus also expressed NEGR1. The results suggest that the effect of NEGR1 on the development of psychiatric disorders may be mediated, at least in part, by parvalbumin interneurons.

Keywords: cell adhesion molecule, IgLON, NEGR1, parvalbumin, psychiatric disorders, hippocampus
CERCS code: B640 Neurology, neuropsychology, neurophysiology

SISUKORD

SISSEJUHATUS ..... 5

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE ..... 6

1.1. Rakuadhesiooni molekulid ..... 6

1.2. IgLON perekond ..... 7

1.3. NEGR1 ..... 7

1.3.1. Ekspressioon ja rollid närvisüsteemis ..... 7

1.3.2. NEGR1 ja GABA-ergiline süsteem ..... 10

1.3.3. NEGR1 ja psüühikahäired ..... 11

1.3.4. NEGR1 ja ülekaalulisus ..... 11

1.3.5. NEGR1 kui tuumorsupressor ..... 12

1.4. Parvalbumiini interneuronid ..... 12

2. EKSPERIMENTAALOSA ..... 14

2.1. Töö eesmärgid ..... 14

2.2. Materjal ja metoodika ..... 15

2.2.1. Katseloomad ..... 15

2.2.2. Katseloomade perfusioon ..... 15

2.2.3. Immunohistokeemia roti ajukoel ..... 15

2.2.3. Kolokalisatsiooni kvantifitseerimine ..... 16

2.2.5. Inimese ajukude ..... 16

2.2.6. Immunohistokeemia inimese hipokampusel ..... 17

2.3. Tulemused ..... 17

2.3.1. NEGR1 ja PV kolokalisatsioon roti ajus ..... 17

2.3.2. NEGR1 ja PV kolokalisatsiooni kvantifitseerimine roti hipokampuses ..... 23

2.3.3. NEGR1 ja PV kolokalisatsioon inimese hipokampuses ..... 24

2.4. Arutelu ..... 24

KOKKUVÕTE ..... 29

RESÜMEE / SUMMARY ..... 30

LIHTLITSENTS ..... 56

**KASUTATUD LÜHENDID**

| | |
|---|---|
| BSA | veise seerumi albumiin (ingl *bovine serum albumine*) |
| CA | Ammoni sarv (lad *cornu ammonis*) |
| FGFR2 | fibroblasti kasvufaktori retseptor 2 (ingl *fibroblast growth factor receptor 2)* |
| GABA | gamma-aminovõihape (ingl *gamma-aminobutyric acid*) |
| Ig | immunoglobuliin |
| Lcn-2 | lipokaliin-2 (ingl *lipocalin-2)* |
| LIF | leukeemia inhibitoorne faktor |
| LIFR | leukeemia inhibitoorse faktori koretseptor |
| mEPSC | miniatuurne erutav postsünaptiline vool (ingl *miniature excitatory postsynaptic current)* |
| NEGR1 | neuronaalne kasvuregulaator 1 (ingl *neuronal growth regulator 1*) |
| *Negr1-/-* | *Negr1*-puudulikkus ehk *Negr1 knockout* organism |
| NGS | kitse immuniseerimata seerum (ingl *normal goat serum*) |
| PBS | fosfaatpuhverdatud soolalahus (ingl *phosphate-buffered saline*) |
| PTZ | pentüleentetrasool (ingl *pentylentetrazole*) |
| PV | parvalbumiin |

## SISSEJUHATUS

Vaimse tervise häired nagu depressioon, ärevushäired, skisofreenia, autismispektri häired, aktiivsus- ja tähelepanuhäire jpm puudutavad miljoneid inimesi ning on ühiskonnale ja tervishoiusüsteemile jätkuvalt suureks väljakutseks (GBD 2019 Mental Disorders Collaborators, 2022). 2022. aastal avaldatud raporti järgi kannatas 2019. aastal vaimse tervise häirete all globaalselt 970,1 miljonit inimest. Raporti kohaselt on enim levinud häireteks ärevushäired ja depressioon. Vähem levinud on skisofreenia, mis aga oma akuutsete psühhoosiepisoodidega põhjustab suurimat töövõimetuse määra.

Psüühikahäirete etioloogia on mitmekesine ning psühholoogiliste tegurite kõrval viidatakse üha enam nende häirete bioloogilistele eelsoodumustele. Ülegenoomsed seoseuuringud on tuvastanud sadu psüühikahäiretega seotud geenilookuseid (Horwitz jt, 2019), kusjuures mitmed psühhiaatrilised häired jagavad omavahel ühiseid geneetilisi riskifaktoreid (Martin jt, 2018; The Brainstorm Consortium jt, 2018). Endiselt rõhutatakse geenide ja keskkonna interaktsiooni (Uher ja Zwicker, 2017). Neuropsühhiaatrilisi häireid on seostatud kõrvalekalletega närvisüsteemi arengus (Courchesne, 2002; Pantelis jt, 2005), häirunud ühenduvusega ajupiirkondade vahel (Fornito ja Harrison, 2012), neuroinflammatsiooni (Dunn jt, 2020) ja aju erutus- ja pidurduspotentsiaalide vahelise tasakaalu häirumisega (Sohal ja Rubenstein, 2019).

Tartu Ülikooli bio- ja siirdemeditsiini instituudi füsioloogia osakonnas on viimase aastakümne jooksul ühe uurimissuunana uuritud närvirakkude adhesioonimolekule IgLON perekonnast. IgLON perekonna valgud reguleerivad neuriitide väljakasvu ja sünapside teket ning on sellega osalised närvisüsteemi arengus (Gil jt, 1998; Hashimoto jt, 2009; Yamada jt, 2007). Muuhulgas on neid seostatud psühhiaatriliste häiretega nagu depressioon ja skisofreenia ning autismispektri häiretega (Pinto jt, 2010; Innos jt, 2013).

Neuronaalne kasvuregulaator 1 ehk NEGR1 on IgLON perekonda kuuluv adhesioonimolekul. NEGR1 ekspresseerub valdavalt ajus (Funatsu jt, 1999) ja reguleerib samuti sünapside teket ja dendriitide väljakasvu (Hashimoto jt, 2008; Pischedda jt, 2014). Genoomiülesed seoseuuringud on leidnud, et *NEGR1* geeni polümorfismid seostuvad tugevalt psühhiaatriliste häiretega nagu depressioon, skisofreenia ja autismispektri häired ning ülekaalulisusega (Hyde jt, 2016; Melén jt, 2010; Pinto jt, 2010; Ripke jt, 2014). Samuti on depressiooni- ja skisofreeniahaigete patsientide närvisüsteemis leitud kõrgenenud NEGR1 taset (Karis jt, 2018; Levey jt, 2021; Maccarrone jt, 2013) ning katsed *Negr1*-puudulike organismidega kinnitavad selle rolli

ülekaalulisuse tekkel (Kaare jt, 2021). Üksikud hiljutised tööd on seostanud NEGR1 GABA-ergilise süsteemiga: *Negr1*-puudulikel hiirtel oli vähenenud parvalbumiini-positiivsete pidurdusneuronite arv hipokampuses (Singh jt, 2019) ning NEGR1-l on leitud olevat roll ensüümi GAD65 sünaptilisel suunamisel (Tan jt, 2022).

Bakalaureusetöö kirjanduse ülevaates kirjeldatakse lähemalt NEGR1 ekspressiooni kesknärvisüsteemis ning selle rolle närvirakkude vaheliste ühenduste kujundamisel. Samuti tutvustatakse NEGR1 seoseid psüühiliste häirete ja ülekaalulisusega. Lühidalt kirjeldatakse ka parvalbumiini interneuronite ekspressiooni ja rolli närvisüsteemis. Eksperimentaalosa eesmärgiks on uurida NEGR1 suhestumist parvalbumiini-positiivsete pidurdusneuronitega roti ajus ja inimese hipokampuses. See võimaldab välja selgitada NEGR1 ja parvalbumiini vahelisi seoseid ning pakkuda esialgseid teadmisi selle kohta, kuidas NEGR1 võib mõjutada parvalbumiini interneuronite arengut ja funktsioneerimist.

Töö koostati Tartu Ülikooli bio- ja siirdemeditsiini instituudi füsioloogia osakonnas.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1. Rakuadhesiooni molekulid

Rakuadhesiooni molekulid vahendavad nii rakkude vahelisi interaktsioone kui rakkude kinnitumist ekstratsellulaarsele maatriksile. Rakuadhesiooni molekulid võib jagada nelja perekonda: kadheriinid, integriinid, selektiinid ja immunoglobuliini superperekond (Petruzzelli jt, 1999). Kadheriinid on $Ca^{2+}$-sõltuvad molekulid, mis läbi homofiilse seondumise tagavad rakkudevahelised ühendused (Takeichi, 1990). Integriinid (samuti $Ca^{2+}$-sõltuvad) vahendavad rakkudevahelisi ja rakkude ja ekstratsellulaarse maatriksi interaktsioone (Luo jt, 2007). Selektiinid on $Ca^{2+}$-sõltuvad lektiinid, mis sidudes glükosüleeritud ligande võimaldavad näiteks leukotsüütide veeremist endoteelirakkude pinnal (McEver, 2015). Immunoglobuliini (Ig) superperekonna valgud on struktuuri ja funktsiooni poolest mitmekesised, kuid neid ühendab ühe või mitme immunoglobuliinitaolise domeeni omamine (Buck, 1992). Ig superperekonna valgud toimivad $Ca^{2+}$-sõltumatult ning on olulised immuunsüsteemi rakkude interaktsioonides, leukotsüütide migratsioonis, signaaliülekandel ning ka närvisüsteemi arengus, sh neuronite migratsioonil, aksonite suunatud väljakasvamisel (*axon pathfinding*) ja sünapside tekkel (Buck, 1992; Rougon ja Hobert, 2003; Sytnyk jt, 2017; Tan jt, 2017).

## 1.2. IgLON perekond

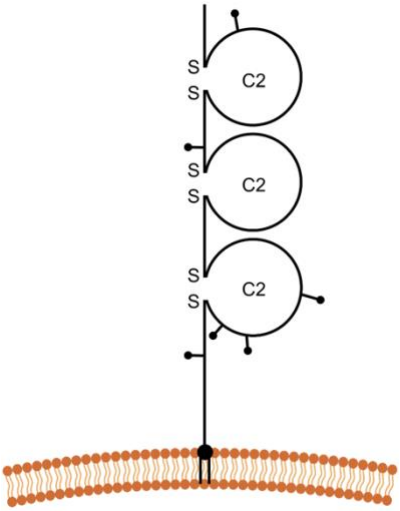
IgLON valkude perekond on osa immunoglobuliini superperekonnast. IgLON perekonda kuuluvad viis närvirakkude adhesioonimolekuli: OPCML/OBCAM (*opioid-binding protein/cell adhesion molecule-like*, IgLON1; Cho jt, 1986), NTM (neurotrimiin, IGLON2; Struyk jt, 1995), LSAMP (*limbic system associated membrane protein*, LAMP, IGLON3; Horton ja Levitt, 1988), NEGR1 (*neuronal growth regulator 1*, Kilon, neurotraktiin, IgLON4; Funatsu jt, 1999) ja IGLON5 (Grimwood jt, 2004). IgLON perekond on saanud nime oma liikmete LSAMP, OBCAM ja neurotriimin järgi. IgLON-id kinnituvad rakumembraanile glükosüülfosfatidüülinositoolankruga (GPI-ankruga), nad on tugevalt glükosüleeritud ja omavad kolme C2-tüüpi immunoglobuliini domeeni (Miyata, Matsumoto, jt, 2003). Hiire proteoomi uuringud on näidanud, et IgLON perekonna valgud esinevad nii neuronitel kui gliiarakkudel (Sharma jt, 2015). IgLON-id moodustavad homo- ja heterofiilsed dimeere teiste oma perekonna valkudega, seda nii *in cis* kui *in trans* (Kim jt, 2014; Marg jt, 1999; McNamee jt, 2011; Miyata, Matsumoto, jt, 2003; Reed jt, 2004). IgLON-id lõigatakse rakumembraani küljest lahti ADAM perekonna metalloproteaaside poolt (Sanz jt, 2015). IgLON-id reguleerivad neuriitide väljakasvu ja sünapside teket (Gil jt, 1998; Hashimoto jt, 2009; Yamada jt, 2007) ning on seotud intellektuaalse võimekuse (Pan jt, 2011) ja mitmete füsioloogiliste ja psühhiaatriliste häiretega (Grove jt, 2019; Karis jt, 2018; Melén jt, 2010; Sabater jt, 2014; Innos jt, 2013). OBCAM, aga ka teised IgLON-id toimivad tuumorsupressoritena (Chen jt, 2003; Sellar jt, 2003).

## 1.3. NEGR1

### 1.3.1. Ekspressioon ja rollid närvisüsteemis

Neuronaalne kasvuregulaator 1 (NEGR1) on närvirakkude adhesioonimolekul, mida inimesel kodeeritakse *NEGR1* geenilt 1. kromosoomis. NEGR1 kirjeldati esmakordselt roti kesknärvisüsteemis Kiloni nime all (Funatsu jt, 1999); kana ortoloog kannab nime neurotraktiin (Marg jt, 1999). NEGR1 struktuur on näidatud joonisel 1.

NEGR1 ekspresseerub valdavalt kesknärvisüsteemis (Funatsu jt, 1999, 2004; Marg jt, 1999; Miyata jt, 2000; Miyata, Matsumoto, jt, 2003; Miyata, Taguchi, jt, 2003; Schäfer jt, 2005). Tänaseni põhjalikuima ülevaate NEGR1 ekspressioonist on andnud Singh jt (2019): mRNA *in situ* hübridisatsioonil näidati *Negr1* ekspressiooni hiire aju somatomotoorse ja somatosensoorse




Joonis 1. **NEGR1 struktuur.** Disulfiidsildadega suletud silmused tähistavad C2 tüüpi Ig-laadseid domeene. Joonte otsas olevad pallid tähistavad arvatavaid glükosüleerimissaite. Joonis on adapteeritud Noh'i jt (2020) tööst.

koore, parietaalkoore assotsiatsioonipiirkonna, visuaalse piirkonna ja retrospleniaalse piirkonna kõigis korteksi kihtides, limbilises süsteemis (hipokampuse hammaskäärus ja Ammoni sarve (*cornu ammonis,* CA) piirkondades CA1, CA2, CA3), entorinaalkoores, *subiculum*'is, amügdalas, hüpotaalamuses, Calleja saartes, haistesibulas, haisteköbrukeses, lateraalse põlvikkeha kompleksis, taalamuse retikulartuumas, kahkjaskeras, väikeaju granulaarkihis ja juttkehas. Vanaveski jt (2017) näitasid qPCR-i meetodil, et *Negr1* transkripti leidus kõige rohkem hiire temporaalkoores (sh amügdaloidses kompleksis), frontaalkoores, kõhtmises juttkehas ja väikeajus. Sealjuures näidati *Negr1* ekspressiooni ka hiire mitteneuraalsetes kudedes, kuid närvisüsteemis leidus *Negr1* mRNA-d 14,4 korda rohkem. Seda kinnitavad ka uuringud inimese kudedes: *Negr1* transkripti tase on kõrgeim ajus, kuid seda leidub ka südames, nahaaluses rasvkoes, lihastes ja mujal (Walley jt, 2012).

Hiire aju erinevate rakutüüpide RNA sekveneerimisel ilmnes, et *Negr1* leidub enim neuronites, oligodendrotsüütide eellasrakkudes, astrotsüütides, noortes (*newly formed*) oligodendrotsüütides, müeliniseerivates oligodendrotsüütides, endoteelirakkudes ja kõige vähesemal määral mikrogliias/makrofaagides (Y. Zhang jt, 2014). Inimese aju rakutüüpide RNA sekveneerimine näitas *NEGR1* ekspressiooni (kõrgeimalt tasemelt madalamale) neuronites, looteea astrotsüütides, oligodendrotsüütides, täiskasvanud astrotsüütides, endoteelirakkudes ja mikrogliias/makrofaagides (Y. Zhang jt, 2016). Sarnast tulemust nähti ka Sharma jt (2015) töös.

NEGR1 ekspresseerub nii neuronite rakukehal, dendriitidel kui aksonitel (Funatsu jt, 1999; Miyata jt, 2000; Miyata, Taguchi, jt, 2003; Tan jt, 2022). Nii roti kui inimese uuringud on näidanud, et NEGR1 on lokaliseeritud rakumembraani lipiidsetesse parvedesse (Funatsu jt, 1999, Kim jt, 2014). Sealjuures võib NEGR1 lokalisatsioon rakus sõltuda organismi arengujärgust. Miyata jt (2003) näitasid uuringus täiskasvanud rottidel, et NEGR1 esines sünapsides, sealjuures rohkem dendriitidel kui rakukehal ning rohkem postsünapsides kui presünapsides. Schäfer jt (2005) näitasid, et hiire rakukultuuris esines NEGR1 soomal ja aksonite taolistel jätketel, ehkki hilisemate rakujagunemiste järel esines NEGR1 ka dendriitidel. Hashimoto jt (2008) uuringus hipokampuse neuronite kultuuril sõltus NEGR1 lokalisatsioon rakujagunemise järgust: rakujagunemise varastes staadiumides esines NEGR1 rohkem aksonitel ja presünapsides, samas kui hilisemas järgus esines NEGR1 valdavalt dendriitide postsünapsides.

NEGR1 mõjutab sünapside teket ja dendriitide väljakasvu. Sealjuures võib see taas sõltuda organismi arengujärgust: NEGR1 üleekspressioon rakukultuuri varasemas järgus vähendas dendriitiliste sünapside arvu, samas kui üleekspressioon hilisemate rakujagunemiste vältel suurendas dendriitiliste sünapside arvu (Hashimoto jt, 2008, 2009). Pischedda jt (2014) leidsid nii *in vitro* kui *in vivo* katsetega, et *Negr1* vaigistamine põhjustab muutusi dendriitide arborisatsioonis, vähendades dendriitide pikkust ja arvu. Lisaks on näidatud, et IgLON perekonna valkude, sh NEGR1 üleekspressioon roti korteksi astrotsüütide kultuuris vähendas astrotsüütide proliferatsiooni (Sugimoto jt, 2012). Singh'i jt (2018) töös näidati, et NEGR1 soodustab neuriitide väljakasvu ja distaalsete aksonite kasvu ning lisaks mõjutab NEGR1 entorinaalkoore projektsioonide väljakasvu hipokampusesse. Postnataalsete *Negr1*-puudulike (*Negr1*−/−) hiirte hipokampaalses rakukultuuris esines muutunud neuritogenees: suurenes neuriitide arv, pikkus ja jagunemine (*branching*) (Singh jt, 2019).

