

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
ARENGUBIOLOOGIA ÕPPETOOL

Kadri Seppa

***Neurotrimini ja Obcam* geenide alternatiivsete promootorite 1a ja
1b poolt algatatud transkriptsiooni kirjeldamine hiire ajus**

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Juhendajad: PhD Kersti Lilleväli

PhD Tambet Tõnissoo

Tartu 2015

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1.1 Raku adhesioonimolekulid (IgCAM)	6
1.2 IgLON valguperekond	7
1.2.1 LSAMP	9
1.2.2 Kilon/Negr1	10
1.2.3 OBCAM	11
1.2.4 Neurotrimin	11
1.3 Kesknärvisüsteemi anatoomia	13
2. EKSPERIMENTAALOSA	16
2.1 Töö eesmärk	16
2.2 Materjal ja meetodika	16
2.2.1 Hiireliinid	16
2.2.2 Kasutatud plasmiidid	16
2.2.3 RNA in vitro transkriptsioon	16
2.2.4 Ajukoete valmistamine hübriidisatsiooniks	17
2.2.5 Prehübriidisatsioon	17
2.2.6 Hübriidisatsioon	17
2.2.7 Hübriidisatsioonijärgsed pesud ja immunohistokeemia	18
2.2.8 Mikroskopeerimine	18
2.3 Tulemused ja arutelu	19
2.3.1 IgLON perekonna geenide põlvnemine	19
2.3.2 Alternatiivsete promootorite 1a ja 1b ekspressioonid	20
2.3.2.1 <i>Neurotrimini</i> 1a ja 1b promootorite ekspressioon	21
2.3.2.2 <i>Obcami</i> 1a ja 1b promootorite ekspressioon	24
KOKKUVÕTE	28

Summary.....	29
TÄNUSÕNAD	31
KIRJANDUS	32
LISAD	40
Lihtlitsents	41

KASUTATUD LÜHENDID

E – embrüonaalne arengupäev (ingl k *embryonic day*)

GPI– glükosüül-fosfatidüül-inositool (ingl k *glycosylphosphatidylinositol*)

Ig – immuunoglobuliin (ingl k *immunoglobulin*)

IgCAM – immuunoglobuliin raku adhesioonimolekul (ingl k *immunoglobulin cell adhesion molecule*)

IgLON – immuunoglobuliin LON (ingl k *immunoglobulin LON*)

IgSF – immuunoglobuliini superperekond/ülemperokond (ingl k *immunoglobulin superfamily*)

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

OBCAM– opioide siduv raku adhesioonimolekul (ingl k *opioid-binding cell adhesion molecule*)

SNP- *single nucleotide polymorphisms*

wt – metsiktüüpi (ingl k *wild-type*)

SISSEJUHATUS

Immunoglobuliinide superperekonda kuuluvad IgLON perekonna valgud on olulised neuraalse adhesiooni vahendamisel ning omavad rolli sünaptogeneesis ja neuronite migratsioonis. IgLON perekonda kuulub viis valku: LSAMP, Neurotrimin, OBCAM, Kilon ja IgLON5. IgLON valkudel on kolm Ig domeeni ning neile iseloomulik GPI (glükosüül-fosfatidüül-inositol) ankur lisatakse peale translatsiooni valgu karboksüülterminaalsesse osasse ning see on vajalik valgu ankurdamiseks raku plasmamembraanile. IgLON valgud moodustavad rakumembraanil hetero- või homodimeere, mida nimetatakse Digloniteks. Neljast valgust saab moodustada kuus erinevat funktsionaalset Diglonit. Naaberrakkudel paiknevad Diglonid võivad omavahel seonududa (Reed jt, 2004).

Füsioloogia osakonnas on varem kirjeldatud ja analüüsitud *Lsampi* 1a ja 1b promootorspetsiifilist ekspressiooni. Töörühma poolt tehtud analüüside avaldamata tulemused näitavad, et sarnaselt *Lsamp* geenile on ka *Obcam*-il ja *Neurotrimini*-il kaks alternatiivset promootorit. Sellest lähtuvalt sai käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks kirjeldada *Neurotrimini* ja *Obcam* geenide alternatiivsete promootorite (1a ja 1b) poolt algatatud transkriptsiooni hiire ajus ning kirjanduse osas anda ülevaate IgLON geeni/valgu perekonnast.

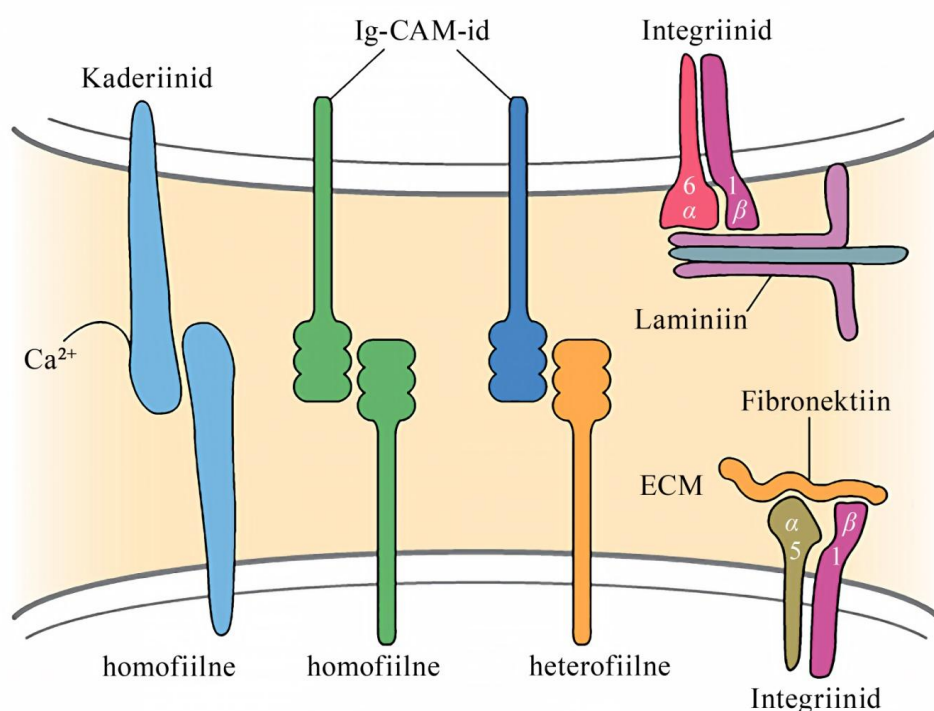
Töö koostati Arstiteaduskonna Bio- ja siirdemeditsiini instituudi füsioloogia osakonnas.

Märksõnad: IgLON, adhesioonimolekul, Neurotrimin, Obcam, alternatiivsed promootorid, geenipuu

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Raku adhesioonimolekulid (IgCAM)

Raku adhesioonimolekulid (Ig-CAM-id) on raku pinnal asetsevad glükovaalud, mis toimivad enamasti transmembraansete retseptoritena ning vahendavad rakkudevahelist või ekstratsellulaarse maatriksiga seondumist (Gumbiner, 1996). Selgroogsetel teadaolevad adhesioonimolekulid võib jagada nelja klassi: 1) immunoglobuliinide hulka kuuluvad kaltsiumioonidest sõltumatud adhesioonimolekulid ehk immunoglobuliinide superperekond (*immunoglobulin superfamily*, IgSF); 2) lektiinsed selektiinid, mida on kirjeldatud seoses leukotsüütide adhesiooniga endoteelile; 3) integriinid, mis on tuntud kui maatriksi retseptorid, kuid võivad vahendada rakkudevahelisi seondusi immunoglobuliinidega; 4) kadheriinid, mis vahendavad rakk-rakuga seondumist homofiilsuse põhimõttel (Joonis 1). Viimast rühma loetakse olulisimaks kudede ja organite moodustumisel, sest suure hulga rakutüüpide spetsiifiline adhesioon sõltub neist niivõrd, et teiste adhesioonimolekulide inaktiveerimine ei mõjuta oluliselt rakukontaktide moodustumist (Hynes 1999; Kemler 1993).



Joonis 1. Raku adhesioonimolekulide homofiilne ja heterofiilne seondumine ekstratsellulaarses maatriksis (ECM) (Sanes jt. 2006).

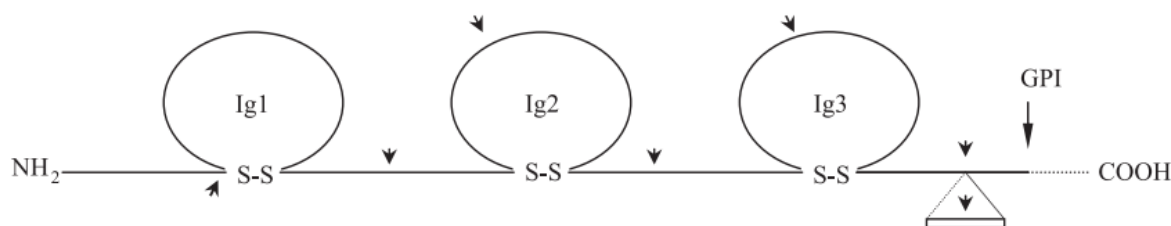
Ig superperekonna (immunoglobuliinide superperekond) adhesioonimolekulide kõik esindajad omavad teatud ühiseid tunnuseid ning on väga stabiilsed ja toimivad vastastikku rakumembraanil erinevate ligandide või retseptoritega. Ig superperekonna adhesioonivalke iseloomustab minimaalselt ühe Ig (immunoglobuliini) domeeni esinemine. Inimgenoom kodeerib 765 vähemalt ühe Ig domeeniga adhesioonimolekuli (Lander jt, 2001). Ig domeenid võivad olla, kas V-varieeruva ehitusega või C-konstantse ehitusega olenevalt nende β -kiudude (β -strand) mustrist. Konstantsed domeenid koosnevad umbes 50st ning varieeruvad domeenid umbes 70-110st aminohappejäägist. Aminohappejäägid moodustavad kahekihilise antiparalleelsete β -kiududega struktuuri, mis moodustavad β -lehti (β -sheet). β -lehed on disulfiidsidemete poolt stabiliseeritud. Hüdrofoobsete aminohapete vahelised interaktsioonid β -lehtedel ja kõrgelt konserveerunud disulfiidsidemed tsüsteiini jääkide vahel muudavad Ig domeenid vastupidavamaks peptiidide proteolüüsile ning on seetõttu suhteliselt stabiilsed rakuvälises keskkonnas (Williams ja Barclay, 1989; Joshi, 1994; Colman ja Filbin, 2006). Paljudel Ig superperekonna liikmetel on närvisüsteemis kindel roll aksonite kasvus ja arengus ning raku tasemel äratundmisel sünapsi loomisel (Reed jt, 2004). Neuriitide kasvamisel esinevad sarnaseid IgCAM-e ekspresseerivate aksonite vahel tihti tõmbejõud. Seega võivad üksikud teedrajavad aksonid, mis ekspresseerivad samu IgCAM-e, suunata järgnevaid aksoneid ekspresseerima omakorda samasuguseid IgCAM-e ja need mõjutada samamoodi järgnevaid aksoneid. Seeläbi saavad teedrajavad aksonid panna aluse suurtele akonaalsetele radadele kesknärvisüsteemis (Pimenta jt, 1996).

1.2 IgLON valguperekond

IgLON valguperekond kuulub Ig superperekonnas raku adhesioonimolekulide (IgCAM) hulka, mis vahendavad rakkude omavahelist seondumist või seondumist rakuvaheainega. IgLON perekond koosneb viiest liikmest: IgLON1 ehk opoide siduv raku adhesioonimolekul (Schofield jt, 1989), IgLON2 ehk neurotrimin/CEPU-1, vastavalt närilise ja kana ortoloogid (Struyk jt, 1995; Spaltmann ja Brümmendorf, 1996), IgLON3 ehk limbilise süsteemiga assotsieeruv membraanvalk, LSAMP (Levitt jt, 1984), IgLON4 ehk klon/*neurotractin*, vastavalt närilise ja kana ortoloogid (Funatsu jt, 1999; Marg jt, 1999) ja IgLON5¹.