*In vitro* katsetega on tuvastatud, et NEGR1 esineb ka rakuvaheruumis ning metalloproteaas ADAM10 teostab NEGR1 lõikamist (*shedding*) (Pischedda ja Piccoli, 2016). NEGR1 interakteerub fibroblasti kasvufaktori retseptor 2-ga (FGFR2) (Szczurkowska jt, 2018). Autorid näitasid, et nii *Negr1* kui *FGFR2* vaigistamine peatas neuronite migratsiooni närvisüsteemi arengu käigus, lisaks häirus tugevalt neuronite morfoloogia (jätkete arv ja pikkus) ja hiirtel esines autismispektri häiretega seostatud käitumine. FGFR2 üleekspressioon suutis taastada normaalse käitumise, rakkude migratsiooni ja dendriitide morfoloogia ka *Negr1* allareguleerimise juures. Lisaks on näidatud, et manustades depressiooni roti- ja hiiremudelitele

erinevaid antidepressante või töödeldes nendega neuraalseid rakukultuure, langes *Negr1* tase, kuid tõusid *Adam10* ja *Fgfr2* mRNA tase erinevates ajupiirkondades (Carboni jt, 2020).

Uuringud *Negr1-/-* organismidel on näidanud muutusi nii närvisüsteemi struktuuris kui käitumises. Singh jt (2018) töös esinesid *Negr1-/-* hiirtel muutunud aksonite projektsioonid entorinaalkoorest hipokampusesse, häirunud sotsiaalne käitumine, halvenenud õppimisvõime, suurenenud vastuvõtlikkus pentüleentetrasoolist (PTZ) indutseeritud hoogudele, kuid normaalne sooritus aktiivsust, ärevust ja sensoorse informatsiooni filtreerimist (*sensorymotor gating*) mõõtvates testides. Singh jt (2019) töös näidati *Negr1*-/- hiirtel ajustruktuuride muutusi (suurenenud ajuvatsakesed ja vähenenud ajumaht nii terves ajus, mõhnkehas, kahkjaskeras kui hipokampuses), vähenenud parvalbumiini-positiivsete pidurdusneuronite arvu hipokampuse hammaskäärus ja Ammoni sarve piirkondades ning selektiivseid muutusi sotsiaalses käitumises, kusjuures muutused käitumises korreleerusid ajustruktuuri muutustega. Noh jt (2019) näitasid *Negr1*-/- hiirtel vähenenud täiskasvanuea neurogeneesi hipokampuse hammaskäärus ning ärevuse- ja depressioonilaadset käitumist. Hammaskäärus olid vähenenud pikaajaline potentseerimine (*long-term potentiating*) ja miniatuurse erutava postsünaptilise voolu (*miniature excitatory postsynaptic current*, mEPSC) sagedus. Seda vahendas vähenenud lipokaliin-2 (Lcn-2) valgu tase hammaskäärus. LIFR, millega NEGR1 interakteerub, on koretseptor leukeemia inhibitoorsele faktorile (LIF), mis omakorda stimuleerib Lcn2 induktsiooni. Heteroloogne Lcn2 ekspressioon hammaskäärus taastas neurogeneesi, normaalse käitumise ning mEPSC normaalse sageduse.

### 1.3.2. NEGR1 ja GABA-ergiline süsteem

Seni on NEGR1 ja gamma-aminovõihappesüsteemi (GABA-süsteemi) seoseid uurinud kaks tööd. Singh jt (2019) näitasid, et *Negr1*-/- hiirtel oli vähenenud parvalbumiini-positiivsete rakkude arv hipokampuses. Tan jt (2022) näitasid, et hiire hipokampaalses rakukultuuris esines NEGR1 dendriitidel ja sünapsidel, kusjuures 75% neist sünapsidest ekspresseerisid ka ensüümi GAD65 (glutamaadi dekarboksülaas 65), mis muudab glutamaadi GABA-ks. NEGR1 rolliks on GAD65 sünapsisse suunamine (*synaptic targeting*). NEGR1 takistas sünaptiliste vesiikulite membraani tagasihaaret (*synaptic vesicle membrane retrieval*) sünaptilisest plasmamembraanist, mis soodustas GAD65 akumuleerumist presünaptilises plasmamebraanis. Autorid näitasid, et *Negr1*-/- hiirtel olid vähenenud GAD65-positiivsed inhibitoorsed sünapsid hüpotaalamuse kaartuumas ja hipokampuse CA3 piirkonnas. *Negr1*-/- hiirtel näidati ka vähenenud motivatsiooni tarbida kõrge maitseväärtusega toidupalu. Kõrge rasvasisaldusega dieedi korral oli hiirte ajus kõrgenenud NEGR1 tase, millega kaasnes GAD65 akumuleerumine

sünaptilises plasmamembraanis ja vähenenud GABA kontsentratsioon sünapsides; vähenes ka sünapside arv.

### 1.3.3. NEGR1 ja psüühikahäired

Lisaks neuronite morfoloogiale ja närvisüsteemi struktuuri muutustele on NEGR1 seostatud ka paljude psühhiaatriliste ja metaboolsete häiretega. Ülegenoomsetes assotsiatsiooniuuringutes on *NEGR1* geeni polümorfismidel leitud seoseid depressiooni (Hyde jt, 2016; Wray jt, 2018), autismi (Casey jt, 2012; Michaelson jt, 2012; Pinto jt, 2010), madala valgeaine terviklikkusega (Dennis jt, 2014) ja intelligentsusega (Sniekers jt, 2017). Geneetiliste ja transkriptoomi uuringute kombineerimisel on näidatud seoseid depressiooni ja *NEGR1* ekspressiooni vahel hüpotaalamuses (Levey jt, 2021) ja veres (Dall'Aglio jt, 2021; Gerring jt, 2019). Li jt (2020) analüüsisid andmeid depressioonipatsientide aju ekspressiooni kohta ja näitasid kahel erineval andmestikul NEGR1 kõrgenenud taset vastavalt hipokampuse CA1 piirkonnas ja hammaskäärus või naalduvas tuumas. Lisaks on näidatud kõrgemat NEGR1 taset depressioonipatsientide ja bipolaarse häirega patsientide seljaajuvedelikus (Maccarrone jt, 2013). Cox jt (2016) järgi oli NEGR1 üks neist valkudest, mille ekspressioon oli skisofreeniahaigete *post mortem* aju eesmises frontaalkoores võrreldes kontrollgrupiga muutunud. Samuti näitasid Karis jt (2018) skisofreeniapatsientide *post mortem* aju dorsolateraalses prefrontaalses korteksis kõrgenenud *NEGR1* ekspressiooni. SNP-e, deletsioone või koopianumbri variante 1p31.1 piirkonnas, mis hõlmab ka *NEGR1* geeni, on seostatud düsleksia, arengu-, käitumis- ja psühhiaatriliste ning füsioloogiliste häiretega (Genovese jt, 2015; Holliday jt, 2009; Tassano jt, 2015, 2020; Veerappa jt, 2013).

### 1.3.4. NEGR1 ja ülekaalulisus

Ülegenoomsetes assotsiatsiooniuuringutes on *NEGR1* enim seostatud kehamassiindeksi ja ülekaalulisusega (Schlauch jt, 2019; Speliotes jt, 2010; Thorleifsson jt, 2009; Wheeler jt, 2013; Willer jt, 2009; Winkler jt, 2015). Lisaks genoomiuuringutele on ka eksperimentaalne NEGR1 ekspressiooni muutmine näidanud selle rolli metabolismi ja kehakaalu reguleerimisel. Olulisel kohal võib sealjuures olla NEGR1 ekspressioon hüpotaalamuses. Toidu kättesaadavuse piiramine suurendas *Negr1* ekspressiooni ventromediaalses hüpotaalamuses (Boender jt, 2012). Boender jt (2014) näitasid, et vähenenud *Negr1* ekspressioon hüpotaalamuses suurendas söödavaid toidukoguseid ja sellega koos kehakaalu, ehkki *Negr1* ekspressiooni suurendamine muutusi esile ei kutsunud. Venkannagari jt (2020) järgi vähendas NEGR1 ektodomeeni manustamine hüpotaalamuse paraventrikulaarsesse tuuma rottide söödavaid toidukoguseid.

*Negr1*-puudulikel hiirtel on näidatud vähenenud kehamassi ja seda just rasvavaba massi arvelt; samuti vähenesid söödavad toidukogused ja füüsiline aktiivsus (Lee jt, 2012). Lisaks on *Negr1*−/− hiirtel näidatud suurenenud rasvamassi koos suurenenud rasvarakkudega ning lipiidide akumuleerumisega maksas; sealjuures suurenes plasma glükoosi- ja insuliinitase ning vähenes lihasmass (Joo jt, 2019). Rasva akumuleerumist maksas, kõrgenenud glükoosisisaldust veres ja skeletilihaste mahu vähenemist kinnitavad ka Kaare jt (2021) tulemused, ehkki mõningate näitajate puhul esines efekt vaid isastel hiirtel. Lisaks näitasid Kaare jt, et standardsel dieedil vähenes *Negr1*−/− hiirte kaal, samas kui kõrge rasvasisaldusega toit indutseeris isastel hiirtel vähenenud toidutarbimist ja kaalutõusu. NEGR1 rolli kehakaalu regulatsioonis kinnitavad ka inimuuringud: Walley jt (2012) uuringus oli *NEGR1* üks olulisematest geenidest, mis olid ülekaaluliste ja saledate katseisikute nahaaluses rasvkoes erinevalt reguleeritud. Sealjuures korreleerusid *NEGR1* transkripti tase nahaaluses rasvkoes ja hüpotaalamuses. Üheks NEGR1 efektide vahendajaks ülekaalulisusele võib olla NEGR1 interaktsioon kolesterooli transporteri Niemann-Picki tõve tüüp C2 valguga (Kim jt, 2017).

### 1.3.5. NEGR1 kui tuumorsupressor

Adhesioonimolekulid reguleerivad rakkudevahelisi kontakte ning veatult toimivad ühendused rakkude vahel on eelduseks kudede normaalsele arengule, kasvule ja regeneratsioonile. Nagu teistele IgLON perekonna liikmetele (Chen jt, 2003; Sellar jt, 2003), on ka NEGR1-le omistatud tuumorsupressorgeeni funktsioone. Munasarjavähi proovides oli vähenenud NEGR1 (ja osaliselt teiste IgLON perekonna valkude) ekspressioon (Ntougkos jt, 2005). Takita jt (2011) näitasid, et deletsioonid 1p31 piirkonnas, mis hõlmas ka *NEGR1* geeni, olid seotud neuroblastoomiga. Hilise staadiumi neuroblastoomis täheldati alanenud NEGR1 ekspressiooni, kusjuures eksogeenne NEGR1 ekspressioon neuroblastoomi rakkudes vähendas olulisel määral rakkude jagunemist ja aeglustas rakkude kasvu. Ka Kim jt (2014) näitasid NEGR1 rolli tuumorsupressorina erinevates inimese vähiliikides. Sealjuures suurendas NEGR1 üleekspressioon rakkude agregatsiooni ja neuriitide väljakasvu ning NEGR1 vaegus põhjustas suurenenud rakkude migratsiooni ja invasiooni.

## 1.4. Parvalbumiini interneuronid

Parvalbumiin (PV) on tsütoplasmaatiline kaltsiumit siduv valk, mis kuulub EF-motiiviga kaltsiumit siduvate valkude perekonda (sealjuures koos kalmoduliini, kalbindiini ja kalretiniiniga) (Hof jt, 1999). PV toimib kaltsiumi puhvrina (Hof jt, 1999) ja on oma kolme EF-motiiviga võimeline siduma nii $Ca^{2+}$- kui $Mg^{2+}$-ioone (Vologzhannikova jt, 2021). PV isoleeriti

esmalt kala lihaskoest (Hamoir, 1968) ning hiljem on näidatud selle esinemist erinevate organismide lihaskoes, seedesüsteemis ja mujal (Heizmann, 1984), sealjuures olulisel määral ka kesknärvisüsteemis (Celio, 1990).

PV ekspressioon on hästi kirjeldatud nii hiire ja roti kui inimese ajus. Celio (1990) kirjeldas põhjalikult PV esinemist roti ajus ning näitas selle ekspressiooni nii ajukoores, hipokampuses, väikeaju koores kui seljaajus. Sealjuures esinesid pikkade aksonitega PV+ neuronid taalamuse retikulaartuumas, kahkjaskeras, mustolluses (*pars reticulata*), osaliselt spinaal-, retinaal-, kohleaar- ja vestibulaarganglionides, kraniaalnärvis, mõnedes ependüümirakkudes ja mõnedes Corti organi rakkudes (*pillar cells*). Ka väikeaju Purkinje rakud ekspresseerid PV. Berchtold jt (1985) isoleerisid esmakordselt PV inimese lihaskoest ja suurajukoorest. PV ekspressioon inimese ajus on sarnane teiste uuritud imetajate, nt roti omale (Braak jt, 1991; Hof jt, 1999; Ohshima jt, 1991; Sloviter jt, 1991). Inimesel on näidatud PV+ neuronite esinemist kõigis hipokampuse piirkondades (Braak jt, 1991; Höchli jt, 1991; Seress jt, 1993; Sloviter jt, 1991).

Celio (1986) ja Kosaka jt (1987) näitasid rotil, et PV+ neuronid on subpopulatsioon GABA-ergilistest inhibeerivatest neuronitest. Tremblay jt (2016) järgi moodustavad PV+ interneuronid suurima osa GABA-ergilistest neuronitest neokorteksis (ca 40%) ning morfoloogiliste tüüpide järgi võib need põhiliselt jagada korvrakkudeks (*basket cells)* ja lühterrakkudeks (*chandelier cells)*. Korvrakud innerveerivad püramidaalrakkude ja teiste interneuronite soomat ja proksimaalseid denriite, samas kui lühterrakud moodustavad sünapsi ainult püramidaalrakkude aksoni algusosale (*axon inital segment*).

PV+ GABA-ergilisi interneuroneid iseloomustab kiire laenglemine, mis võib olla pidevalt sagedusel üle 50 Hz (Kawaguchi jt, 1987; Nahar jt, 2021). Seda võimaldab PV+ neuronite eriline molekulaarne ülesehitus, näiteks aksonite ja dendriitide piirkonnale omane spetsiifilist tüüpi NMDA ja AMPA retseptorite ning erinevate ioonkanalite ekspressioon (Bartholome jt, 2020; Hu jt, 2014). PV+ neuronid inhibeerivad ümbritsevaid neuroneid (sealjuures ka teisi PV+ rakke) ning seeläbi reguleerivad aju glutamaadi-, GABA- ja dopamiinisüsteeme (Nahar jt, 2021). PV+ neuronid on vajalikud gamma võnkesageduse (20-80 Hz) tekkimiseks ajus (Antonoudiou jt, 2020; Cardin jt, 2009; Sohal jt, 2009), mida seostatakse inimesel tähelepanu ja töö- ja pikaajalise mäluga (Jensen jt, 2007).

PV+ neuronid mängivad olulist rolli aju pidurdava ja erutava tasakaalu hoidmisel, mille düsregulatsiooni seostatakse paljude psühhiaatriliste häiretega (Ferguson ja Gao, 2018; Selten

jt, 2018). Ka PV+ neuroneid on otseselt seostatud erinevate psühhiaatriliste häiretega (ülevaateks vaata Nahar jt, 2021). Skisofreeniapatsientide hipokampuses on vähenenud PV+ neuronite osakaal (Z. Zhang jt, 2002). Samuti on paljusid skisofreenia loommudeleid seostatud PV+ neuronite hulga vähenemisega hipokampuses (Abdul-Monim jt, 2007; Harte jt, 2007; Jenkins jt, 2009; Veerasakul jt, 2016). Lodge jt (2009) näitasid, et skisofreenia loommudelil kaasnes PV neuronite vähenemisega ka gamma võnkesageduse vähenemine. Sealjuures on skisofreeniapatsientidel näidatud häirunud gammavõnkeid, näiteks vähenenud gammavõngete amplituudi kognitiivsete ülesannete täitmisel (Uhlhaas ja Singer, 2010). Epileptilises koes on vähenenud PV+ neuronite arv nii loommudelitel kui inimesel ning mitmed PV+ neuroneid mõjutavad geneetilised alteratsiooni on seotud ka epilepsiaga (Jiang jt, 2016). Vähenenud PV+ neuronite arvu on näidatud ka Alzheimeri tõve loommudeli hipokampuse CA1 piirkonnas (Zallo jt, 2018). Veel on PV+ neuroneid seostatud sõltuvushäirete, autismispektri häirete, depressiooni ja stressiga (Nahar jt, 2021).

# 2. EKSPERIMENTAALOSA

## 2.1. Töö eesmärgid

Käesolev bakalaureusetöö on osa Tartu Ülikooli bio- ja siirdemeditsiini instituudi füsioloogia osakonnas Eero Vasara töögrupis läbiviidavast uurimistööst.

Hiljutises kirjanduses on viidatud närvirakkude adhesioonimolekuli NEGR1 seostele GABA-ergilise süsteemiga: *Negr1*-/- hiirtel on täheldatud parvalbumiini ekspresseerivate interneuronite (PV+) vähenemist hipokampuses, mis on tõstatanud hüpoteesi, et NEGR1 võib oma mõjusid psüühikahäiretele avaldada PV+ interneuronite vahendusel. Lisaks on NEGR1-l näidatud olevat roll ensüümi GAD65 sünaptilisel suunamisel. Bakalaureusetöö peaeesmärgiks on välja selgitada NEGR1 ekspressioon roti peaaju ning inimese hipokampuse GABA-ergilistes PV+ interneuronites.

Töö kitsamateks eesmärkideks on:
1. Kirjeldada NEGR1 ja PV kolokalisatsiooni roti aju korteksis, hipokampuses, amügdalas, taalamuses ja väikeajus.
2. Kvantifitseerida NEGR1 ja PV kolokalisatsioon roti hipokampuses.
3. Kirjeldada NEGR1 ja PV kolokalisatsiooni inimese hipokampuses.

## 2.2. Materjal ja metoodika

### 2.2.1. Katseloomad

Immunohistokeemilistes eksperimentides kasutati metsiktüüpi Sprague Dawley rottide (Crl: CD(SD) rotid CD® IGS, Charles River Laboratories) ajukudesid. Rotte kasvatati Tartu Ülikooli bio- ja siirdemeditsiini instituudi katseloomakeskuses. Loomi kasvatati puurides 2-4-kaupa standardsetes elutingimustes 12-tunnise valguse/pimeduse tsükliga (valguseperioodi algusega kl 7.00). Loomadel oli piiramatu ligipääs toidule (Sniffi universaalne hiire ja roti dieet, Ssniff #V1534, ssniff Spezialdiäten) ja veele (pöördosmoosi teel puhastatud vesi). Kõiki protseduure loomadega teostati kooskõlas 2010. aasta septembri Euroopa Parlamendi ja nõukogu direktiiviga (2010/63/EU).

### 2.2.2. Katseloomade perfusioon

Täiskasvanud rotid (n=2) uinutati süstides neile ketamiin/dexmedetomidine lahust füsioloogilises lahuses (ketamiin 150 mg/kg, dexmedetomidine 0.5 mg/kg, süstemaht 0.1 ml 100 g kohta intraperitoneaalselt). Kui loomad olid saavutanud sügava anesteesia, avati rinnakorv ning loomad perfusioon-fikseeriti. Selleks viidi perfusiooninõel südame vasakusse vatsakesse ja tehti lõige paremasse kotta. Seejärel pesti välja veri (fosfaatpuhvriga, 50 ml/min) ning fikseeriti (4% formaldehüüd/fosfaatpuhvri lahusega, 50 ml/min). Katseloomade perfuseerimist viis läbi selleks volitatud isik.