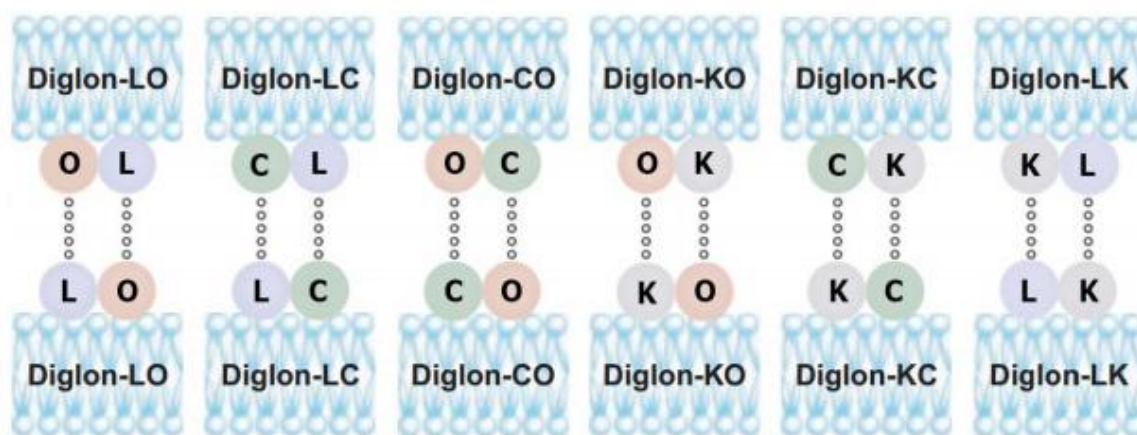
Tüüpiliselt koosnevad IgLON valgud kolmest Ig domeenist ning neile iseloomulik GPI (glükosüül-fosfatidüül-inositol) ankur lisatakse peale translatsiooni valgu

karboksüülterminaalsesse osasse ning see on vajalik valgu ankurdamiseks raku plasmamembraanile. GPI ankur sisaldab glükaanset südamikku, fosfoetanoolamiini lüli ja fosfolipiidset saba (Nosjean jt, 1997).



Joonis 2. Skemaatiliselt esitatud hiire LSAMP valgu struktuur. Joonisel on näha kolme globulaarset Ig struktuuri (Ig1, Ig2 ja Ig 3) ja GPI ankrut. Lühikeste nooltega on märgitud *Lsomp* eksonite splaissimissaidid (Pimenta ja Levitt, 2004).

IgLON perekonna valgud vahendavad neuronite vahelist kontaktide loomist ning suunavad neuronite kasvu õige sihtmärgi suunas vastavalt rakutüübi spetsiifikale kasutades erinevaid mehhanisme (Gil jt, 1998). Senised tulemused näitavad, et IGLON valgud paiknevad peamiselt kolesteroolirikastes lipiidparvedes (Varma ja Mayor, 1998). IGLON valkude võime moodustada neis parvedes omavahel kobaraid aitab stabiliseerida rakkudevahelisi interaktsioone ja võimaldab aktiveerida teiseid virgatsaineid, mille kaudu neuron annab läbi keemilise sünapsi teisele närvirakule edasi närviimpulsi (Ilangumaran jt, 1999; Lodge jt, 2000). Kahe IGLON valgu ühinedes lipiidiparvel moodustub kas hetero- või homodimeer, mida nimetatakse Diglon-ks. Naaberrakkudel paiknevad Diglonid seonduvad omavahel. Neljast valgust saab moodustada kuus erinevat funktsionaalset diglonit (Diglon-CO, Diglon-KC, Diglon-KO, Diglon-LC, Diglon-LK, Dignol-LO) (Joonis 2).



Joonis 3. Võimalikud kahest IGLONist kombineerunud Diglonid. O – OBCAM, L – LSAMP, C – CEPU-1/neurotrimin, K – Kilon. Näiteks moodustuvad dimeeriseerumisel LSAMP ja OBCAM rakumembraanil Diglon-LO (Reed jt, 2004).

Erinevad Digloni paarid võivad sõltuvalt neuronitüübist kas soodustada või inhibeerida neuriitide väljakasvu ja sünapsite moodustumist (Gil jt, 2002; Lodge jt, 2000; Reed jt, 2004).

1.2.1 LSAMP

Lsamp (ingl *limbic system- associated membrane protein*, LSAMP) geen kodeerib 64- kuni 68- kDa suurust glükoproteiini. Nimi tuleneb algsest ekspressioonianalüüsist, milles tuvastati avaldumine eelkõige limbilise süsteemiga seotud ajustruktuuridest. Tänapäevaks on teada, et *Lsamp* kahest alternatiivsest promootorist üks (1a) on tõesti limbilise süsteemi spetsiifiline, kuid 1b promootor on enamasti aktiivne taalamuse sensoorsetes tuumades ja kortikaalsetes sensoorsetes alades, kuid samuti alades, mis reguleerivad stressi (Philips jt, 2015; Levitt, 1984; Zacco jt, 1990).