### 2.2.3. Immunohistokeemia roti ajukoel

Perfuseeritud ja fikseeritud ajukoed dissekteeriti, immutati külmakaitse eesmärgil 30% sahharoosilahuses fosfaatpuhverdatud soolalahuses (*phosphate-buffered saline*, PBS, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM $Na_2HPO_4$, 1,8 mM $KH_2PO_4$, 0,01% $NaN_3$, pH 7,4) ning külmutati -80 °C juures. Ajudest lõigati krüomikrotoomiga Leica CM1520 (Leica Biosystems) 30 µm paksused lõigud. Lõigud tehti nii koronaal-, sagitaal- kui horisontaaltasapinnas. Lõike säilitati edaspidiseks kasutamiseks PBS-is. Koelõike pesti 3 korda 5 minutit PBS-is ning permeabiliseeriti 45 minutit loksutil PSU-20i (Biosan) 0,25% Triton X-100 (Naxo) lahuses PBS-is. Mittespetsiifilise signaali vähendamiseks inkubeeriti lõikusid üleöö loksutil blokeerimislahuses (0,3M glütsiin (Naxo), 5% immuniseerimata kitse seerum (*normal goat serum*, NGS; Nordic BioSite), 1% veise seerumi albumiin (*bovine serum albumine*, BSA; Sigma-Aldrich), 0,1% Tween-20 (Naxo), PBS). Seejärel inkubeeriti koelõike 2 ööpäeva 4 °C juures loksutil primaarsete antikehade lahuses (1% BSA, 0,1% Tween-20, PBS) koos järgmiste

antikehadega: küülikus valmistatud NEGR1 vastased antikehad (0,5 µg/ml, Sigma-Aldrich Cat# HPA011894, RRID:AB_1854363) ja meriseas valmistatud PV vastased antikehad (1:250, Synaptic Systems Cat# 195 004, RRID:AB_2156476). Seejärel pesti koelõike 5 korda 5 minutit 0,1% Tween-20 PBS-is. Koelõike inkubeeriti 2 tundi toatemperatuuril loksutil sekundaarsete antikehade lahuses (1% veise seerumi albumiin, 0,1% Tween-20, PBS) järgmiste fluorofooridega konjugeeritud antikehadega: kitses valmistatud küüliku vastased antikehad (Alexa Fluor 488) (3 µg/ml, Jackson ImmunoResearch Labs Cat# 111-545-045, RRID:AB_2338049) ja eeslis valmistatud merisea vastased antikehad (rodamiin (TRITC)) (3 µg/ml, Jackson ImmunoResearch Labs Cat# 706-025-148, RRID:AB_2340445). Koelõike pesti 5 korda 5 minutit 0,1% Tween-20 PBS-is. DNA märgistamiseks inkubeeriti lõike 10 minutit loksutil bisbensimiid H 33258 lahuses PBS-is (5 µg/mL, Hoechst 33258, Sigma-Aldrich). Seejärel pesti lõike 10 minutit PBS-is. Koelõigud pandi klaasidele kasutades 0,5% želatiinilahust (BDH Laboratory Supplies) ning lasti kuivada toatemperatuuril pimedas. Lõigud sulundati kasutades Fluoromounti sulundusvedelikku (Sigma-Aldrich) ja klaasid kaeti 0,13-0,16 mm paksuste katteklaasidega (Marienfeld). Sekundaarsete antikehade seondumise spetsiifilisust kontrolliti koelõikude prooviga, kuhu ei lisatud primaarseid antikehi (negatiivne kontroll). Koelõikusid vaadeldi ja pildistati Leica SCN400 slaidide skänneriga (Leica Microsystems). Paneelide tegemiseks kasutati programmi GIMP (versioon 2.10.22). Ajupiirkondade määramiseks kasutati Paxinose ja Watsoni (2014) atlast.

### 2.2.3. Kolokalisatsiooni kvantifitseerimine

Selleks, et hinnata täpsemalt NEGR1 paiknemist roti hipokampuse piirkonna PV+ rakkudes, lõigati 30 µm lõigud 600 µm intervalliga Bregma koordinaatide vahemikus -1,72 kuni -6,84 mm (koronaaltasapinnas) ja -3,10 kuni -9,10 mm (horisontaaltasapinnas) (Paxinos ja Watson, 2014) (n=2). Pärast immunohistokeemilist töötlemist piiritleti saadud koronaal- ja horisontaallõikudelt hipokampuse piirkonnad *subiculum*, Ammoni sarve väljad CA1-CA3 ja hammaskäär ning loendati rakud, mis ekspresseerisid ainult PV ning rakud, mis ekspresseerisid nii PV kui NEGR1.

### 2.2.5. Inimese ajukude

Inimese ajukoe uurimiseks koguti *post mortem* koeproovid tervetelt (st ilma kliinilise diagnoosita) isikutelt (n=5), kelle keskmine vanus oli 36 ± 8,4. Proovid kogusid Tartu Ülikooli patoloogilise anatoomia ja kohtuarstiteaduste osakond ja Eesti Kohtuekspertiisi Instituut. Töö inimese ajukoega toimus Tartu Ülikooli inimuuringute eetika komitee nõusolekul (223/T-4).

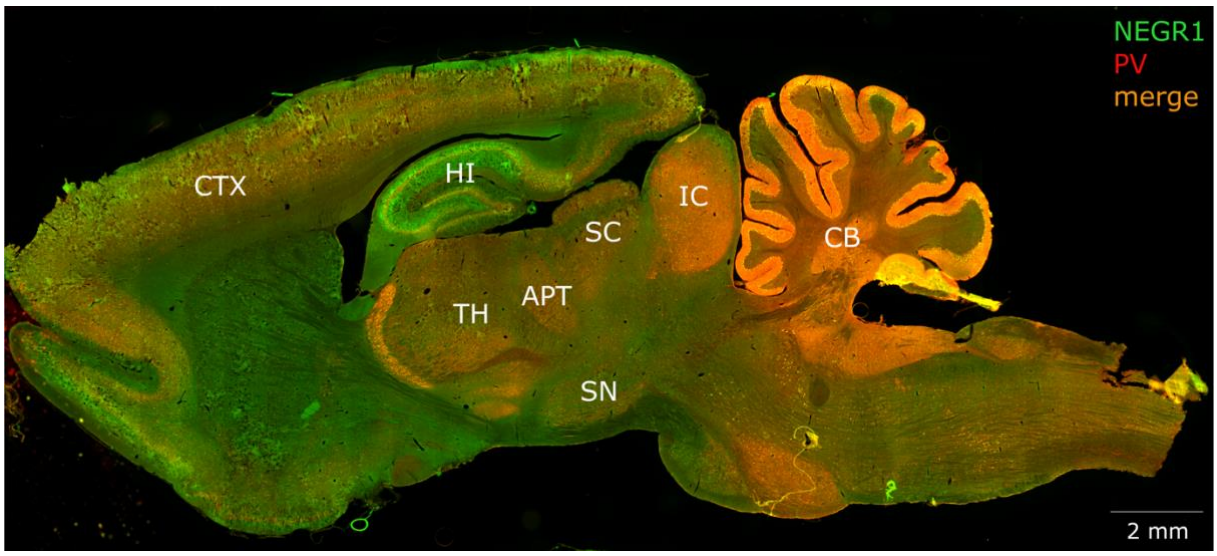
### 2.2.6. Immunohistokeemia inimese hipokampusel

Inimese ajukoe immunohistokeemilisel värvimisel tugineti osaliselt Waldvogeli jt (2006) protokollile. Hipokampuste dissekteerimise järel immutati kudesid külmakaitse eesmärgil 30% sahharoosilahuses PBS-is 4 ööpäeva ning külmutati -80 °C juures. Hipokampustest lõigati krüomikrotoomiga Leica CM1520 (Leica Biosystems) 30 või 40 µm paksused koronaallõigud. Koelõike inkubeeriti 1h kuni üleöö 0,2% Triton X-100 lahuses PBS-is. Seejärel inkubeeriti koelõike 0,1M naatriumtsitraadi (Sigma-Aldrich) lahuses (pH 4,5) üleöö 4 °C juures loksutil. Koelõike kuumutati 3 korda 5 minutit 95 °C 0,1M naatriumtsitraadi lahuses, vahepeal segades. Pärast toatemperatuurini jahutamist pesti koelõike 3 korda 15 minutit 0,2% Triton X-100 lahuses PBS-is. Seejärel inkubeeriti koelõike 1 h jooksul blokeerimislahuses koostisega 0,3M glütsiin, 5% NGS, 1% BSA ja 0,2% Triton X-100 PBS-is. Koelõike inkubeeriti 4 ööpäeva 4 °C juures loksutil primaarsete antikehade lahuses. Kasutatud antikehad ja kontsentratsioonid olid samad, mis roti ajukoel tehtava protseduuri puhul (alapeatükk 2.2.3), kuid antikehad lahustati 1% NGS ja 0,2% Triton X-100 lahuses PBS-is. Pärast primaarsete antikehade lahusega inkubeerimist pesti koelõike 3 korda 15 minutit 0,2% Triton X-100 PBS-is. Seejärel inkubeeriti koelõike üleöö 4 °C juures loksutil sekundaarsete antikehade lahuses. Taas kasutati samu antikehi ja kontsentratsioone, mis roti immunohistokeemia puhul (alapeatükk 2.2.3), kuid lahusena kasutati 1% NGS ja 0,2% Triton X-100 PBS-is. Koelõike pesti 5 korda 15 minutit 0,2% Triton X-100 PBS-is. Autofluorestsentsi vähendamiseks värviti koelõike 40 minutit 1% sudaanmusta lahusega 70% etanoolis loksutil pimedas. Seejärel pesti koelõike 70% etanooliga, kuni etanool enam ei värvunud. Rakutuumade visualiseerimiseks inkubeeriti lõike 10 minutit loksutil bisbensimiid H 33258 lahuses PBS-is (5 µg/mL, Hoechst 33258, Sigma-Aldrich). Järgnevad protseduurid ja materjalid kattusid roti ajukoel kasutatud protokolliga. Ka inimese ajukoel kontrolliti sekundaarsete antikehade seondumise spetsiifilisust negatiivse kontrolliga. Inimese hipokampuse piirkondade määramisel toetuti Mai jt (2016) atlasele.

## 2.3. Tulemused

### 2.3.1. NEGR1 ja PV kolokalisatsioon roti ajus

Ehkki NEGR1 valgu paiknemist imetajate kesknärvisüsteemis on laialdaselt kirjeldatud, pole täpselt teada, milliseid signaale NEGR1 ekspresseerivad rakud vahendavad. Sellest johtuvalt seati bakalaureusetöö peaeesmärgiks välja selgitada, kas NEGR1 paikneb roti ja inimese GABA-ergilistes parvalbumiini ekspresseerivates (PV+) interneuronites. Kasutades ajukudede immunohistokeemilist analüüsi leiti, et roti peaaju erinevates piirkondades




Joonis 2. **NEGR1 ja PV lokalisatsioon roti ajus**. NEGR1 (roheline) ja PV (punane) immunohistokeemiline analüüs roti aju sagitaallõigul. NEGR1 kolokaliseerub PV-ga ajukoore (CTX), hipokampuse (HI), taalamuse (TH), väikeaju (CB), eesmise pretektaalse tuuma (APT), mustolluse (SN), ülemiste küngaste (SC) ja alumiste küngaste (IC) interneuronites. Mõõtkava: 2 mm.

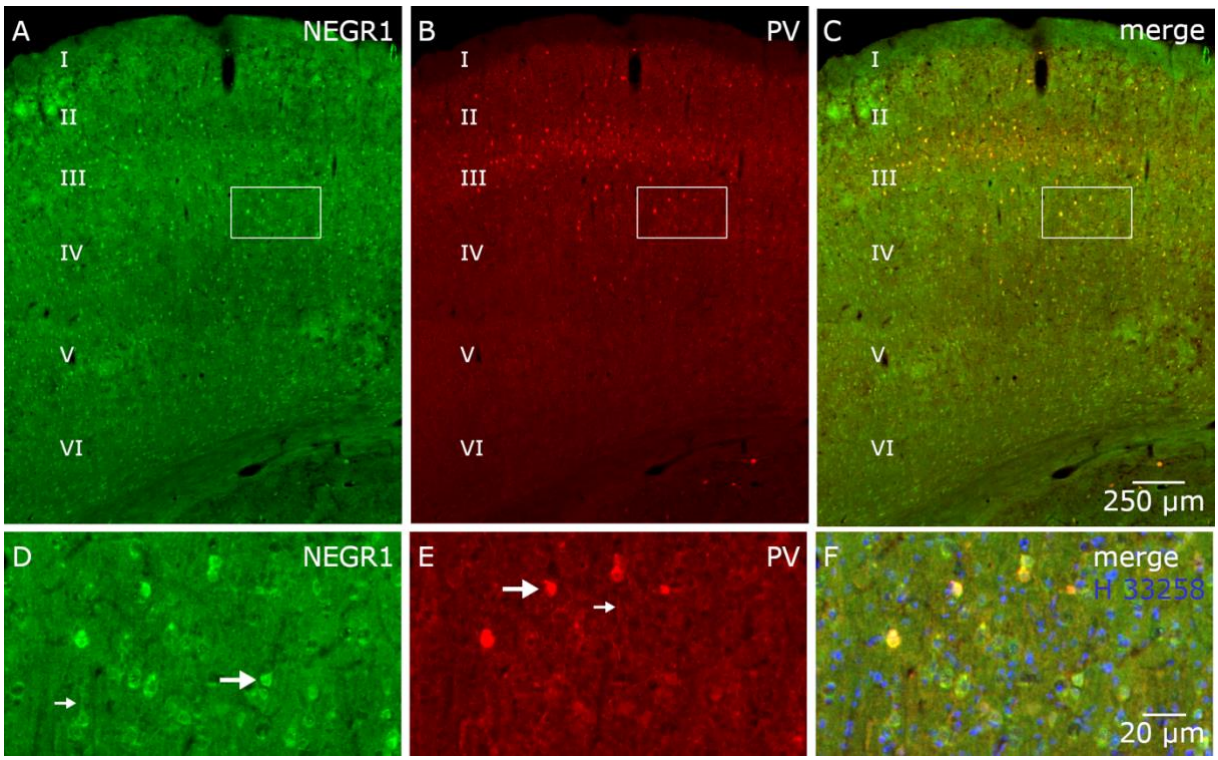
kolokaliseerub NEGR1 parvalbumiiniga (joonis 2). NEGR1 esineb valdavalt rakukehades ning vähesemal määral jätketel (joonis 3D). Tsütoplasmaatiline kaltsiumit siduv valk parvalbumiin paikneb neuronites nii jätketes kui rakukehades (joonis 3E). Täpsemal vaatlusel on täheldatav, et valdav enamik PV+ neuroneid toodavad ka NEGR1 valku (joonis 3F).

*Ajukoor*

Immunohistokeemiline analüüs näitas, et NEGR1 paikneb ühtlaselt ajukoore erinevates piirkondades ja kihtides, välja arvatud ajukoore I ehk molekulaarkihis (joonis 3A). PV ekspressioon varieerub ajukoores sõltuvalt piirkonnast ja kihist. Ajukoore somatosensoorses piirkonnas esineb PV põhiliselt III kihis, kuid vähesemal määral ka II ja IV kihis (joonis 3B). Kui vaadata lähemalt NEGR1 ekspressiooni somatosensoorse ajukoore PV+ rakkudes, siis praktiliselt kõik PV+ neuronid ekspresseerivad ka NEGR1, samas väike osakaal kõigist NEGR1+ rakkudest on ka PV+ (joonis 3C, D-F).

*Hipokampus*

Hipokampuse piirkonna analüüsi tulemusena leiti, et NEGR1 on tugevalt ekspresseerunud Ammoni sarve kõigi väljade (CA1-CA3) püramidaalkihis ja hammaskääru granulaarkihis (joonis 4A, E, H, K). Üksikud NEGR+ rakud esinevad ka Ammoni sarve *stratum oriens*'is, *stratum radiatum*'is ja *stratum lacunosum moleculare*'s (joonis 4A, E, H). Märkimisväärselt rohkelt esineb NEGR1+ rakke CA3 piirkonna lõpuosas, mis suubub hammaskääru vahele (joonis 4A, H). Samuti esinevad üksikud rakud hammaskääru molekulaarkihis ja polümorfses




Joonis 3. **NEGR1 ja PV lokalisatsioon roti aju somatosensoorses koores**. NEGR1 (roheline) ja PV (punane) immunohistokeemiline analüüs roti aju koronaallõigul somatosensoorses koores. DNA märgistatud H33258-ga (sinine). (A-C) NEGR1 ja PV lokalisatsioon somatosensoorses korteksis, kus NEGR1 ekspresseerub ühtlaselt kõigis korteksi kihtides (tähistatud I-VI), kuid PV peamiselt III kihis ja vähesemal määral ka II ja IV. Valge ruuduga tähistatud piirkond, mida näidatud suuremalt D-F. (D-F) Kõik PV+ rakud ekspresseerivad ka NEGR1, kuid mitte kõik NEGR+ rakud ei ekspresseeri PV. Suurem nool viitab rakukehale, väiksem nool rakujätkele. Mõõtkavad: (A-C) 250 µm, (D-F) 20 µm.

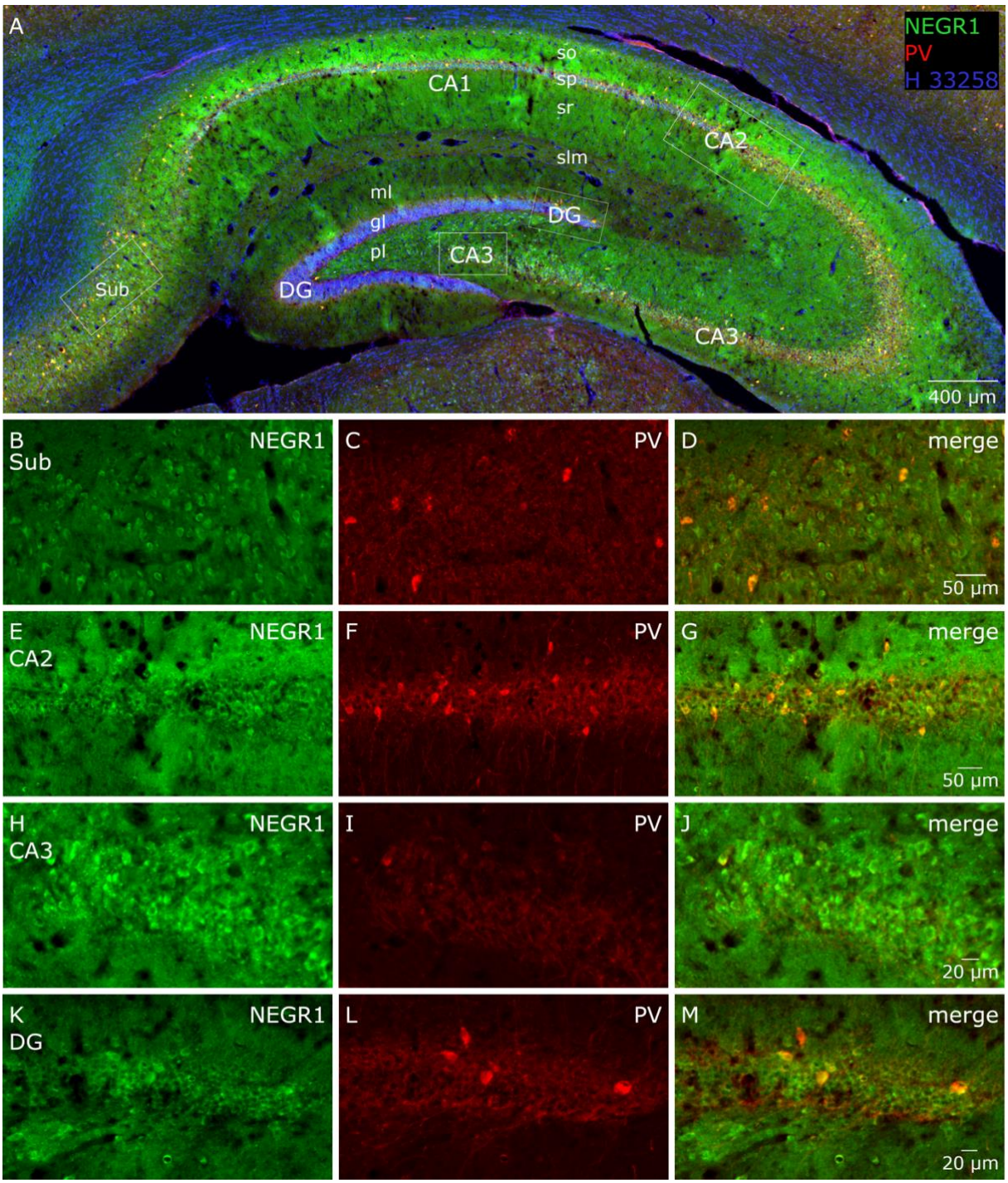
kihis (joonis 4A, K). Sarnast mustrit järgib ka PV, ehkki erinevusena NEGR1-st esineb Ammoni sarve püramidaalkihis lisaks suurtele, jätketega PV+ rakkudele ka positiivselt värvunud jätketest moodustunud tihe võrgustik (joonis 4F, I). Sealjuures ekspresseerivad enamik PV+ rakke NEGR1 (joonis 4D, G, J, M). Ka *subiculum*'is on laialdane NEGR1 ja PV ekspressioon ning PV+ rakud ekspresseerivad ka NEGR1 (joonis 4A, B-D).

*Amügdala*

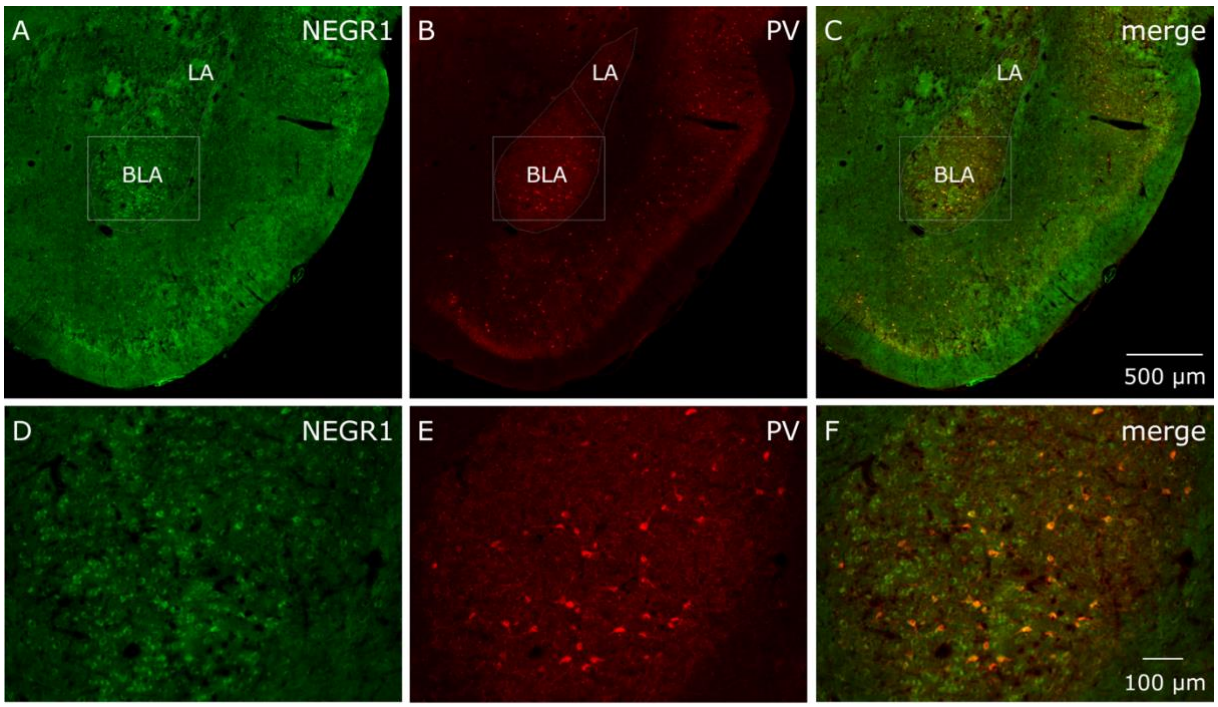
NEGR1 on amügdala rakkudes kõrgelt ekspresseerunud ning lokalisatsiooni signaal on täheldatav ka PV+ rakkudes (joonis 5). Nii NEGR1 kui PV on märgatavalt rohkem ekspresseerunud basolateraalses amügdalas (joonis 5, BLA), kuid esinevad ka lateraalses amügdalas (joonis 5, LA).

*Taalamus*

Järgnevalt vaadeldi täpsemalt NEGR1 lokalisatsiooni PV+ rakkudes taalamuse piirkonnas. Katsete tulemusena leiti, et NEGR1 on kõrgelt ekspresseerunud kogu taalamuses (joonis 6A).




Joonis 4. **NEGR1 ja PV lokalisatsioon roti hipokampuses.** NEGR1 (roheline) ja PV (punane) immunohistokeemiline analüüs roti aju koronaallõigul hipokampuse piirkonnast. DNA märgistatud H33258-ga (sinine). (A) NEGR1 ja PV lokalisatsioon erinevates hipokampuse piirkondades. (B-D) *Subiculum*'is (Sub) esineb rohkelt NEGR1-immunopositiivseid rakke, millest väike osa on ka PV+. (E-G) Ammoni välja CA2 piirkonnas paiknevad NEGR1 ja PV püramidaalkihi rakkudes. PV+ rakud ekspresseerivad ka NEGR1. (H-J) Ammoni välja CA3 piirkonnas on NEGR1 kõrgelt ekspresseeritud rakukehades, samas lokaliseerub PV peamiselt rakujätketes. (K-M) Hammaskääru (DG) granulaarkihis on palju NEGR+ rakukehi. PV ekspresseerub nii rakujätketes kui üksikutes rakukehades. PV+ rakud ekspresseerivad ka NEGR1. Lühendid: so – *stratum oriens*, sp – *stratum pyramidale* (püramidaalkiht), sr – *stratum radiatum*, ml – molekulaarkiht, gl – granulaarkiht, pl – polümorfne kiht. Mõõtkavad: (A) 400 µm, (B-D) 50 µm, (E-G) 50 µm, (H-J) 20 µm, (K-M) 20 µm.

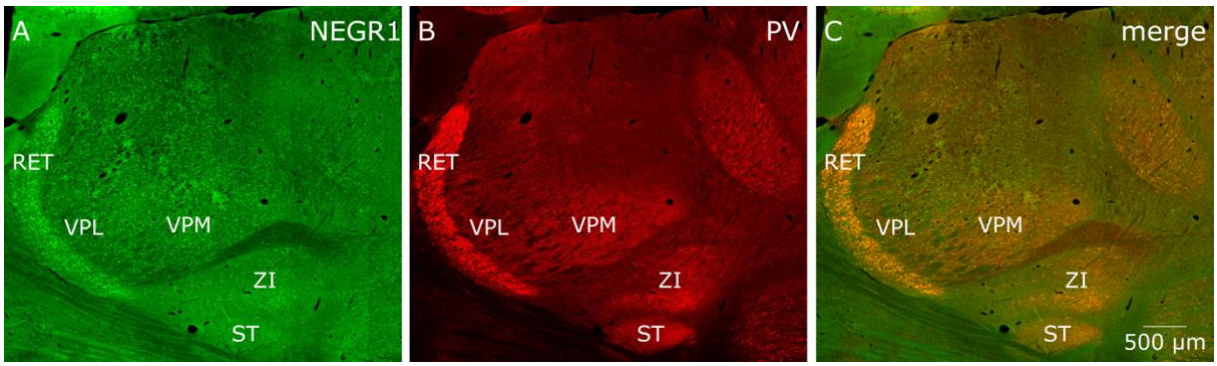



Joonis 5. **NEGR1 ja PV lokalisatsioon roti amügdalas.** NEGR1 (roheline) ja PV (punane) immunohistokeemiline analüüs roti aju koronaallõigul amügdala piirkonnast. (A-C) Amügdalas nähtub nii NEGR1 kui PV ekspressiooni. Kumbki esineb kõrgeimal tasemel basolateraalses amügdalas (BLA), kuid ka lateraalses amügdalas (LA). Valge ruut tähistab piirkonda, mis on suurendatud D-F. (D-F) NEGR1 ja PV lokalisatsioon basolateraalses amügdalas. Esineb kõrge NEGR1 ekspressioon. PV+ rakud ekspresseerivad ka NEGR1. Mõõtkavad: (A-C) 500 µm, (D-F) 100 µm.

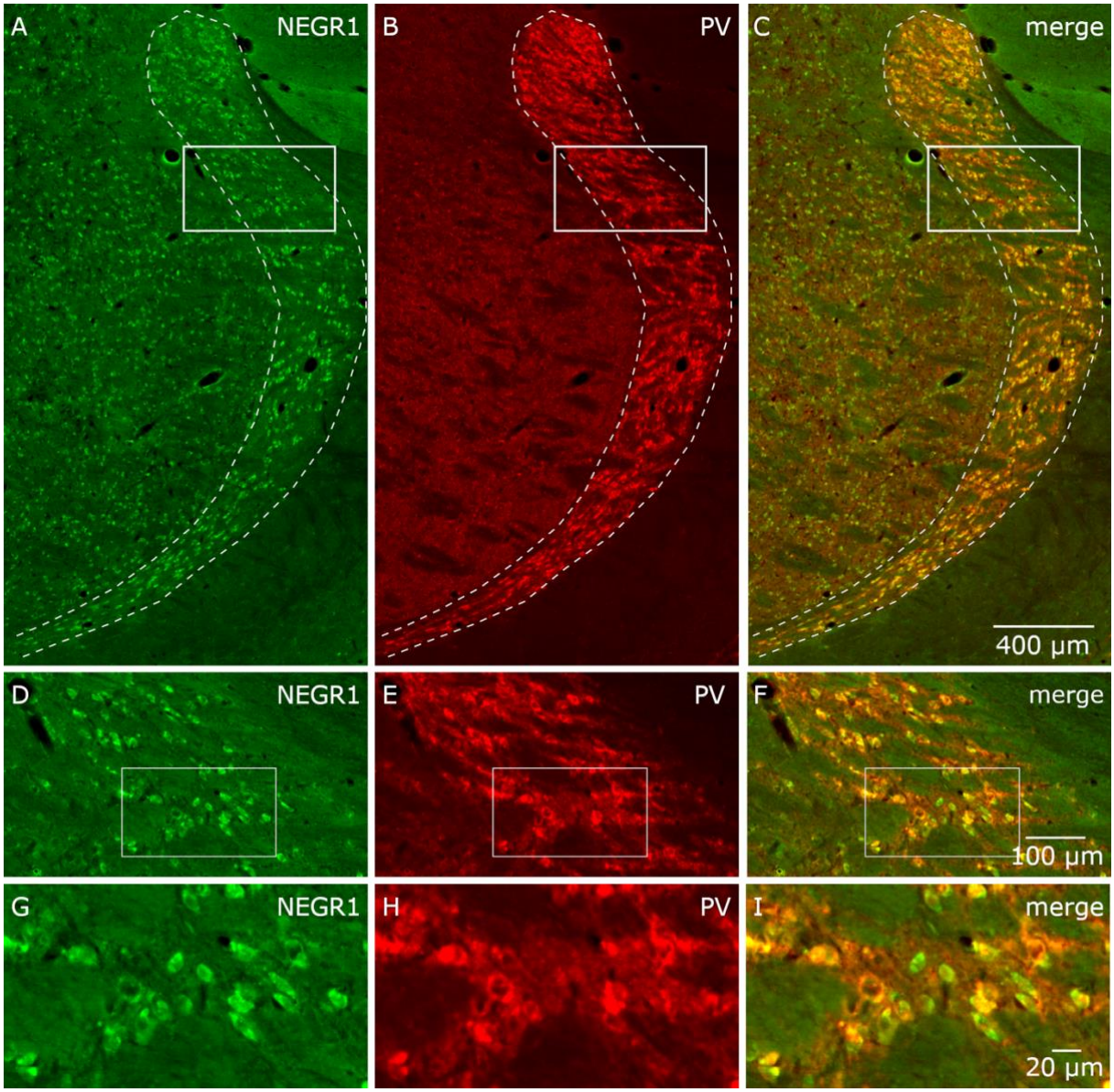
Eriti intensiivne signaal detekteeriti retikulaartuumas (joonis 6A, 7A, D, G). Ka PV esineb mitmetes taalamuse piirkondades (joonis 6B), ekspresseerudes samuti tugevaimalt retikulaartuumas (6B, 7B, E, H). PV+ rakujätkeid ning väiksemaid rakukehi esineb rohkelt ka ventraalses posteromediaalses ja ventraalses posterolateraalses taalamuses, lisaks ka *zona incerta*'s ja subtaalamuse subtalaamilises tuumas (joonis 6B). Kõigis neis piirkondades ekspresseerivad PV+ rakud ka NEGR1 või on NEGR1-immunopositiivsed rakud ümbritsetud PV+ jätkete poolt (joonis 6C, 7C, F, I).

*Väikeaju*

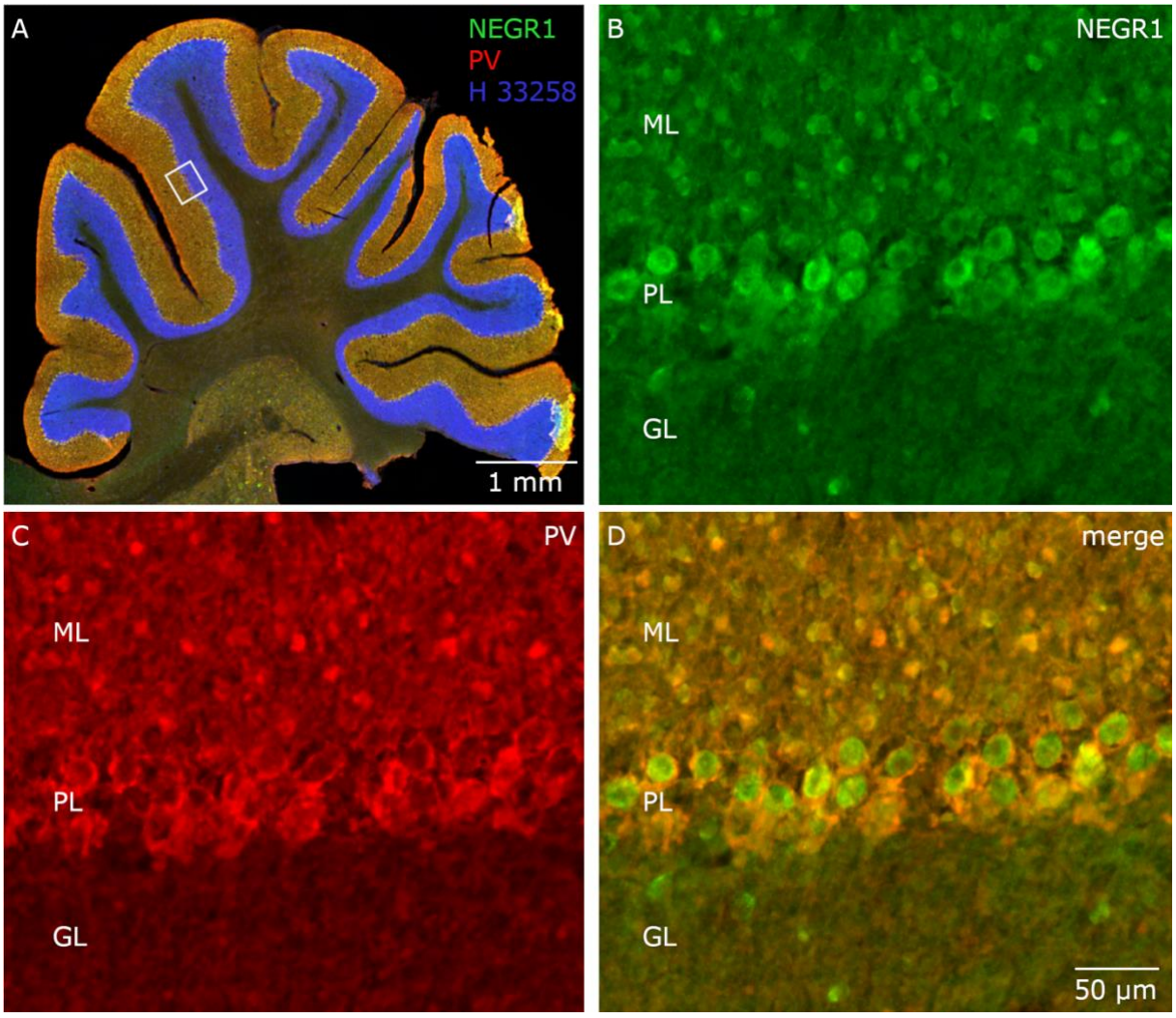
Lisaks vaadeldi NEGR1 ja PV kolokalisatsiooni väikeajus. Nii NEGR1 kui PV on väikeajus tugevalt ekspresseerunud ja paiknevad molekulaarkihi rakkudes ning Purkinje rakkudes (joonis 8A-D). Granulaarkihis leidub üksikuid NEGR1+ rakke (joonis 8B). Kogu granulaarkihi ulatuses esinevad PV+ jätked, sealjuures mõne väga üksiku välja joonistuva rakukehaga (joonis 8C).