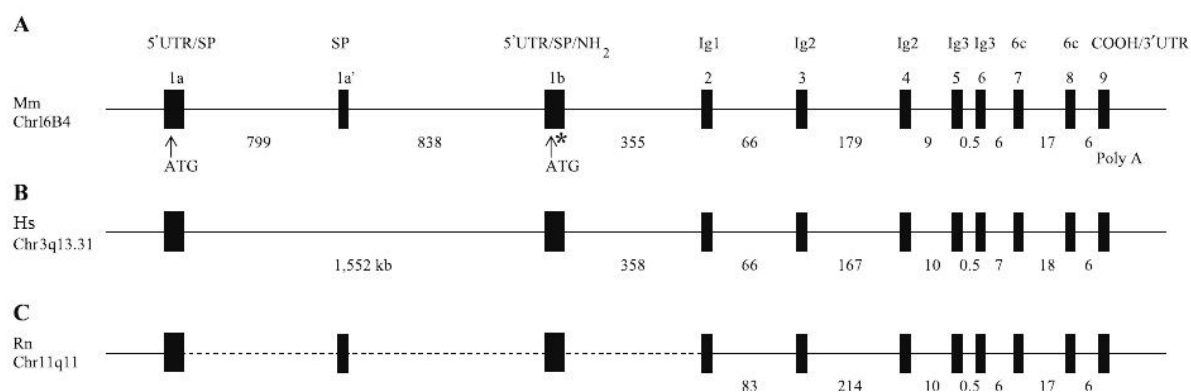
Lsamp geen on liikide vahel tugevalt konserveerunud. Näiteks on inimese ja roti ortoloogide vahel 94% DNA järjestuste kattuvus ja 99% valgujärjestuse kattuvus. 338 aminohappest erineb vaid neli ning antud erinevus ei muuda valgu tertsiaarstruktuuri (Pimenta ja Levitt, 2004).

Lsamp ekspressioon on roti ajus määratav embrüonaalse arengu 15. päeval (E15). *Lsamp* avaldub varajases lootelises arengus aksonite pinnal. Täiskasvanud isendis *Lsamp* ekspressioon aksonitel puudub. Ekspressioon esineb hoopis peale sünapsi moodustumist rakukehal ja selle jätketel. Kuna postsünaptiliselt on *Lsamp* määratav ainult rakukehal ja selle jätketel ning mitte enam aksoni pinnal, leiab *Lsampi* avaldumise korral aset ilmselt funktsiooni osaline muutumine arengu käigus (Lajtha, A jt, 2007). Arenevas hiire ajus on näidatud *Lsamp* valgu osalemine akson-akson signalisatsioonis, mille puhul *Lsamp* positiivsed Habenula tuumast keskajus paiknevasse VTA-sse lähtuvad aksonid juhivad VTA dopaminergiliste aksonite jõudmist lateraalsesse habenula tuuma (Schmidt jt 2014).

Inimese puhul on näidatud, et *Lsamp* geeni polümorfismid on seotud paanikahäirete, meeleoluhäirete, suitsiidsuse ja depressiivsusega (Koido jt, 2006; Must jt, 2008; Koido jt, 2012). Skisofreeniahaigetel ja bipolaarsete häiretega patsientidel on autopsia käigus täheldatud LSAMP valgu kontsentratsiooni 20%-list tõusu otsmikukoos, mis viitab LSAMPi seotusele psühhiaatriliste häiretega (Behan jt, 2009).

Lsamp geenil on näidatud kahe esimese eksoni ja promootori 1a ja 1b olemasolu. Inimesel asub *LSAMP* geen 3. kromosoomis ning on 2,2 Mb suurune. *LSAMP* koosneb 11 eksonist

ning sisaldab kahte eksoni ühte (1a ja 1b), mis paiknevad üksteisest 1.6 Mb kaugusel. Hiirel paikneb *Lsamp* geen 16. kromosoomis ja on 2.28 Mb suurune, sisaldades samuti 11 eksonit, kuid erinevalt inimesest kolme eksoni ühte (1a, 1a' ja 1b) (Joonis 4). Ekson 1a' ei oma eraldi promotorit, nii nagu 1a ja 1b. Eksonid 1a ja 1b kodeerivad alternatiivseid N-termiaalseid signaalpeptiide, mis valgu küpsemisel ära lõigatakse. Seega 1a ja 1b mRNA pealt tulevad valgujärjestused on lõpuks identsed. Lisaks esineb LSAMP mRNA-del alternatiivne splicing, mille puhul võidakse eemaldada eksonid 7 ja 8 nii, et lühemal peptiidil on karboksüülterminaalse otsa lähedal 23 aminohapet vähem (Pimenta ja Levitt, 2004).



Joonis 4. Intronite ja eksonite paiknemise võrdlus LSAMP ortoloogide vahel hiire (A), inimese (B) ja roti (C) geenides (Pimenta ja Levitt, 2004).

1.2.2 Kilon/Negr1

Kilon avaldub närvisüsteemis ning on määratav hiire embrüonaalse arengu 16. päeval (E16), millest alates ekspressioonitase kasvab. Arengu käigus ekspresseerub Kilon suuraju koos, ajutüves, hipokampuses ja vähesel määral väikeajus. Täiskasvanud rotis avaldub Kilon peamiselt haistesibulas, suuraju koos, vaheajus, hipokampuses ja väikeajus ning esineb antud regioonides neuronite rakukehal (Lajtha, A 2007). Kilon on valdavalt määratav postsünaptiliselt neuroni rakukehal ja dendriitidel (Funatsu jt, 1999). Willer jt (2209) seostasid Kilonit täiskasvanute ülekaalulisusega ning samuti Zhao jt (2009) on näidanud, et Kiloni avaldumine on seotud laste kõrge kehamassi indeksiga. Lisaks on Kilonil kirjeldatud tuumorsupressori funktsiooni kesknärvisüsteemis (Takita jt, 2011).