Joonis 6. **NEGR1 ja PV lokalisatsioon roti taalamuse erinevates piirkondades.** NEGR1 (roheline) ja PV (punane) immunohistokeemiline analüüs roti aju sagitaallõigul taalamuse piirkonnast. (A) NEGR1+ rakud esinevad kõikjal taalamuses, kuid kõrgeimal määral retikulaartuumas (RET). (B) PV signaal on samuti tugevaim retikulaartuumas, kuid esineb ka ventraalses posteromediaalses (VPM) ja ventraalses posterolateraalses (VPL) taalamuses, *zona incerta*'s (ZI) ja subtaalamuse subtalaamilises tuumas (ST). (C) Kõrgema PV ekspressiooniga piirkondades esineb ka NEGR1. Mõõtkavad: (A-C) 500 µm.



Joonis 7 (eelmisel leheküljel all). **NEGR1 ja PV lokalisatsioon roti taalamuse retikulaartuumas**. NEGR1 (roheline) ja PV (punane) immunohistokeemiline analüüs roti aju koronaallõigul taalamuse retikulaartuumas. (A-C) Nii NEGR1 kui PV ekspresseeruvad taalamuses kõige kõrgemal määral retikulaartuumas (ümbritsetud punktiirjoonega). Valge ruut tähistab piirkonda, mis on suurendatud D-F. (D-F) Valge ruut tähistab piirkonda, mis on suurendatud G-I. (G-I). Kõik PV+ rakud ekspresseerivad ka NEGR1, samas kui leidub NEGR1+ rakke, mis PV ei ekspresseeri. Mõõtkavad: (A-C) 400 µm, (D-F) 100 µm, (G-I) 20 µm.




Joonis 8. **NEGR1 ja PV kolokalisatsioon roti väikeaju koores**. NEGR1 (roheline) ja PV (punane) immunohistokeemiline analüüs roti aju sagitaallõigul väikeaju piirkonnast. DNA märgistatud H33258-ga (sinine). (A) Roti väikeaju. Valge ruut tähistab piirkonda, mida on esitletud B-D. (B-D) NEGR1 ja PV kolokaliseeruvad nii molekulaarkihis (ML) kui Purkinje rakkude kihis (PL). Granulaarkihis (GL) esinevad üksikud NEGR1+ rakud. Mõõtkavad: (A) 1 mm, (B-D) 50 µm.

2.3.2. NEGR1 ja PV kolokalisatsiooni kvantifitseerimine roti hipokampuses

Kvantifitseerimise tulemusel selgus, et *subiculum*'is ekspresseerib keskmiselt 94%, Ammoni sarve CA1-CA3 piirkondades 96% ja hammaskäärus 88% PV+ rakkudest ka NEGR1. Kogu

hipokampuse ulatuses (mitte eristades *subiculum*'i, Ammoni sarve väljade ja hammaskääru PV+ rakke) on keskmiselt 93% PV+ rakkudest ka NEGR1-immunopositiivsed.

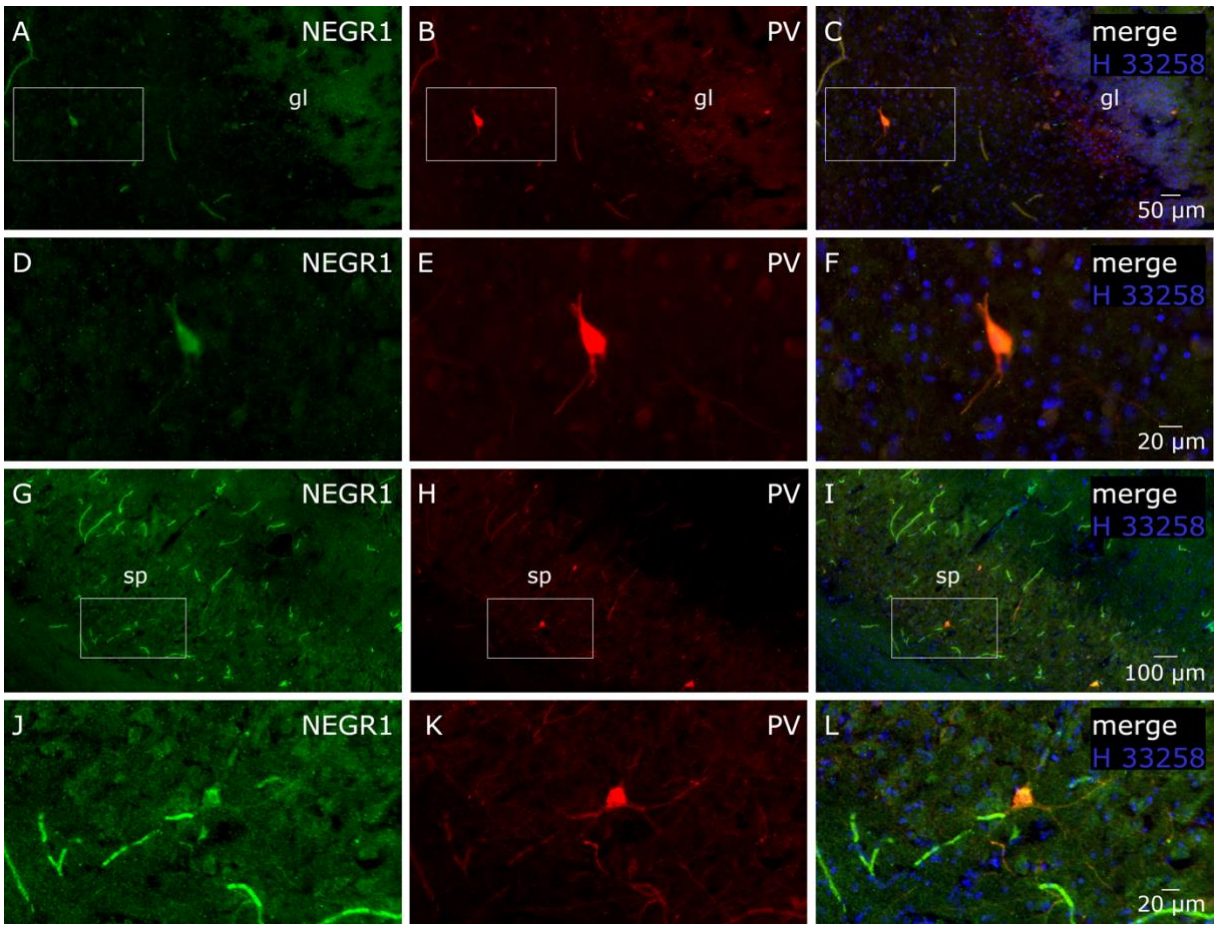
### 2.3.3. NEGR1 ja PV kolokalisatsioon inimese hipokampuses

Töö teine eesmärk oli iseloomustada NEGR1 lokalisatsiooni inimese hipokampuse piirkonna PV+ rakkudes. Immunohistokeemilise analüüsi tulemusena selgus, et PV lokaliseerub inimese hipokampuses sarnaselt roti hipokampusele: lisaks üksikutele selgelt välja joonistunud ja pikkade jätketega PV+ neuronitele hipokampuse Ammoni sarve väljades (CA1-CA3), hammaskäärus ja *subiculum*'is, esinevad Ammoni sarve püramidaalkihis ja hammaskääru granulaarkihis ka PV-immunopositiivsed rakujätked (joonis 9B, E, H, K). CA1-CA3 piirkonna püramidaalkihis (joonis 9G, J) ja hammaskääru granulaarkihis (joonis 9A) võib eristada ka nõrgalt välja joonistuvaid NEGR1+ rakke. Uuritavates hipokampuse piirkondades olid kõik PV+ rakud ka NEGR1+ (joonis 9C, F, I, L).

## 2.4. Arutelu

Bakalaureusetöös näidati närvirakkude adhesioonimolekuli NEGR1 ja GABA-ergiliste interneuronite markeri parvalbumiini kolokalisatsiooni roti erinevates ajupiirkondades (ajukoor, hipokampus, amügdala, taalamus, väikeaju) ja inimese hipokampuses. NEGR1 oli ekspresseeritud kõigis vaadeldud ajupiirkondades ning lokaliseerus samades rakkudes, kus ka parvalbumiin. Praktiliselt kõik PV+ neuronid ekspresseerisid NEGR1 nii roti kui inimese ajus, samas leidus ka rohkelt NEGR1+ rakke, mis PV ei ekspresseerinud. Kvantitatiivse analüüsi käigus leiti, et ~93% PV+ neuronitest roti hipokampuses ekspresseeris ka NEGR1.

Bakalaureusetöö tulemused ja varasem kirjandus (Singh jt, 2019) viitavad, et NEGR1 mõju psüühikahäirete väljakujunemisele võib vähemalt osaliselt olla vahendatud PV+ neuronite poolt. Immunohistokeemilise analüüsi tulemusena leiti, et NEGR1 paikneb muuhulgas rakkudes, mis ekspresseerivad PV. Kuna varasemalt on näidatud, et NEGR1 kujundab dendriitide morfoloogiat ja sünapside teket (Hashimoto jt, 2008; Pischedda jt, 2014), on alust arvata, et NEGR1 võib mõjutada ka PV+ neuronite arengut. Töö tulemuste valguses võib hüpotiseerida, et polümorfismid *NEGR1* geenis võivad viia kõrvalekalleteni PV ekspressioonis, ehkki sellise seose kinnitamiseks tuleks teha eraldi uuringuid. Ebatüüpiline PV ekspressioon ajukoores, hipokampuses ja juttkehas on seotud paljude psüühikahäiretega,




Joonis 9. **NEGR1 ja PV kolokalisatsioon inimese hipokampuses.** NEGR1 (roheline) ja PV (punane) immunohistokeemiline analüüs inimese aju koronaallõigul hipokampuse piirkonnast. DNA märgistatud H33258-ga (sinine). (A-C) NEGR1 ja PV lokalisatsioon hammaskäärus. Valge ruut tähistab piirkonda, mis on suurendusega näidatud D-F. (D-F) PV+ rakk hammaskäärus ekspresseerib ka NEGR1. (G-H) NEGR1 ja PV lokalisatsioon Ammoni sarve CA2 piirkonnas. Valge ruut tähistab piirkonda, mis on suurendusega näidatud J-L. (J-L) PV+ rakk CA2 piirkonna püramidaalkihis ekspresseerib ka NEGR1. Lühendid: gl – granulaarkiht, sp – *stratum pyramidale* (püramidaalkiht). Mõõtkavad: (A-C) 50 µm, (D-F) 20 µm, (G-I) 100 µm, (J-L), 20 µm.

nende hulgas skisofreenia, sõltuvushäirete, autismispektri häirete, Alzheimeri tõve, depressiooni ja stressihäiretega (Nahar jt, 2021). Samade häiretega on seostatud ka polümorfisme *NEGR1* geenis, transkripti tasemes või NEGR1 valgu hulgas (Karis jt, 2018; Li ja De Muynck, 2021; Maccarrone jt, 2013; Ni jt, 2018; Pinto jt, 2010; Zhou jt, 2020).

Bakalaureusetöös näidati, et NEGR1 ja PV ekspresseeruvad olulisel määral taalamuse retikulaartuuma rakkudes ning NEGR1 esineb taalamuse PV+ neuronites. Taalamuse retikulaartuum on GABA-ergiline tuum, mis saab sisendeid nii korteksist, taalamusest kui kõigist tajukeskustest. Retikulaartuum inhibeerib taalamuse neuroneid ja sellega on tal oluline roll taalamuse ja korteksi vahelise informatsioonivahetuse reguleerijana (Pinault, 2004). Taalamuse retikulaartuum on oluline ka skisofreenia neurobioloogias (Ferrarelli ja Tononi,

2011). Steullet jt (2018) näitasid, et skisofreenia ja bipolaarse häirega patsientidel on taalamuse retikulaartuumas vähenenud PV+ neuronite arv. Samuti põhjustavad häired retikulaartuuma PV+ neuronite aktiivsuses skisofreeniale tüüpilisi eripärasid ajulainete delta ja gamma võnkesageduses ning une elektrofüsioloogilistes näitajates (Thankachan jt, 2019). Siiski ei pruugi NEGR1 olla ainuke potentsiaalne retikulaartuuma PV+ neuronipopulatsiooni mõjutaja – häirunud PV ekspressiooni taalamuse retikulaartuumas on seostatud näiteks oksüdatiivse stressiga (El Khoueiry jt, 2022; Steullet jt, 2018; Zhu jt, 2021).

Psüühikahäiretega on seostatud ka teiste käesolevas töös uuritud ajupiirkondade ebatüüpilist PV ekspressiooni. Ajukoore PV+ neuronite eripärasid on seostatud skisofreenia, autismispektri häiretega, sõltuvushäirete, stressi ja ärevusega (Nahar jt, 2021). Vähenenud PV+ neuronite arvu hipokampuses on näidatud skisofreeniapatsientidel (Z. Zhang jt, 2002) ja skisofreenia ning Alzheimeri tõve loommudelitel (Abdul-Monim jt, 2007; Harte jt, 2007; Jenkins jt, 2009; Lodge jt, 2009; Veerasakul jt, 2016; Zallo jt, 2018). PV+ neuronid amügdalas mängivad rolli hirmu õppimise spetsiifiliste aspektide (Krabbe jt, 2018; Lucas jt, 2016; Yau jt, 2021) ja ärevuskäitumise juures (Hale jt, 2010; Urakawa jt, 2013). Kõrvalekaldeid väikeaju PV ekspressioonis on samuti seostatud skisofreenia (Vidal-Domènech jt, 2020) ning autismispektri häiretega (Soghomonian jt, 2017; Wöhr jt, 2015).

Singh jt (2019) näitasid *Negr1*-/- puudulikel hiirtel PV+ rakkude arvu vähenemist hipokampuses. Autorid ei raporteerinud PV+ rakkude arvu vähenemist muudes ajupiirkondades, kuid käesoleva töö tulemuste valguses võib NEGR1 mõjutada ka muude piirkondade PV+ neuronite arengut. Seetõttu võiks tulevase uurimisteemana käsitleda PV+ neuronite arvu ka muudes *Negr1*-puudulike organismide ajupiirkondades, sealjuures ajukoores, amügdalas, taalamuse retikulaartuumas (või kogu taalamuses) ja väikeajus ning muudes, käesolevas töös lähemalt käsitlemata piirkondades. Varasemas kirjanduses on viidatud NEGR1 stereotaktilisele manustamisele elusloomade hüpotaalamusse, mille tagajärjel muutus nende toitumiskäitumine (Venkannagari jt, 2020). Tulevastes uuringutes võiks käsitleda ka seda, kuidas NEGR1 manustamine erinevas arengujärgus *Negr1*-/- organismidele muudab PV+ neuronite ekspressiooni ja kas seeläbi on võimalik taastada normaalne PV fenotüüp.

Vaid väike osakaal kõigist NEGR1+ rakkudest roti ajus ekspresseeris PV. Seega oleks tulevikus põhjust uurida NEGR1 kolokalisatsiooni ka teiste markeritega. On teada, et NEGR1 ekspresseerub nii neuronitel kui gliiarakkudel (Sharma jt, 2015; Y. Zhang jt, 2014, 2016) ning

lisaks seostele GABA-ergilise süsteemiga on varasemates töödes näidatud NEGR1 ekspressiooni hüpotaalamuse oksütotsiini- ja vasopressiinineuronitel (Miyata jt, 2000; Miyata, Taguchi, jt, 2003). Lisaks on NEGR1 tõenäoliselt seotud monoaminergilise süsteemiga: näidatud on serotoniini- või noradrenaliinisüsteemi mõjutavate antidepressantide mõju *NEGR1* ekspressioonile (Carboni jt, 2020). Seega võib NEGR1 psüühikahäireid ja metabolismi mõjutada ka teiste spetsiifiliste neuronipopulatsioonide vahendusel.

Töö puuduseks võib lugeda väikest valimit ja ebapiisavaid kvantifitseerimisvahendeid. NEGR1 ja PV kolokalisatsiooni kirjeldamine roti ajus põhines kahe isendi ajukoe uurimisel, mis annab küll esialgseid andmeid, kuid on ebapiisav lõplike järelduste tegemiseks. Siiski on NEGR1 ja PV ekspressiooni töös käsitletud ajupiirkondades valideeritud ka teistes töörühma uurimisprojektides. Üldistusjõu suurendamiseks tuleks eksperimenti siiski korrata suuremal valimil. Samuti saaks laiendada uuritavaid ajupiirkondi, sest lisaks töös käsitletud piirkondadele kolokaliseerusid NEGR1 ja PV ka mujal ajus, sealhulgas nii dorsaalses kui ventraalses juttkehas, keskajus ja ajutüves. Sealjuures tuleks edaspidises töös lisaks NEGR1 ja PV ekspressiooni ja kolokalisatsiooni kirjeldamisele neid tulemusi ka kvantifitseerida. Käesolevas töös kvantifitseeriti see, kui suur osa hipokampuse PV+ rakkudest ekspresseerib ka NEGR1. Töö käigus selgus, et kuigi enamasti oli võimalik anda objektiivne hinnang (jah/ei), kas iga konkreetne PV+ rakk annab ka NEGR1 spetsiifilist signaali, siis harvadel juhtudel esines raskusi NEGR1 signaali hindamisel, kuna NEGR1 annab kohati hägusamat taust-signaali. Seetõttu on oluline kvantifitseerimismeetodit täiustada, kasutades signaali intensiivsuse hindamiseks vastavat programmi, mille abil kujuneks objektiivne hinnang, kas signaal konkreetses rakus on kõrge, keskmine, madal või alalävine. Edaspidistes uuringutes võiks selgitada ka seda, kui suur osakaal NEGR1+ rakkudest ekspresseerib PV.

Lisaks värvingule roti ajukoes uuriti NEGR1 ja PV kolokalisatsiooni ka inimese hipokampuses. Inimese ajukoe immunohistokeemilisel uurimisel fluorestsentsmärgisega sekundaarsete antikehadega on takistuseks inimese ajukoe endogeenne autofluorestsents, mis raskendab spetsiifilise, uuritava signaali eristamist mittespetsiifilisest fluorestsentsist. Ka lipofiilse värvi sudaanmustaga värvimine ei eemaldanud kogu ebaspetsiifilist signaali, nagu selgus negatiivsest kontrollist. Võrreldes roti ajukoe värvinguga ei eristunud NEGR1+ rakud Ammoni sarve püramidaalkihis ja hammaskääru granulaarkihis nii selgelt, seda ka juhul, kui suurendati antikeha kontsentratsiooni ja pikendati inkubatsiooniaega primaarsete antikehade lahuses (n=1, andmeid pole näidatud). Siiski näitasid PV+ rakud ka NEGR1 signaali, ehkki võrreldes roti ajukoega olid ka need rakud nõrgemalt NEGR1-immunopositiivsed. Ehkki

kasutatud primaarne antikeha oli inimese organismi spetsiifiline, saaks edaspidises töös tulemusi kinnitada teise tootja primaarse antikehaga. Ka inimese puhul oleks oluline järgmisena vaadata NEGR1 ja parvalbumiini koos esinemist teistes ajuosades, eelkõige taalamuse retikulaartuumas, kus käesoleva töö tulemuste põhjal võiks samuti eeldada NEGR1 ja PV kolokalisatsiooni.