1.2.3 OBCAM

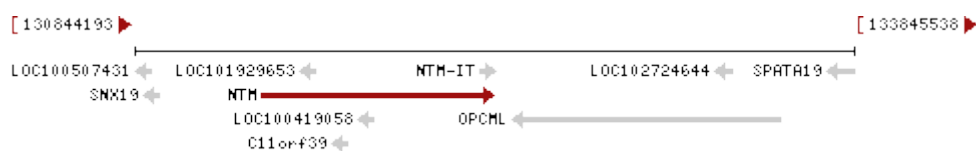
OBCAM geen kodeerib valku, mis on valdavalt ekspresseeritud ajus kuid vähemal määral samuti põrnas, südames, platsentas, kopsudes, neerus, pankreases, testites ja käärsooles. *Obcam* esinemine on määratav roti ajus samuti embrüonaalse arengu 16. päeval (E16) nagu Kilon. Arengu käigus avaldub *OBCAM* erinevates aju osades: haistesibulas, suurajukoos, hipokampuses, juttkehas, septumis, taalamuses, hallolluses, väikeaju koos, väikeaju tuumades, ajutüve tuumades ja seljaajus. Täiskasvanud roti ajus ekspressioonimuster muutub, esinedes peamiselt suuraju koos, hipokampuses, vähemal määral haistesibulas ja vaheajus ning madal ekspressioon esineb ka väikeajus, piklikajus ja seljaajus. Ekspressioon jaotub kahe isovormi vahel, millest levinum on 51- kDa isovorm, ainult väikeajus ja haistesibulas esineb 46- kDa vorm. Täielikult diferentseerunud hippokampuse ja kortikaalsetel neuronitel avaldub *OBCAM* rakukehal ja dendriitidel. *OBCAM* võib käituda munasarja epiteeli vähi korral kui tuumorsupressor geen, samuti on *OBCAM*i sarnaselt Kiloniga seostatud kesknärvisüsteemi kasvajatega (Takita jt, 2011; Sellar jt, 2003; Lajtha jt, 2007; Reed jt, 2004). On näidatud, et *OBCAM*i ekspressioon on oluline heterotrimeersete G-valkude vahendatud opioidide signalisatsiooniks. Vähenenud *OBCAM*i ekspressioon vähendab opioidide seondumist rakkudega (Ann jt, 1992; Govitrapong jt, 1993).

1.2.4 Neurotrimin

Neurotrimin kodeerib valku, mis võib inimesel edendada neuriitide väljakasvu ja adhesiooni läbi homofiilsete mehhanismide (Sellar jt, 2003). Struyk jt (1995) kloonisid roti *Neurotrimiini* geeni ja viisid läbi *northern blot*'i analüüsi mitmete roti kudede, kuid ekspressiooni märgati vaid roti ajus, täpsemalt: ajukoos, taalamuses, haistesibulates, basaalganglionides ja väikeaju granulaarses rakukihis. Gil jt, (2002) tegid samuti *in situ* hübriidsatsiooniga kindlaks tugeva ekspressiooni areneva roti erinevates aju struktuurides: taalamuse neuronites, alusplaadil, eesaju kortikaalplaadil, *pontine* tuumas, väikeaju granulaarses kihis ja Purkinje rakkudes. *Neurotrimin* on tugevalt ekspresseeritud närvisüsteemi sensoorses ja motoorses korteksis ja eraldiseisvalt on lühiajaliselt ekspresseeritud ajukoore neuronitel ja vastavalt taalamuse "barreloididel". Arvatakse, et *Neurotrimini* funktsioon avaldub neuronaalses arengus, aksonite kasvul ja sünapsi moodustumisel, näidates samal ajal kõrgelt piiratud ekspressioonimustrit täiskasvanud hiire ajus (Lein jt, 2007). Sünnihetkel (P0) avaldub

Neurotrimin järgnevates ajuosades: haistesibulas, olfaktoorses ajukooses, keskajus, taalamuses, hüpotaalamuses, hipokampuses, basaalganglionis ja kortikaalplaadil. Arengu käigus avaldub müelineerimata aksonitel, kuid hilisem avaldumine domineerib sünaptilistes ühenduskohtades (Lajtha, A 2007). Liu jt (2004) leidsid, et *Neurotrimini* ekspressioon loote ajus on kõrgem kui täiskasvanud ajus ja on seejuures ka tugevam närvisüsteemi kasvajates kui normaalsetes aju kudedes. *Neurotrimin* asub 11. kromosoomi väikse õla regioonis (11q25) ning seal piirkonnas esinevad polümorfismid on seotud erinevate haigustega: Alzheimeri tõvega (Blacker jt, 2003), tähelepanu puudulikkusega, hüperaktiivsusega (Ogdie jt, 2003), autismiga (Vorstman jt, 2006) ja depressiooniga (Schol-Gelok jt, 2010). Alzheimeri tõve sesostumist 11q25 kromosoomipiirkonnaga on tõestanud ka Liu jt (2007) ja Baye jt (2008). Lisaks seostatakse *Neurotrimini* geenis nelja üksiku nukleotiidi polümorfismi (SNP- *single nucleotide polymorphisms*): rs1629316, rs1547897, rs1122931, ja rs11222932 esinemist mõjuga kognitiivsetele funktsioonidele. Leiti erinevad sooritustulemused kognitiivse funktsiooni testides, millest üks oli järgnevustest (*Trail Making Test*) ja teine fonoloogilise soravuse test (Liu jt 2007). Pan jt (2011) viisid läbi replikatsioonianalüüsid kasutades IMAGE (*International Multi-Center ADHD Genetics Project*) andmestikku. Leiti, et kakskümmend kaks üksiku nukleotiidi polümorfismi (SNP) mõjutavad IQ-d ja 11 neist asuvad juba varem tuntud geenides. Geenid, mida varem ei oldud seostatud IQ-ga olid *Neurotrimin* kromosoomipiirkonnas 11q25 ja NR3C2 piirkonnas 4q31.1.

Kasutades Ameerika Biotehnoloogia Keskuse (*National Center for Biotechnology, NCBI*) geenide andmebaasi otsingut, on seal näidatud, et *Neurotrimin* on inimese 11. kromosoomis lähedalt lingitud IGLON perekonnaliikme *OBCAM*-iga (Joonis 5).² *NTM* asub umbes 80 kb eemal *OBCAM*-st varstupidises orientatsioonis (Sellar jt, 2003). *NTM* ja *OBCAM*-i aminohappe järjestus kattub 70 %. Näiteks hiljutine uuring on seostanud *NTM* ja *OBCAM* ekspressiooni muutusi autismi-laadsete arenguhäiretega (Minhas jt, 2013).



Joonis 5. Inimese 11. kromosoomi pikema õla subtelomeraalses alas q12.1 regioonis on *Neurotrimin* ja *OBCAM* on lähedalt lingitud.²

Füsioloogia osakonnas tehtud analüüside avaldamata tulemused näitavad, et sarnaselt *Lsamp* geenile on ka *Obcam*-il ja *Neurotrimin*-il kaks alternatiivset promootorit.

1.3 Kesknärvisüsteemi anatoomia

Kesknärvisüsteem ja selle osad võtavad vastu ja töötlevad informatsiooni kõigilt organismi osadelt ja koordineerivad nende tegevust. Kesknärvisüsteemi moodustavad pea- ja seljaaju. Peaaju koosneb kuuest suuremast regioonist: suurajust (*cerebrum*), vaheajust (diencephalon), keskajust (*mesencephalon*) sillast (*pons*), väikeajust (*cerebellum*) ja piklikajust (*medulla oblongata*). Keskaju, sild ja piklikaju moodustavad ajutüve.

Aju poolkerad on suurim regioon inimese ajus. Need koosnevad suurajukoorest, mille all on kolm sügaval asetsevat struktuuri: basaalganglion, amügdala ehk madelkeha ja hipokampuse osad. Ajupoolkerad on seotud tajumise, liigutuste ja kognitiivsete funktsioonidega. Hipokampus on oluline õppimisvõimes ja mälu kujunemises, võrdlevad mäluprotsessid võimaldavad hinnata keskkonnast saadud teabe tähtsust võrreldes eelnevate emotsionaalselt oluliste kogemustega (Squire jt, 2007). Imetajate hipokampuse hammaskäär osaleb uute mälestuste eristamisel vanadest, võimendades entorinaalsest korteksist lähtuvaid närvisignaale (Treves jt, 2008). Suuremad muutused keskkonnas põhjustavad esmalt hipokampuse ja järgnevalt amügdala aktivatsiooni ning kujundavad seeläbi käitumusliku vastuse (Fudge jt, 2012). Amügdalat on ajalooliselt peetud oluliseks emotsionaalse ja sotsiaalse käitumise kujunemisel. Eriti on amügdalat seostatud ärevuskäitumise ja hirmu kujunemisega. Metsiku šimpansi amügdala bilateraalsel eemaldamisel saadakse taltsas loom, kes ei reageeri enam hirmustiimulile (Klüver ja Bucy, 1939).

Vaheaju koosneb kahest suuremast osast: taalamusest ja hüpotaalamusest. Talamus on vaheaju suurim osa ja kujutab endast tuumade kogumit, mis kannab üle sensoorset informatsiooni. Varem arvati, et taalamus on vaid sensoorse informatsiooni vastuvõtja, kuid nüüd on selge, et taalamus määrab, kas sensoorne informatsioon jõuab teadlikusse teadvusesse neokorteksis. Taalamus osaleb motoorse informatsiooni integratsioonis väikeajust ja basaalganglionidest suurajukooste. Hüpotaalamus asub ventraalselt taalamusest ja reguleerib homeoöstaasi ja reproduktsiooni. Peamiselt kontrollib hüpotaalamus kehalisi funktsioone: kasvu, söömist, joomist, emahoolt, reguleerides ajuripatsi hormonaalset sekretsiooni.

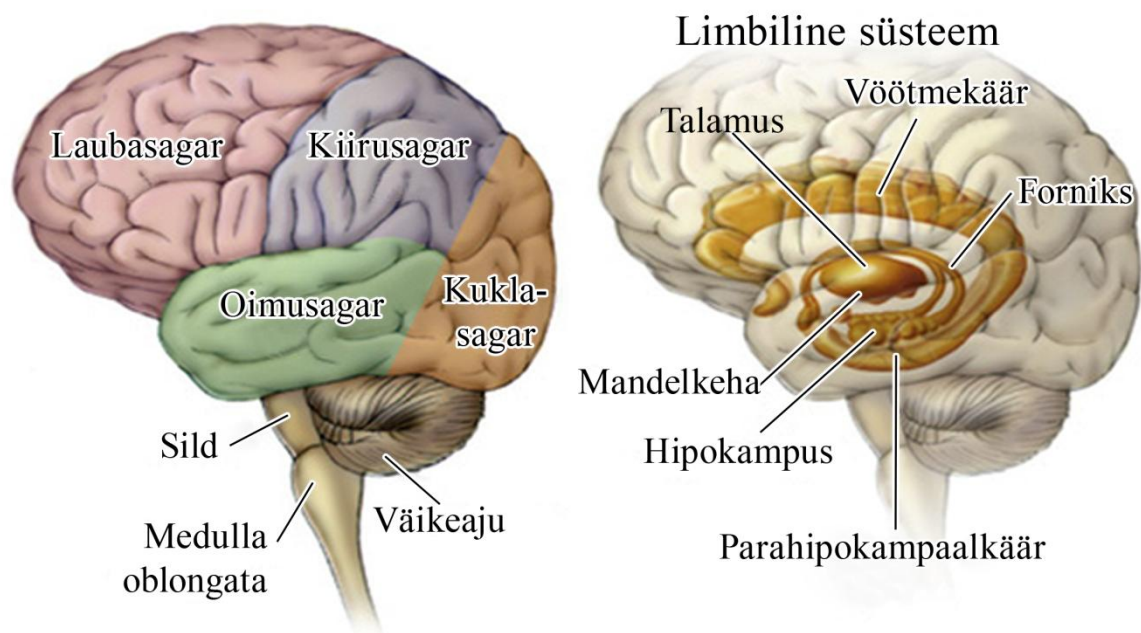
Keskaju on väikseim osa ajutüvest ning asub rostraalselt sillaga. Keskaju neuronid võimaldavad motoorse süsteemi tähtsaid ühendusi, eriti väikeaju, basaaltuuma ja peaaju poolkerade vahel. Näiteks keskaju tuum, mustaine (*Substantia nigra*) on tume mass, mis jääb

punatumade ja suuraju varte vahele ning mille must värvus tuleneb melaniini graanulite rohkest sisaldusest. Mustaine osaleb lihaste toonuse ja koordinatsiooni reguleerimises. Mustaine esineb ainult inimese ajus, selle vigastuse korral on liigutustegevus oluliselt häiritud, näiteks Parkinsoni tõve korral. Keskajus on ka piirkonnad, kus on auditoorsed ja visuaalsed süsteemid.