Bakalaureusetöö tulemusena näidati, et parvalbumiini interneuronid roti ja inimese ajukoes ekspresseerivad närvirakkude adhesioonimolekuli NEGR1. See lubab oletada, et NEGR1 mängib rolli PV interneuronite arengul ja talitlemisel, ehkki sellise seose kinnitamiseks oleksid vajalikud täiendavad uuringud. NEGR1 ja PV on seotud paljude psühhiaatriliste häiretega, mis osaliselt kattuvad. Bakalaureusetöö tulemused on oluline lisa-tõendmaterjal hüpoteesile, et NEGR1 võib oma mõjusid psüühikahäiretele avaldada PV vahendusel. Teave nende kahe molekuli kolokalisatsiooni mustrist on aluseks edasistele uuringutele NEGR1 ja parvalbumiini koostoime täpsema molekulaarse mehhanismi selgitamiseks.

## KOKKUVÕTE

Bakalaureusetöö eesmärgiks oli selgitada seoseid IgLON superperekonna liikme, närvirakkude adhesioonimolekuli NEGR1 ja GABA-ergiliste parvalbumiini ekspresseerivate interneuronite vahel. Selleks tehti roti ajukoel ja inimese hipokampusel immunohistokeemilised värvingud.

Töö tulemusena selgus, et NEGR1 ja PV kolokaliseeruvad kõigis uuritud roti ajupiirkondades (ajukoor, hipokampus, amügdala, taalamus, väikeaju). Märkimisväärne oli NEGR1 ja PV kolokalisatsioon taalamuse retikulaartuumas. Suur enamik PV+ rakkudest ekspresseeris NEGR1, samas kui vaid väike osakaal kõigist NEGR1+ rakkudest ekspresseerisid ka parvalbumiini. Kolokalisatsiooni kvantifitseerimine roti hipokampuses andis tulemuseks, et ~93% PV+ rakkudest olid ka NEGR1-immunopositiivsed, ehkki tulevikus tuleks kvantifitseerimismeetodit täiustada.

NEGR1 ja PV kolokalisatsiooni uuriti ka inimese hipokampuses. Inimese hipokampuses leidus laialdane PV ekspressioon, kuid NEGR1 signaal ei olnud nii selge kui roti ajus. Siiski näitasid kõik PV+ neuronid ka NEGR1 ekspressiooni. Tulemuste kinnitamiseks tuleks värvingut korrata, kasutades mõne teise tootja primaarset antikeha.

Bakalaureusetöö tulemused koos varasema kirjandusega lubavad järeldada, et NEGR1-l võib olla roll PV+ neuronite arengu suunamisel. Häireid PV ekspressioonis erinevates ajupiirkondades on seostatud paljude psüühikahäiretega, millest paljusid on seostatud ka NEGR1-ga. PV võib vähemalt osaliselt olla vahendajaks, mille läbi NEGR1 psüühikale mõju avaldab.

**RESÜMEE / SUMMARY**

## Parvalbumin interneurons in the rat brain and human hippocampus express neural cell adhesion molecule NEGR1

Liisi Promet

Summary

NEGR1 is a neural cell adhesion molecule belonging to the IgLON superfamily. NEGR1 is important in shaping the overall structure of the nervous system and, more specifically, plays a role in synapse formation and dendritic arborization of neurons. GWAS studies, animal studies and studies with clinical patients have associated NEGR1 with both psychiatric diseases, such as depression, schizophrenia and autism spectrum disorders, and obesity.

Recent works have associated NEGR1 with the GABAergic system. A reduced number of parvalbumin (PV) neurons, a subtype of inhibitory GABAergic interneurons, was shown in the hippocampus of *Negr1*-/- mice. NEGR1 has also been shown to play a role in the synaptic targeting of GAD65, an enzyme present in GABAergic cells that is responsible for converting gluatamate into GABA. The aim of the present work was to further elucidate the relations between NEGR1 and PV interneurons.

Immunohistochemical stainings of both the rat brain and the human hippocampus were performed. Colocalization of NEGR1 and PV was seen in several areas of the rat brain, including the cortex, hippocampus, amygdala, thalamus and cerebellum. Importantly, colocalization of NEGR1 and PV was observed in the reticular nucleus of the thalamus, a major regulator of corticothalamic information flow. The majority of PV+ interneurons also expressed NEGR1, whereas only a fraction of the NEGR1+ cells were also PV-immunopositive. Quantification of the results showed that 93% of PV+ neurons in the rat hippocampus also expressed NEGR1, although more precise quantification methods should be utilized in future studies. Expression of NEGR1 was also evident in the PV+ interneurons of the human hippocampus.

Together with previous findings, the results of the current work imply that NEGR1 could shape the development and functioning of PV+ interneurons, although future studies are needed to elucidate the molecular mechanisms behind their interactions. NEGR1 and PV are both implicated in a range of psychiatric disorders that partially overlap. The effect of NEGR1

on the development of psychiatric disorders may be mediated, at least in part, by fast-spiking parvalbumin interneurons.

**KIRJANDUSE LOETELU**

Abdul-Monim, Z., Neill, J. C., & Reynolds, G. P. (2007). Sub-chronic psychotomimetic phencyclidine induces deficits in reversal learning and alterations in parvalbumin-immunoreactive expression in the rat. *Journal of Psychopharmacology*, *21*(2), 198–205. https://doi.org/10.1177/0269881107067097

Antonoudiou, P., Tan, Y. L., Kontou, G., Upton, A. L., & Mann, E. O. (2020). Parvalbumin and Somatostatin Interneurons Contribute to the Generation of Hippocampal Gamma Oscillations. *The Journal of Neuroscience*, *40*(40), 7668–7687. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0261-20.2020

Bartholome, O., de la Brassinne Bonardeaux, O., Neirinckx, V., & Rogister, B. (2020). A Composite Sketch of Fast-Spiking Parvalbumin-Positive Neurons. *Cerebral Cortex Communications*, *1*(1), tgaa026. https://doi.org/10.1093/texcom/tgaa026

Berchtold, M. W., Celio, M. R., & Heizmann, C. W. (1985). Parvalbumin in Human Brain. *Journal of Neurochemistry*, *45*(1), 235–239. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1985.tb05498.x

Berndt, S. I., Gustafsson, S., Mägi, R., Ganna, A., Wheeler, E., Feitosa, M. F., Justice, A. E., Monda, K. L., Croteau-Chonka, D. C., Day, F. R., Esko, T., Fall, T., Ferreira, T., Gentilini, D., Jackson, A. U., Luan, J., Randall, J. C., Vedantam, S., Willer, C. J., … Ingelsson, E. (2013). Genome-wide meta-analysis identifies 11 new loci for anthropometric traits and provides insights into genetic architecture. *Nature Genetics*, *45*(5), 501–512. https://doi.org/10.1038/ng.2606

Boender, A. J., Gestel, M. A. van, Garner, K. M., Luijendijk, M. C. M., & Adan, R. A. H. (2014). The obesity-associated gene Negr1 regulates aspects of energy balance in rat hypothalamic areas. *Physiological Reports*, *2*(7), e12083. https://doi.org/10.14814/phy2.12083

Boender, A. J., van Rozen, A. J., & Adan, R. A. H. (2012). Nutritional state affects the expression of the obesity-associated genes Etv5, Faim2, Fto, and Negr1. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, *20*(12), 2420–2425. https://doi.org/10.1038/oby.2012.128

Braak, E., Strotkamp, B., & Braak, H. (1991). Parvalbumin-immunoreactive structures in the hippocampus of the human adult. *Cell and Tissue Research*, *264*(1), 33–48. https://doi.org/10.1007/BF00305720

Buck, C. A. (1992). Immunoglobulin superfamily: Structure, function and relationship to other receptor molecules. *Seminars in Cell Biology*, *3*(3), 179–188. https://doi.org/10.1016/s1043-4682(10)80014-5

Carboni, L., Pischedda, F., Piccoli, G., Lauria, M., Musazzi, L., Popoli, M., Mathé, A. A., & Domenici, E. (2020). Depression-Associated Gene Negr1-Fgfr2 Pathway Is Altered by Antidepressant Treatment. *Cells*, *9*(8), 1818. https://doi.org/10.3390/cells9081818

Cardin, J. A., Carlén, M., Meletis, K., Knoblich, U., Zhang, F., Deisseroth, K., Tsai, L.-H., & Moore, C. I. (2009). Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses. *Nature*, *459*(7247), 663–667. https://doi.org/10.1038/nature08002

Casey, J. P., Magalhaes, T., Conroy, J. M., Regan, R., Shah, N., Anney, R., Shields, D. C., Abrahams, B. S., Almeida, J., Bacchelli, E., Bailey, A. J., Baird, G., Battaglia, A., Berney, T., Bolshakova, N., Bolton, P. F., Bourgeron, T., Brennan, S., Cali, P., … Ennis, S. (2012). A novel approach of homozygous haplotype sharing identifies candidate genes in autism spectrum disorder. *Human Genetics*, *131*(4), 565–579. https://doi.org/10.1007/s00439-011-1094-6

Celio, M. R. (1986). Parvalbumin in most gamma-aminobutyric acid-containing neurons of the rat cerebral cortex. *Science (New York, N.Y.)*, *231*(4741), 995–997. https://doi.org/10.1126/science.3945815

Celio, M. R. (1990). Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience*, *35*(2), 375–475. https://doi.org/10.1016/0306-4522(90)90091-h

Chen, J., Lui, W.-O., Vos, M. D., Clark, G. J., Takahashi, M., Schoumans, J., Khoo, S. K., Petillo, D., Lavery, T., Sugimura, J., Astuti, D., Zhang, C., Kagawa, S., Maher, E. R., Larsson, C., Alberts, A. S., Kanayama, H., & Teh, B. T. (2003). The t(1;3) breakpoint-spanning genes LSAMP and NORE1 are involved in clear cell renal cell carcinomas. *Cancer Cell*, *4*(5), 405–413. https://doi.org/10.1016/S1535-6108(03)00269-1

Cheung, C. Y. Y., Tso, A. W. K., Cheung, B. M. Y., Xu, A., Ong, K. L., Fong, C. H. Y., Wat, N. M. S., Janus, E. D., Sham, P. C., & Lam, K. S. L. (2010). Obesity susceptibility genetic variants identified from recent genome-wide association studies: Implications in a chinese population. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *95*(3), 1395–1403. https://doi.org/10.1210/jc.2009-1465

Cho, T. M., Hasegawa, J., Ge, B. L., & Loh, H. H. (1986). Purification to apparent homogeneity of a mu-type opioid receptor from rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *83*(12), 4138–4142. https://doi.org/10.1073/pnas.83.12.4138

Courchesne, E. (2002). Abnormal early brain development in autism. *Molecular Psychiatry*, *7*(2), S21–S23. https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001169

Cox, D. A., Gottschalk, M. G., Wesseling, H., Ernst, A., Cooper, J. D., & Bahn, S. (2016). Proteomic systems evaluation of the molecular validity of preclinical psychosis models compared to schizophrenia brain pathology. *Schizophrenia Research*, *177*(1), 98–107. https://doi.org/10.1016/j.schres.2016.06.012

Dall'Aglio, L., Lewis, C. M., & Pain, O. (2021). Delineating the Genetic Component of Gene Expression in Major Depression. *Biological Psychiatry*, *89*(6), 627–636. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2020.09.010

Dennis, E. L., Jahanshad, N., Braskie, M. N., Warstadt, N. M., Hibar, D. P., Kohannim, O., Nir, T. M., McMahon, K. L., de Zubicaray, G. I., Montgomery, G. W., Martin, N. G., Toga, A. W., Wright, M. J., & Thompson, P. M. (2014). Obesity gene NEGR1

associated with white matter integrity in healthy young adults. *NeuroImage*, *102*, 548–557. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2014.07.041

Dunn, G. A., Loftis, J. M., & Sullivan, E. L. (2020). Neuroinflammation in psychiatric disorders: An introductory primer. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, *196*, 172981. https://doi.org/10.1016/j.pbb.2020.172981

Ferguson, B. R., & Gao, W.-J. (2018). PV Interneurons: Critical Regulators of E/I Balance for Prefrontal Cortex-Dependent Behavior and Psychiatric Disorders. *Frontiers in Neural Circuits*, *12*. https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fncir.2018.00037

Fornito, A., & Harrison, B. (2012). Brain Connectivity and Mental Illness. *Frontiers in Psychiatry*, *3*. https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpsyt.2012.00072

Funatsu, N., Inoue, T., & Nakamura, S. (2004). Gene Expression Analysis of the Late Embryonic Mouse Cerebral Cortex Using DNA Microarray: Identification of Several Region- and Layer-specific Genes. *Cerebral Cortex*, *14*(9), 1031–1044. https://doi.org/10.1093/cercor/bhh063

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. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(12), 8224–8230. https://doi.org/10.1074/jbc.274.12.8224

GBD 2019 Mental Disorders Collaborators. (2022). Global, regional, and national burden of 12 mental disorders in 204 countries and territories, 1990–2019: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet Psychiatry*, *9*(2), 137–150. https://doi.org/10.1016/S2215-0366(21)00395-3

Genovese, A., Cox, D., & Butler, M. (2015). Partial Deletion of Chromosome 1p31.1 Including only the Neuronal Growth Regulator 1 Gene in Two Siblings. *Journal of Pediatric Genetics*, *04*(01), 023–028. https://doi.org/10.1055/s-0035-1554977

Gerring, Z. F., Gamazon, E. R., Derks, E. M., & Consortium, for the M. D. D. W. G. of the P. G. (2019). A gene co-expression network-based analysis of multiple brain tissues reveals novel genes and molecular pathways underlying major depression. *PLOS Genetics*, *15*(7), e1008245. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008245

Gil, O. D., Zanazzi, G., Struyk, A. F., & Salzer, J. L. (1998). Neurotrimin Mediates Bifunctional Effects on Neurite Outgrowth via Homophilic and Heterophilic Interactions. *The Journal of Neuroscience*, *18*(22), 9312–9325. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-22-09312.1998

Grimwood, J., Gordon, L. A., Olsen, A., Terry, A., Schmutz, J., Lamerdin, J., Hellsten, U., Goodstein, D., Couronne, O., Tran-Gyamfi, M., Aerts, A., Altherr, M., Ashworth, L., Bajorek, E., Black, S., Branscomb, E., Caenepeel, S., Carrano, A., Caoile, C., … Lucas, S. M. (2004). The DNA sequence and biology of human chromosome 19. *Nature*, *428*(6982), 529–535. https://doi.org/10.1038/nature02399

Grove, J., Ripke, S., Als, T. D., Mattheisen, M., Walters, R. K., Won, H., Pallesen, J., Agerbo, E., Andreassen, O. A., Anney, R., Awashti, S., Belliveau, R., Bettella, F., Buxbaum, J. D., Bybjerg-Grauholm, J., Bækvad-Hansen, M., Cerrato, F., Chambert, K., Christensen, J. H., … Børglum, A. D. (2019). Identification of common genetic risk variants for autism spectrum disorder. *Nature Genetics*, *51*(3), 431–444. https://doi.org/10.1038/s41588-019-0344-8

Hale, M. W., Johnson, P. L., Westerman, A. M., Abrams, J. K., Shekhar, A., & Lowry, C. A. (2010). Multiple anxiogenic drugs recruit a parvalbumin-containing subpopulation of GABAergic interneurons in the basolateral amygdala. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *34*(7), 1285–1293. https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.07.012

Hamoir, G. (1968). The comparative biochemistry of fish sarcoplasmic proteins. *Acta Zool. Pathol*, *46*, 69–76.

Harte, M. K., Powell, S. B., Swerdlow, N. R., Geyer, M. A., & Reynolds, G. P. (2007). Deficits in parvalbumin and calbindin immunoreactive cells in the hippocampus of isolation reared rats. *Journal of Neural Transmission*, *114*(7), 893–898. https://doi.org/10.1007/s00702-007-0627-6

Hashimoto, T., Maekawa, S., & Miyata, S. (2009). IgLON cell adhesion molecules regulate synaptogenesis in hippocampal neurons. *Cell Biochemistry and Function: Cellular Biochemistry and Its Modulation by Active Agents or Disease*, *27*(7), 496–498.