Sild asub rostraalselt piklikajuga ja moodustab ajutüve ventraalse osa. Sild sisaldab analoogiliselt piklikajuga erinevaid tuumasid. Tuumad, mis paiknevad silla eesmises osas on seotud eelkõige informatsiooni vahendamisega suurajust väikeajusse. Sillas paiknevad unekekeskus ja hingamiskeskused.

Piklikaju osaleb vererõhu regulatsioonis ja respiratsioonis. Piklikaju sisaldab erinevaid tuumasid, mis osalevad maitsmises, kuulmises ja tasakaalu hoidmises kui ka kaela ja näolihaste kontrolli hoidmises.

Väikeaju asub sillast dorsaalselt ning sisaldab võrreldes teiste kesknärvisüsteemi osadega kõige rohkem neuroneid. Ta jaguneb kaheks poolkeraks ja nende vahele jäävaks ussiks. Väikeaju saab somatosensoorseid signaale seljaajust ja motoorset informatsiooni ajukoorest. Väikeaju on oluline tasakaalu hoidmisel ning pea ja silma liigutuste koordineerimises. Varem arvati, et väikeaju on vaid motoorne struktuur, kuid tänapäeva modernsed kompuuteremissioontomograafilised uuringud on näidanud, et väikeaju on seotud keele ja teiste kognitiivsete funktsioonidega (Kandel jt 2000).



Joonis 6. Põhilised aju struktuurid. Vasakul joonisel on kujutatud aju vaadet vasakult poolt, kus on märgitud põhilised sagarad: laubasagar, kiirusagar, oimusagar ja kuklasagar ning ajutüve struktuurid: väikeaju, sild ja piklikaju. Paremal joonisel on näha külgvaade, mis näitab limbilise süsteemi asukohta ajus. Limbiline süsteemi kuuluvad hipokampus, parahipokampaalkäär, võõtmekäär, mandelkeha, taalamuse osad ja forniks.³

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärk

Kirjeldada *Neurotrimini* ja *Obcami* alternatiivsete promootorite (1a ja 1b) ekspressiooni piirkondi hiire aju kasutades *in situ* hübriidisatsiooni meetodit.

2.2 Materjal ja meetodika

2.2.1 Hiireliinid

In situ hübriidisatsiooniks kasutati metsiktüüpi C57BL/6 Bkl (B6) liini hiiri.

2.2.2 Kasutatud plasmiidid

In situ hübriidisatsiooni RNA proovide sünteesimiseks kasutati plasmide pBS(KS+), millesse NotI ja SalI saitide kaudu oli sisestatud 400-500 bp *Neurotrimini* ja *Obcami* promootor-spetsiifilised ampliconid metsiktüüpi C57BL/6 Bkl (B6) liini hiirte hipokampuse cDNA-st. Kõik plasmiidid olid disainitud nii, et *antisense* orientatsioonis sondi transkribeerimiseks saaks kasutada T3 RNA polümeraasi ning plasmidi lineariseerimiseks NotI restriктаasi.

2.2.3 RNA in vitro transkriptsioon

Neurotrimin ja *Obcam antisense* RNA proovide süntees promootoritelt 1a ja 1b viidi läbi 20 µl-is kogumahas. *In vitro* transkriptsiooniks kasutati transkriptsioonipuhvrit lõppkontsentratsiooniga 1x (Roche), 1 µg/ml DIG märgistatud nukleotiidide segu (Roche), 0,05 µg/ µl lineariseeritud plasmidi, 20U RNAasi inhibiitorit (Roche) ja 20U RNA polümeraasi T3. Transkriptsioon toimus 37°C juures 2 tundi ning selle toimumist kontrolliti 1% agarosgeeli geelelektroforeesil. Selleks, et vabaneda plasmiidest DNAs, lisati lahusesse RNAasi vaba DNAs I-e (1 U/µl; Thermo Scientific) ning inkubeeriti 37°C juures 15 minutit. RNA sadestati üleöö -20°C juures LiCl ja etanooliga. Sadenenud RNA tsentrifugeeriti põhja 4 °C 10 minutit 13 000p/min (Eppendorf Centrifuge 5810 R) juures ning seejärel pesti 70%-

lise etanooliga. Sadestatud RNA lahustati 80 µl –s 50%-lises formamiidis (kontsentratsioonid jäid vahemikku: 125-276 ng/ µl). ning säilitati -20°C juures.

2.2.4 Ajukoe ettevalmistamine hübriidsatsiooniks

Hiirtel dissekteeriti peaju, mis fikseeriti 4%-lises PFA/PBSis 5 ööpäeva 4 °C juures. Külmutuslõikude valmistamiseks krüoprotekteeriti ajusid üleöö 20%-lise sahharoos 4% PFA/PBSis lahuses ning säilitati kuni edasiste tööstlusteni külmutatult -80°C juures. Ajud lõigati krüomikrotoomiga (Microm HM-560) -20°C juures 40 µm paksusteks lõikudeks, misjärel pesti kaks korda toatemperatuuril 1x PBSis, millele oli rakumembraanide permeabiliseerimiseks lisatud 0.25% Triton-X100.

2.2.5 Prehübriidsatsioon

Järgnevalt pesti lõike toatemperatuuril loksutil 5x SSCga (pH5) ning seejärel asetati lõigud prehübriidsatsioonilahusesse (50% formamiid, 5x SSC, 2% BR Blocking Reagent; Roche) ning eelhübriidiseeriti 65°C juures loksutil tund aega.