Hashimoto, T., Yamada, M., Maekawa, S., Nakashima, T., & Miyata, S. (2008). IgLON cell adhesion molecule Kilon is a crucial modulator for synapse number in hippocampal neurons. *Brain Research*, *1224*, 1–11. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.05.069

Heizmann, C. W. (1984). Parvalbumin, an intracellular calcium-binding protein; distribution, properties and possible roles in mammalian cells. *Experientia*, *40*(9), 910–921. https://doi.org/10.1007/BF01946439

Hester, J., Wing, M., Li, J., Palmer, N., Xu, J., Hicks, P., Roh, B., Norris, J., Wagenknecht, L., Langefeld, C., Freedman, B., Bowden, D., & Ng, M. (2012). Implication of European-derived adiposity loci in African Americans. *International Journal of Obesity (2005)*, *36*(3), 465–473. https://doi.org/10.1038/ijo.2011.131

Höchli, M., Zetzsche, T., & Chan-Palay, V. (1991). Parvalbumin-Immunoreactive Neurons in the Normal Human Hippocampus. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, *2*(5), 243–258. https://doi.org/10.1159/000107212

Hof, P. R., Glezer, I. I., Condé, F., Flagg, R. A., Rubin, M. B., Nimchinsky, E. A., & Vogt Weisenhorn, D. M. (1999). Cellular distribution of the calcium-binding proteins parvalbumin, calbindin, and calretinin in the neocortex of mammals: Phylogenetic and developmental patterns. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, *16*(2), 77–116. https://doi.org/10.1016/S0891-0618(98)00065-9

Holliday, E. G., Nyholt, D. R., Tirupati, S., John, S., Ramachandran, P., Ramamurti, M., Ramadoss, A. J., Jeyagurunathan, A., Kottiswaran, S., Smith, H. J., Filippich, C., Nertney, D. A., Nancarrow, D. J., Hayward, N. K., Watkins, W. S., Jorde, L. B., Thara, R., & Mowry, B. J. (2009). Strong evidence for a novel schizophrenia risk locus on chromosome 1p31.1 in homogeneous pedigrees from Tamil Nadu, India. *The American Journal of Psychiatry*, *166*(2), 206–215. https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2008.08030442

Horton, H. L., & Levitt, P. (1988). A unique membrane protein is expressed on early developing limbic system axons and cortical targets. *Journal of Neuroscience*, *8*(12), 4653–4661. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.08-12-04653.1988

Horwitz, T., Lam, K., Chen, Y., Xia, Y., & Liu, C. (2019). A decade in psychiatric GWAS research. *Molecular Psychiatry*, *24*(3), 378–389. https://doi.org/10.1038/s41380-018-0055-z

Hu, H., Gan, J., & Jonas, P. (2014). Fast-spiking, parvalbumin+ GABAergic interneurons: From cellular design to microcircuit function. *Science*, *345*(6196), 1255263. https://doi.org/10.1126/science.1255263

Hyde, C. L., Nagle, M. W., Tian, C., Chen, X., Paciga, S. A., Wendland, J. R., Tung, J. Y., Hinds, D. A., Perlis, R. H., & Winslow, A. R. (2016). Identification of 15 genetic loci associated with risk of major depression in individuals of European descent. *Nature Genetics*, *48*(9), 1031–1036. https://doi.org/10.1038/ng.3623

Jarick, I., Vogel, C. I. G., Scherag, S., Schäfer, H., Hebebrand, J., Hinney, A., & Scherag, A. (2011). Novel common copy number variation for early onset extreme obesity on chromosome 11q11 identified by a genome-wide analysis. *Human Molecular Genetics*, *20*(4), 840–852. https://doi.org/10.1093/hmg/ddq518

Jenkins, T. A., Harte, M. K., Stenson, G., & Reynolds, G. P. (2009). Neonatal lipopolysaccharide induces pathological changes in parvalbumin immunoreactivity in

the hippocampus of the rat. *Behavioural Brain Research*, *205*(2), 355–359. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.07.014

Jensen, O., Kaiser, J., & Lachaux, J.-P. (2007). Human gamma-frequency oscillations associated with attention and memory. *Trends in Neurosciences*, *30*(7), 317–324. https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.05.001

Jiang, X., Lachance, M., & Rossignol, E. (2016). Involvement of cortical fast-spiking parvalbumin-positive basket cells in epilepsy. *Progress in Brain Research*, *226*, 81–126. https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2016.04.012

Joo, Y., Kim, H., Lee, S., & Lee, S. (2019). Neuronal growth regulator 1-deficient mice show increased adiposity and decreased muscle mass. *International Journal of Obesity*, *43*(9), 1769–1782. https://doi.org/10.1038/s41366-019-0376-2

Kaare, M., Mikheim, K., Lilleväli, K., Kilk, K., Jagomäe, T., Leidmaa, E., Piirsalu, M., Porosk, R., Singh, K., Reimets, R., Taalberg, E., Schäfer, M. K. E., Plaas, M., Vasar, E., & Philips, M.-A. (2021). High-Fat Diet Induces Pre-Diabetes and Distinct Sex-Specific Metabolic Alterations in Negr1-Deficient Mice. *Biomedicines*, *9*(9), 1148. https://doi.org/10.3390/biomedicines9091148

Kahali, B., Berndt, S. I., Justice, A. E., Pers, T. H., Day, F. R., Vedantam, S., Buchkovich, M. L., Yang, J., Croteau-Chonka, D. C., Esko, T., Fall, T., Ferreira, T., Gustafsson, S., Luan, J., Mägi, R., Randall, J. C., Winkler, T. W., Wood, A. R., Workalemahu, T., … Speliotes, E. K. (2015). Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. *Nature*, *518*(7538), 197–206. https://doi.org/10.1038/nature14177

Karis, K., Eskla, K.-L., Kaare, M., Täht, K., Tuusov, J., Visnapuu, T., Innos, J., Jayaram, M., Timmusk, T., Weickert, C. S., Väli, M., Vasar, E., & Philips, M.-A. (2018). Altered Expression Profile of IgLON Family of Neural Cell Adhesion Molecules in the Dorsolateral Prefrontal Cortex of Schizophrenic Patients. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *11*, 8. https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00008

Kawaguchi, Y., Katsumaru, H., Kosaka, T., Heizmann, C. W., & Hama, K. (1987). Fast spiking cells in rat hippocampus (CA1 region) contain the calcium-binding protein parvalbumin. *Brain Research*, *416*(2), 369–374. https://doi.org/10.1016/0006-8993(87)90921-8

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. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *482*(4), 1367–1374. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.12.043

Kim, H., Hwang, J.-S., Lee, B., Hong, J., & Lee, S. (2014). Newly Identified Cancer-Associated Role of Human Neuronal Growth Regulator 1 (NEGR1). *Journal of Cancer*, *5*(7), 598–608. https://doi.org/10.7150/jca.8052

Kosaka, T., Katsumaru, H., Hama, K., Wu, J. Y., & Heizmann, C. W. (1987). GABAergic neurons containing the Ca2+-binding protein parvalbumin in the rat hippocampus and dentate gyrus. *Brain Research*, *419*(1–2), 119–130. https://doi.org/10.1016/0006-8993(87)90575-0

Krabbe, S., Gründemann, J., & Lüthi, A. (2018). Amygdala Inhibitory Circuits Regulate Associative Fear Conditioning. *Biological Psychiatry*, *83*(10), 800–809. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.10.006

Lee, A. W. S., Hengstler, H., Schwald, K., Berriel-Diaz, M., Loreth, D., Kirsch, M., Kretz, O., Haas, C. A., de Angelis, M. H., Herzig, S., Brümmendorf, T., Klingenspor, M., Rathjen, F. G., Rozman, J., Nicholson, G., Cox, R. D., & Schäfer, M. K. E. (2012). Functional inactivation of the genome-wide association study obesity gene neuronal growth regulator 1 in mice causes a body mass phenotype. *PloS One*, *7*(7), e41537. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041537

Levey, D. F., Stein, M. B., Wendt, F. R., Pathak, G. A., Zhou, H., Aslan, M., Quaden, R., Harrington, K. M., Nuñez, Y. Z., Overstreet, C., Radhakrishnan, K., Sanacora, G., McIntosh, A. M., Shi, J., Shringarpure, S. S., 23andMe Research Team, the Million Veteran Program, Concato, J., Polimanti, R., & Gelernter, J. (2021). Bi-ancestral depression GWAS in the Million Veteran Program and meta-analysis in >1.2 million individuals highlight new therapeutic directions. *Nature Neuroscience*, *24*(7), 954–963. https://doi.org/10.1038/s41593-021-00860-2

Li, Q. S., & De Muynck, L. (2021). Differentially expressed genes in Alzheimer's disease highlighting the roles of microglia genes including OLR1 and astrocyte gene CDK2AP1. *Brain, Behavior, & Immunity - Health*, *13*, 100227. https://doi.org/10.1016/j.bbih.2021.100227

Li, S., Li, Y., Li, X., Liu, J., Huo, Y., Wang, J., Liu, Z., Li, M., & Luo, X.-J. (2020). Regulatory mechanisms of major depressive disorder risk variants. *Molecular Psychiatry*, *25*(9), 1926–1945. https://doi.org/10.1038/s41380-020-0715-7

Liu, S., Wilson, J. G., Jiang, F., Griswold, M., Correa, A., & Mei, H. (2016). Multi-variant study of obesity risk genes in African Americans: The Jackson Heart Study. *Gene*, *593*(2), 315–321. https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.08.041

Lodge, D. J., Behrens, M. M., & Grace, A. A. (2009). A Loss of Parvalbumin-Containing Interneurons Is Associated with Diminished Oscillatory Activity in an Animal Model of Schizophrenia. *Journal of Neuroscience*, *29*(8), 2344–2354. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5419-08.2009

Lucas, E. K., Jegarl, A. M., Morishita, H., & Clem, R. L. (2016). Multimodal and Site-Specific Plasticity of Amygdala Parvalbumin Interneurons after Fear Learning. *Neuron*, *91*(3), 629–643. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.06.032

Luo, B.-H., Carman, C. V., & Springer, T. A. (2007). Structural Basis of Integrin Regulation and Signaling. *Annual Review of Immunology*, *25*(1), 619–647. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141618

Maccarrone, G., Ditzen, C., Yassouridis, A., Rewerts, C., Uhr, M., Uhlen, M., Holsboer, F., & Turck, C. W. (2013). Psychiatric patient stratification using biosignatures based on cerebrospinal fluid protein expression clusters. *Journal of Psychiatric Research*, *47*(11), 1572–1580. https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2013.07.021

Mägi, R., Manning, S., Yousseif, A., Pucci, A., Santini, F., Karra, E., Querci, G., Pelosini, C., McCarthy, M. I., Lindgren, C. M., & Batterham, R. L. (2013). Contribution of 32 GWAS-Identified Common Variants to Severe Obesity in European Adults Referred for Bariatric Surgery. *PLoS ONE*, *8*(8), e70735. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070735

Mai, J. K., Majtanik, M., & Paxinos, G. (2016). *Atlas of the human brain* (4th edition). Academic Press.

Marg, A., Sirim, P., Spaltmann, F., Plagge, A., Kauselmann, G., Buck, F., Rathjen, F. G., & Brümmendorf, T. (1999). Neurotractin, a novel neurite outgrowth-promoting Ig-like protein that interacts with CEPU-1 and LAMP. *The Journal of Cell Biology, 145*(4), 865–876. https://doi.org/10.1083/jcb.145.4.865

Martin, J., Taylor, M. J., & Lichtenstein, P. (2018). Assessing the evidence for shared genetic risks across psychiatric disorders and traits. *Psychological Medicine*, *48*(11), 1759–1774. https://doi.org/10.1017/S0033291717003440

McEver, R. P. (2015). Selectins: Initiators of leucocyte adhesion and signalling at the vascular wall. *Cardiovascular Research, 107*(3), 331–339. https://doi.org/10.1093/cvr/cvv154

McNamee, C. J., Youssef, S., & Moss, D. (2011). IgLONs form heterodimeric complexes on forebrain neurons. *Cell Biochemistry and Function*, *29*(2), 114–119. https://doi.org/10.1002/cbf.1730

Melén, E., Himes, B. E., Brehm, J. M., Boutaoui, N., Klanderman, B. J., Sylvia, J. S., & Lasky-Su, J. (2010). Analyses of shared genetic factors between asthma and obesity in children. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *126*(3), 631-637.e8. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.06.030

Michaelson, J. J., Shi, Y., Gujral, M., Zheng, H., Malhotra, D., Jin, X., Jian, M., Liu, G., Greer, D., Bhandari, A., Wu, W., Corominas, R., Peoples, Á., Koren, A., Gore, A., Kang, S., Lin, G. N., Estabillo, J., Gadomski, T., … Sebat, J. (2012). Whole-Genome Sequencing in Autism Identifies Hot Spots for De Novo Germline Mutation. *Cell*, *151*(7), 1431–1442. https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.11.019

Miyata, S., Funatsu, N., Matsunaga, W., Kiyohara, T., Sokawa, Y., & Maekawa, S. (2000). Expression of the IgLON cell adhesion molecules Kilon and OBCAM in hypothalamic magnocellular neurons. *The Journal of Comparative Neurology*, *424*(1), 74–85. https://doi.org/10.1002/1096-9861(20000814)424:1<74::aid-cne6>3.0.co;2-5

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*(3), 645–658. https://doi.org/10.1016/S0306-4522(02)00873-4

Miyata, S., Taguchi, K., & Maekawa, S. (2003). Dendrite-associated opioid-binding cell adhesion molecule localizes at neurosecretory granules in the hypothalamic magnocellular neurons. *Neuroscience*, *122*(1), 169–181. https://doi.org/10.1016/S0306-4522(03)00609-2

Nahar, L., Delacroix, B. M., & Nam, H. W. (2021). The Role of Parvalbumin Interneurons in Neurotransmitter Balance and Neurological Disease. *Frontiers in Psychiatry*, *12*. https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpsyt.2021.679960

Ni, H., Xu, M., Zhan, G.-L., Fan, Y., Zhou, H., Jiang, H.-Y., Lu, W.-H., Tan, L., Zhang, D.-F., Yao, Y.-G., & Zhang, C. (2018). The GWAS Risk Genes for Depression May Be

Actively Involved in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, *64*(4), 1149–1161. https://doi.org/10.3233/JAD-180276

Noh, K., Lee, H., Choi, T.-Y., Joo, Y., Kim, S.-J., Kim, H., Kim, J. Y., Jahng, J. W., Lee, S., Choi, S.-Y., & Lee, S. J. (2019). Negr1 controls adult hippocampal neurogenesis and affective behaviors. *Molecular Psychiatry*, *24*(8), 1189–1205. https://doi.org/10.1038/s41380-018-0347-3

Noh, K., Park, J.-C., Han, J.-S., & Lee, S. J. (2020). From Bound Cells Comes a Sound Mind: The Role of Neuronal Growth Regulator 1 in Psychiatric Disorders. *Experimental Neurobiology*, *29*(1), 1–10. https://doi.org/10.5607/en.2020.29.1.1

Ntalla, I., Panoutsopoulou, K., Vlachou, P., Southam, L., William Rayner, N., Zeggini, E., & Dedoussis, G. V. (2013). Replication of established common genetic variants for adult BMI and childhood obesity in Greek adolescents: The TEENAGE study. *Annals of Human Genetics*, *77*(3), 268–274. https://doi.org/10.1111/ahg.12012

Ntougkos, E., Rush, R., Scott, D., Frankenberg, T., Gabra, H., Smyth, J. F., & Sellar, G. C. (2005). The IgLON Family in Epithelial Ovarian Cancer: Expression Profiles and Clinicopathologic Correlates. *Clinical Cancer Research*, *11*(16), 5764–5768. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-2388

Ohshima, T., Endo, T., & Onaya, T. (1991). Distribution of parvalbumin immunoreactivity in the human brain. *Journal of Neurology*, *238*(6), 320–322. https://doi.org/10.1007/BF00315329

Pan, Y., Wang, K.-S., & Aragam, N. (2011). NTM and NR3C2 polymorphisms influencing intelligence: Family-based association studies. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *35*(1), 154–160. https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.10.016

Pantelis, C., Yücel, M., Wood, S. J., Velakoulis, D., Sun, D., Berger, G., Stuart, G. W., Yung, A., Phillips, L., & McGorry, P. D. (2005). Structural Brain Imaging Evidence for

Multiple Pathological Processes at Different Stages of Brain Development in Schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, *31*(3), 672–696. https://doi.org/10.1093/schbul/sbi034

Paxinos, G., & Watson, C. (2014). *Paxino's and Watson's The rat brain in stereotaxic coordinates* (Seventh edition). Elsevier/AP, Academic Press is an imprint of Elsevier.

Petruzzelli, L., Takami, M., & Humes, H. D. (1999). Structure and function of cell adhesion molecules. *The American Journal of Medicine*, *106*(4), 467–476. https://doi.org/10.1016/s0002-9343(99)00058-3

Pinto, D., Pagnamenta, A. T., Klei, L., Anney, R., Merico, D., Regan, R., Conroy, J., Magalhaes, T. R., Correia, C., Abrahams, B. S., Almeida, J., Bacchelli, E., Bader, G. D., Bailey, A. J., Baird, G., Battaglia, A., Berney, T., Bolshakova, N., Bölte, S., … Betancur, C. (2010). Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders. *Nature*, *466*(7304), 368–372. https://doi.org/10.1038/nature09146

Pischedda, F., & Piccoli, G. (2016). The IgLON Family Member Negr1 Promotes Neuronal Arborization Acting as Soluble Factor via FGFR2. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *8*, 89. https://doi.org/10.3389/fnmol.2015.00089

Pischedda, F., Szczurkowska, J., Cirnaru, M. D., Giesert, F., Vezzoli, E., Ueffing, M., Sala, C., Francolini, M., Hauck, S. M., Cancedda, L., & Piccoli, G. (2014). A Cell Surface Biotinylation Assay to Reveal Membrane-associated Neuronal Cues: Negr1 Regulates Dendritic Arborization *. *Molecular & Cellular Proteomics*, *13*(3), 733–748. https://doi.org/10.1074/mcp.M113.031716

Poveda, A., Ibáñez, M. E., & Rebato, E. (2014). Common variants in BDNF, FAIM2, FTO, MC4R, NEGR1, and SH2B1 show association with obesity-related variables in Spanish Roma population. *American Journal of Human Biology: The Official Journal of the Human Biology Council*, *26*(5), 660–669. https://doi.org/10.1002/ajhb.22576

Reed, J., McNamee, C., Rackstraw, S., Jenkins, J., & Moss, D. (2004). Diglons are heterodimeric proteins composed of IgLON subunits, and Diglon-CO inhibits neurite outgrowth from cerebellar granule cells. *Journal of Cell Science*, *117*(17), 3961–3973. https://doi.org/10.1242/jcs.01261

Renström, F., Payne, F., Nordström, A., Brito, E. C., Rolandsson, O., Hallmans, G., Barroso, I., Nordström, P., Franks, P. W., & GIANT Consortium. (2009). Replication and extension of genome-wide association study results for obesity in 4923 adults from northern Sweden. *Human Molecular Genetics*, *18*(8), 1489–1496. https://doi.org/10.1093/hmg/ddp041

Ripke, S., Neale, B. M., Corvin, A., Walters, J. T. R., Farh, K.-H., Holmans, P. A., Lee, P., Bulik-Sullivan, B., Collier, D. A., Huang, H., Pers, T. H., Agartz, I., Agerbo, E., Albus, M., Alexander, M., Amin, F., Bacanu, S. A., Begemann, M., Belliveau Jr, R. A., … Psychosis Endophenotypes International Consortium. (2014). Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature*, *511*(7510), 421–427. https://doi.org/10.1038/nature13595

Rougon, G., & Hobert, O. (2003). New insights into the diversity and function of neuronal immunoglobulin superfamily molecules. *Annual Review of Neuroscience*, *26,* 207–238. https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.26.041002.131014

Sabater, L., Gaig, C., Gelpi, E., Bataller, L., Lewerenz, J., Torres-Vega, E., Contreras, A., Giometto, B., Compta, Y., Embid, C., Vilaseca, I., Iranzo, A., Santamaría, J., Dalmau, J., & Graus, F. (2014). A novel non-rapid-eye movement and rapid-eye-movement parasomnia with sleep breathing disorder associated with antibodies to IgLON5: A case series, characterisation of the antigen, and post-mortem study. *The Lancet Neurology*, *13*(6), 575–586. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70051-1

Sanz, R., Ferraro, G. B., & Fournier, A. E. (2015). IgLON Cell Adhesion Molecules Are Shed from the Cell Surface of Cortical Neurons to Promote Neuronal Growth *. *Journal of Biological Chemistry*, *290*(7), 4330–4342. https://doi.org/10.1074/jbc.M114.628438

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. *Molecular and Cellular Neurosciences*, *29*(4), 580–590. https://doi.org/10.1016/j.mcn.2005.04.010

Schlauch, K. A., Read, R. W., Lombardi, V. C., Elhanan, G., Metcalf, W. J., Slonim, A. D., & Grzymski, J. J. (2019). A Comprehensive Genome-Wide and Phenome-Wide Examination of BMI and Obesity in a Northern Nevadan Cohort. *G3: Genes|Genomes|Genetics*, *10*(2), 645–664. https://doi.org/10.1534/g3.119.400910

Sellar, G. C., Watt, K. P., Rabiasz, G. J., Stronach, E. A., Li, L., Miller, E. P., Massie, C. E., Miller, J., Contreras-Moreira, B., Scott, D., Brown, I., Williams, A. R., Bates, P. A., Smyth, J. F., & Gabra, H. (2003). OPCML at 11q25 is epigenetically inactivated and has tumor-suppressor function in epithelial ovarian cancer. *Nature Genetics*, *34*(3), 337–343. https://doi.org/10.1038/ng1183

Selten, M., van Bokhoven, H., & Nadif Kasri, N. (2018). Inhibitory control of the excitatory/inhibitory balance in psychiatric disorders. *F1000Research*, *7*, 23. https://doi.org/10.12688/f1000research.12155.1

Seress, L., Gulyás, A. I., Ferrer, I., Tunon, T., Soriano, E., & Freund, T. F. (1993). Distribution, morphological features, and synaptic connections of parvalbumin- and calbindin D $_{28k}$ -immunoreactive neurons in the human hippocampal formation: CALCIUM BINDING PROTEINS IN HUMAN HIPPOCAMPUS. *Journal of Comparative Neurology*, *337*(2), 208–230. https://doi.org/10.1002/cne.903370204

Sharma, K., Schmitt, S., Bergner, C. G., Tyanova, S., Kannaiyan, N., Manrique-Hoyos, N., Kongi, K., Cantuti, L., Hanisch, U.-K., Philips, M.-A., Rossner, M. J., Mann, M., &

Simons, M. (2015). Cell type– and brain region–resolved mouse brain proteome. *Nature Neuroscience*, *18*(12), 1819–1831. https://doi.org/10.1038/nn.4160

Singh, K., Jayaram, M., Kaare, M., Leidmaa, E., Jagomäe, T., Heinla, I., Hickey, M. A., Kaasik, A., Schäfer, M. K., Innos, J., Lilleväli, K., Philips, M.-A., & Vasar, E. (2019). Neural cell adhesion molecule Negr1 deficiency in mouse results in structural brain endophenotypes and behavioral deviations related to psychiatric disorders. *Scientific Reports*, *9*(1), 5457. https://doi.org/10.1038/s41598-019-41991-8

Singh, K., Loreth, D., Pöttker, B., Hefti, K., Innos, J., Schwald, K., Hengstler, H., Menzel, L., Sommer, C. J., Radyushkin, K., Kretz, O., Philips, M.-A., Haas, C. A., Frauenknecht, K., Lilleväli, K., Heimrich, B., Vasar, E., & Schäfer, M. K. E. (2018). Neuronal Growth and Behavioral Alterations in Mice Deficient for the Psychiatric Disease-Associated Negr1 Gene. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *11*, 30. https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00030

Sloviter, R. S., Sollas, A. L., Barbaro, N. M., & Laxer, K. D. (1991). Calcium-binding protein (calbindin-D28K) and parvalbumin immunocytochemistry in the normal and epileptic human hippocampus. *The Journal of Comparative Neurology*, *308*(3), 381–396. https://doi.org/10.1002/cne.903080306

Sniekers, S., Stringer, S., Watanabe, K., Jansen, P. R., Coleman, J. R. I., Krapohl, E., Taskesen, E., Hammerschlag, A. R., Okbay, A., Zabaneh, D., Amin, N., Breen, G., Cesarini, D., Chabris, C. F., Iacono, W. G., Ikram, M. A., Johannesson, M., Koellinger, P., Lee, J. J., … Posthuma, D. (2017). Erratum: Genome-wide association meta-analysis of 78,308 individuals identifies new loci and genes influencing human intelligence. *Nature Genetics*, *49*(10), 1558–1558. https://doi.org/10.1038/ng1017-1558c

Soghomonian, J.-J., Zhang, K., Reprakash, S., & Blatt, G. J. (2017). Decreased parvalbumin mRNA levels in cerebellar Purkinje cells in autism. *Autism Research*, *10*(11), 1787–1796. https://doi.org/10.1002/aur.1835

Sohal, V. S., & Rubenstein, J. L. R. (2019). Excitation-inhibition balance as a framework for investigating mechanisms in neuropsychiatric disorders. *Molecular Psychiatry*, *24*(9), 1248–1257. https://doi.org/10.1038/s41380-019-0426-0

Sohal, V. S., Zhang, F., Yizhar, O., & Deisseroth, K. (2009). Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature*, *459*(7247), 698–702. https://doi.org/10.1038/nature07991

Speliotes, E. K., Willer, C. J., Berndt, S. I., Monda, K. L., Thorleifsson, G., Jackson, A. U., Allen, H. L., Lindgren, C. M., Luan, J., Mägi, R., Randall, J. C., Vedantam, S., Winkler, T. W., Qi, L., Workalemahu, T., Heid, I. M., Steinthorsdottir, V., Stringham, H. M., Weedon, M. N., … Loos, R. J. F. (2010). Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index. *Nature Genetics*, *42*(11), 937–948. https://doi.org/10.1038/ng.686

Struyk, A. F., Canoll, P. D., Wolfgang, M. J., Rosen, C. L., D'Eustachio, P., & Salzer, J. L. (1995). Cloning of neurotrimin defines a new subfamily of differentially expressed neural cell adhesion molecules. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *15*(3 Pt 2), 2141–2156.

Sugimoto, C., Morita, S., & Miyata, S. (2012). Overexpression of IgLON cell adhesion molecules changes proliferation and cell size of cortical astrocytes. *Cell Biochemistry and Function*, *30*(5), 400–405. https://doi.org/10.1002/cbf.2813

Sytnyk, V., Leshchyns'ka, I., & Schachner, M. (2017). Neural Cell Adhesion Molecules of the Immunoglobulin Superfamily Regulate Synapse Formation, Maintenance, and Function. *Trends in Neurosciences*, *40*(5), 295–308. https://doi.org/10.1016/j.tins.2017.03.003

Szczurkowska, J., Pischedda, F., Pinto, B., Managò, F., Haas, C. A., Summa, M., Bertorelli, R., Papaleo, F., Schäfer, M. K., Piccoli, G., & Cancedda, L. (2018). NEGR1 and FGFR2 cooperatively regulate cortical development and core behaviours related to autism disorders in mice. *Brain*, *141*(9), 2772–2794. https://doi.org/10.1093/brain/awy190

Takeichi, M. (1990). Cadherins: A molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Annual Review of Biochemistry*, *59*, 237–252. https://doi.org/10.1146/annurev.bi.59.070190.001321

Takita, J., Chen, Y., Okubo, J., Sanada, M., Adachi, M., Ohki, K., Nishimura, R., Hanada, R., Igarashi, T., Hayashi, Y., & Ogawa, S. (2011). Aberrations of NEGR1 on 1p31 and MYEOV on 11q13 in neuroblastoma. *Cancer Science*, *102*(9), 1645–1650. https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2011.01995.x

Tan, R. P. A., Kozlova, I., Su, F., Sah, S., Keable, R., Hagan, D. W., Bustamante, S., Du, X., Osborne, B., Turner, N., Clemens, K. J., Begg, D., Phelps, E. A., Yang, H., Leshchyns'ka, I., & Sytnyk, V. (2022). *Neuronal growth regulator 1 (NEGR1) promotes synaptic targeting of glutamic acid decarboxylase 65 (GAD65)* [Preprint]. Neuroscience. https://doi.org/10.1101/2022.02.08.479601

Tan, R. P. A., Leshchyns'ka, I., & Sytnyk, V. (2017). Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Immunoglobulin Superfamily Cell Adhesion Molecules and Their Role in Neuronal Development and Synapse Regulation. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *10*. https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnmol.2017.00378

Tassano, E., Gamucci, A., Celle, M. E., Ronchetto, P., Cuoco, C., & Gimelli, G. (2015). Clinical and Molecular Cytogenetic Characterization of a de novo Interstitial 1p31.1p31.3 Deletion in a Boy with Moderate Intellectual Disability and Severe Language Impairment. *Cytogenetic and Genome Research*, *146*(1), 39–43. https://doi.org/10.1159/000431391

Tassano, E., Uccella, S., Giacomini, T., Fiorio, P., Tavella, E., Malacarne, M., Gimelli, G., Coviello, D., & Ronchetto, P. (2020). 1p31.1 microdeletion including only NEGR1 gene in two patients. *European Journal of Medical Genetics*, *63*(6), 103919. https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2020.103919

THE BRAINSTORM CONSORTIUM, Anttila, V., Bulik-Sullivan, B., Finucane, H. K., Walters, R. K., Bras, J., Duncan, L., Escott-Price, V., Falcone, G. J., Gormley, P., Malik, R., Patsopoulos, N. A., Ripke, S., Wei, Z., Yu, D., Lee, P. H., Turley, P., Grenier-Boley, B., Chouraki, V., … Neale, B. M. (2018). Analysis of shared heritability in common disorders of the brain. *Science*, *360*(6395), eaap8757. https://doi.org/10.1126/science.aap8757

Thorleifsson, G., Walters, G. B., Gudbjartsson, D. F., Steinthorsdottir, V., Sulem, P., Helgadottir, A., Styrkarsdottir, U., Gretarsdottir, S., Thorlacius, S., Jonsdottir, I., Jonsdottir, T., Olafsdottir, E. J., Olafsdottir, G. H., Jonsson, T., Jonsson, F., Borch-Johnsen, K., Hansen, T., Andersen, G., Jorgensen, T., … Stefansson, K. (2009). Genome-wide association yields new sequence variants at seven loci that associate with measures of obesity. *Nature Genetics*, *41*(1), 18–24. https://doi.org/10.1038/ng.274

Tremblay, R., Lee, S., & Rudy, B. (2016). GABAergic interneurons in the neocortex: From cellular properties to circuits. *Neuron*, *91*(2), 260–292. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.06.033

Uher, R., & Zwicker, A. (2017). Etiology in psychiatry: Embracing the reality of poly-gene-environmental causation of mental illness. *World Psychiatry*, *16*(2), 121–129. https://doi.org/10.1002/wps.20436

Uhlhaas, P. J., & Singer, W. (2010). Abnormal neural oscillations and synchrony in schizophrenia. *Nature Reviews Neuroscience*, *11*(2), 100–113. https://doi.org/10.1038/nrn2774

Urakawa, S., Takamoto, K., Hori, E., Sakai, N., Ono, T., & Nishijo, H. (2013). Rearing in enriched environment increases parvalbumin-positive small neurons in the amygdala and decreases anxiety-like behavior of male rats. *BMC Neuroscience*, *14*(1), 13. https://doi.org/10.1186/1471-2202-14-13

Vasar, E., Innos, J., Philips, M.-A., & Koido, K. (2013). Limbic system associated membrane protein as a potential target for neuropsychiatric disorders. *Frontiers in Pharmacology*, *4*. https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2013.00032

Veerappa, A. M., Saldanha, M., Padakannaya, P., & Ramachandra, N. B. (2013). Family-based genome-wide copy number scan identifies five new genes of dyslexia involved in dendritic spinal plasticity. *Journal of Human Genetics*, *58*(8), 539–547. https://doi.org/10.1038/jhg.2013.47

Veerasakul, S., Thanoi, S., Reynolds, G. P., & Nudmamud-Thanoi, S. (2016). Effect of Methamphetamine Exposure on Expression of Calcium Binding Proteins in Rat Frontal Cortex and Hippocampus. *Neurotoxicity Research*, *30*(3), 427–433. https://doi.org/10.1007/s12640-016-9628-2

Venkannagari, H., Kasper, J. M., Misra, A., Rush, S. A., Fan, S., Lee, H., Sun, H., Seshadrinathan, S., Machius, M., Hommel, J. D., & Rudenko, G. (2020). Highly Conserved Molecular Features in IgLONs Contrast Their Distinct Structural and Biological Outcomes. *Journal of Molecular Biology*, *432*(19), 5287–5303. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.07.014

Vidal-Domènech, F., Riquelme, G., Pinacho, R., Rodriguez-Mias, R., Vera, A., Monje, A., Ferrer, I., Callado, L. F., Meana, J. J., Villén, J., & Ramos, B. (2020). Calcium-binding proteins are altered in the cerebellum in schizophrenia. *PLOS ONE*, *15*(7), e0230400. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230400

Vologzhannikova, A. A., Shevelyova, M. P., Kazakov, A. S., Sokolov, A. S., Borisova, N. I., Permyakov, E. A., Kircheva, N., Nikolova, V., Dudev, T., & Permyakov, S. E. (2021).

Strontium Binding to α-Parvalbumin, a Canonical Calcium-Binding Protein of the "EF-Hand" Family. *Biomolecules*, *11*(8), 1158. https://doi.org/10.3390/biom11081158

Waldvogel, H. J., Curtis, M. A., Baer, K., Rees, M. I., & Faull, R. L. M. (2006). Immunohistochemical staining of post-mortem adult human brain sections. *Nature Protocols*, *1*(6), 2719–2732. https://doi.org/10.1038/nprot.2006.354

Walley, A. J., Jacobson, P., Falchi, M., Bottolo, L., Andersson, J. C., Petretto, E., Bonnefond, A., Vaillant, E., Lecoeur, C., Vatin, V., Jernas, M., Balding, D., Petteni, M., Park, Y. S., Aitman, T., Richardson, S., Sjostrom, L., Carlsson, L. M. S., & Froguel, P. (2012). Differential coexpression analysis of obesity-associated networks in human subcutaneous adipose tissue. *International Journal of Obesity*, *36*(1), 137–147. https://doi.org/10.1038/ijo.2011.22

Wheeler, E., Huang, N., Bochukova, E. G., Keogh, J. M., Lindsay, S., Garg, S., Henning, E., Blackburn, H., Loos, R. J. F., Wareham, N. J., O'Rahilly, S., Hurles, M. E., Barroso, I., & Farooqi, I. S. (2013). Genome-wide SNP and CNV analysis identifies common and low-frequency variants associated with severe early-onset obesity. *Nature Genetics*, *45*(5), 513–517. https://doi.org/10.1038/ng.2607

Willer, C. J., Speliotes, E. K., Loos, R. J. F., Li, S., Lindgren, C. M., Heid, I. M., Berndt, S. I., Elliott, A. L., Jackson, A. U., Lamina, C., Lettre, G., Lim, N., Lyon, H. N., McCarroll, S. A., Papadakis, K., Qi, L., Randall, J. C., Roccasecca, R. M., Sanna, S., … the GIANT Consortium. (2009). Six new loci associated with body mass index highlight a neuronal influence on body weight regulation. *Nature Genetics*, *41*(1), 25–34. https://doi.org/10.1038/ng.287

Winkler, T. W., Justice, A. E., Graff, M., Barata, L., Feitosa, M. F., Chu, S., Czajkowski, J., Esko, T., Fall, T., Kilpeläinen, T. O., Lu, Y., Mägi, R., Mihailov, E., Pers, T. H., Rüeger, S., Teumer, A., Ehret, G. B., Ferreira, T., Heard-Costa, N. L., … Loos, R. J. F. (2015). The Influence of Age and Sex on Genetic Associations with Adult Body

Size and Shape: A Large-Scale Genome-Wide Interaction Study. *PLOS Genetics*, *11*(10), e1005378. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005378

Wöhr, M., Orduz, D., Gregory, P., Moreno, H., Khan, U., Vörckel, K. J., Wolfer, D. P., Welzl, H., Gall, D., Schiffmann, S. N., & Schwaller, B. (2015). Lack of parvalbumin in mice leads to behavioral deficits relevant to all human autism core symptoms and related neural morphofunctional abnormalities. *Translational Psychiatry*, *5*(3), e525–e525. https://doi.org/10.1038/tp.2015.19

Wray, N. R., Ripke, S., Mattheisen, M., Trzaskowski, M., Byrne, E. M., Abdellaoui, A., Adams, M. J., Agerbo, E., Air, T. M., Andlauer, T. M. F., Bacanu, S.-A., Bækvad-Hansen, M., Beekman, A. F. T., Bigdeli, T. B., Binder, E. B., Blackwood, D. R. H., Bryois, J., Buttenschøn, H. N., Bybjerg-Grauholm, J., … Sullivan, P. F. (2018). Genome-wide association analyses identify 44 risk variants and refine the genetic architecture of major depression. *Nature Genetics*, *50*(5), 668–681. https://doi.org/10.1038/s41588-018-0090-3

Yamada, M., Hashimoto, T., Hayashi, N., Higuchi, M., Murakami, A., Nakashima, T., Maekawa, S., & Miyata, S. (2007). Synaptic adhesion molecule OBCAM; synaptogenesis and dynamic internalization. *Brain Research*, *1165*, 5–14. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.04.062

Yau, J. O.-Y., Chaichim, C., Power, J. M., & McNally, G. P. (2021). The Roles of Basolateral Amygdala Parvalbumin Neurons in Fear Learning. *Journal of Neuroscience*, *41*(44), 9223–9234. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2461-20.2021

Zallo, F., Gardenal, E., Verkhratsky, A., & Rodríguez, J. J. (2018). Loss of calretinin and parvalbumin positive interneurones in the hippocampal CA1 of aged Alzheimer's disease mice. *Neuroscience Letters*, *681*, 19–25. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.05.027

Zhang, Y., Chen, K., Sloan, S. A., Bennett, M. L., Scholze, A. R., O'Keeffe, S., Phatnani, H. P., Guarnieri, P., Caneda, C., Ruderisch, N., Deng, S., Liddelow, S. A., Zhang, C., Daneman, R., Maniatis, T., Barres, B. A., & Wu, J. Q. (2014). An RNA-Sequencing Transcriptome and Splicing Database of Glia, Neurons, and Vascular Cells of the Cerebral Cortex. *Journal of Neuroscience*, *34*(36), 11929–11947. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1860-14.2014

Zhang, Y., Sloan, S. A., Clarke, L. E., Caneda, C., Plaza, C. A., Blumenthal, P. D., Vogel, H., Steinberg, G. K., Edwards, M. S. B., Li, G., Duncan, J. A., Cheshier, S. H., Shuer, L. M., Chang, E. F., Grant, G. A., Gephart, M. G. H., & Barres, B. A. (2016). Purification and Characterization of Progenitor and Mature Human Astrocytes Reveals Transcriptional and Functional Differences with Mouse. *Neuron*, *89*(1), 37–53. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.11.013

Zhang, Z., Sun, J., & Reynolds, G. P. (2002). A selective reduction in the relative density of parvalbumin-immunoreactive neurons in the hippocampus in schizophrenia patients. *Chinese Medical Journal*, *115*(6), 819–823.

Zhou, H., Sealock, J. M., Sanchez-Roige, S., Clarke, T.-K., Levey, D. F., Cheng, Z., Li, B., Polimanti, R., Kember, R. L., Smith, R. V., Thygesen, J. H., Morgan, M. Y., Atkinson, S. R., Thursz, M. R., Nyegaard, M., Mattheisen, M., Børglum, A. D., Johnson, E. C., Justice, A. C., … Gelernter, J. (2020). Genome-wide meta-analysis of problematic alcohol use in 435,563 individuals yields insights into biology and relationships with other traits. *Nature Neuroscience*, *23*(7), 809–818. https://doi.org/10.1038/s41593-020-0643-5

**LIHTLITSENTS**

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Liisi Promet

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „Parvalbumiini interneuronid roti ajus ja inimese hipokampuses ekspresseerivad närvirakkude adhesioonimolekuli NEGR1“, mille juhendaja on Toomas Jagomäe, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commonsi litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, alates ***26.05.2025*** kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

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

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

*Liisi Promet*
***26.05.2022***