2.2.6 Hübriidsatsioon

Hübriidsatsiooniks kasutatavat RNA proovi kuumutati denatureerimise eesmärgil 83°C juures 5 min ning jahutati koheselt jääl. Ujuvlõikude hübriidsatsiooniks segati digoksygeniiniga märgistatud RNA proov prehübriidsatsioonilahusega (1 µg/ml) (50% formamiid, 5x SSC, 1% BR (Blocking Reagent; Roche). Hübriidsatsioon toimus 65°C juures loksutil üleöö.

2.2.7 Hübridisatsioonijärgsed pesud ja immunohistokeemia

Järgmisel päeval pesti lõike 65°C juures 30 minutit lahusega 1 (50% formamiid, 5x SSC pH5, 1% SDS), millele järgnes 60°C juures 2x 30 minutit pesu lahusega 2 (50% formamiid, 2x SSC pH5). Seejärel loputati lõike toatemperatuuril kolm korda 5 min 1x TBSTga (25 mM Tris-HCl pH 7.5, 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.1% Tween20). Selleks et ei toimuks mittespetsiifilist antikeha sidumist, blokeeriti lõike tund aega 2% blokeerimislahusega (2% blocking reagent (Roche), 1x TBST) ning seejärel inkubeeriti DIG-vastase antikehaga, millele on lisatud aluseline fosfataas (DIG-Digoxigenin-AP Fab fragments, Roche) 1%-lises blokeerimislahuses (1:2000) üleöö +4°C juures loksutil. Kolmandal päeval pesti lõike 3x 10 minutit toatemperatuuril loksutil 1x TBSTs, seejärel 2x 10 minutit NTMTs (100 mM Tris-HCl pH 9.5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, 0.1% Tween20).

Lõikudele lisati värvilahus BM purple (Roche), mille lisamise tagajärjel ensüüm aluseline fosfataas muudab väritu ühendi tumelillaks sademeks. Lõikudel lasti värvuda piisava intensiivsuse saavutamiseni ning reaktsioon peatati lõikude töstmisega PBSi. Koelõigud asetati 0,5%-lise želatiiniga kaetud alusklaasidele, lasti kuivada ning sulundati Pertex sulundusvedelikku.

2.2.8 Mikroskopeerimine

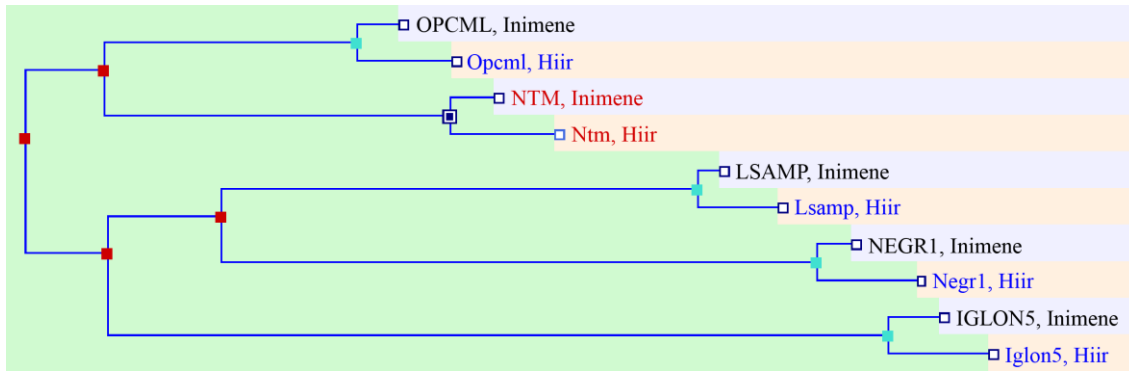
Koelõikude pildistamiseks kasutati mikroskoopi Olympus BX51 ja kaamerat Olympus DP71. Pilte töödeldi arvutiprogrammiga Adobe Photoshop CS3.

2.3 Tulemused ja arutelu

2.3.1 IgLON perekonna geenide põlvnemine

Geenide põlvnemist saab kindlaks teha võrdleva genoomikaga, mille puhul võrreldakse geenijärjestusi organismide vahel. Inimese ja hiire genoomid on peaaegu sama suured ning jagavad ka ligikaudu samasugust geenikomplekti. Seetõttu saame kasutada hiire genoomi järjestust inimese genoomi tõlgendamisel ja inimese geeni funktsioonide identifitseerimiseks ja uurimiseks. 90.2% inimese ja 93.3% hiire genoomist asetseb nn konserveerunud segmentides. Ortoloogsed geenid on geenid, mis on pärandunud ühisest eellasgeenist tütarliikidele ehk esinevad erinevate liikide vahel. Paraloogsed geenid erinevad ortoloogsetest geenidest selle poolest, et on tekkinud ühisest eellasgeenist selle geeni duplitseerumise tulemusena, ehk esinevad ühe liigi piires. Hiire ja inimese ortoloogsete geenipaaride vahel on ka geeni struktuur väga kõrgelt konserveerunud. 80% hiire geenidest omavad üks-ühest ortoloogi inimese genoomis (Waterston jt 2002).

Antud töös (joonis 7) kasutati ENSEMBL andmebaasi, mis pakub erinevate järjestuste mitmekesisest analüüsi ning andmete erinevaid visuaalseid vaateid. Rekonstrueeriti fülogeneetiline puu, mis näitab IgLON valguperekonna valkude: OPCML, NTM, LSAMP, NEGR1 ja Iglon 5 põlvnemist ühisest eellasest nii inimese kui hiire näitel. *NTM* geenil on 85 ortoloogi ja 4 paraloogi. Joonisel 7 on näha inimese ja hiire ortoloogseid IgLON perekonna genee. Geenipuul on näha, et IgLON geeniperekonna paraloogsed geenid on tekkinud ühisest eellasest mitmete duplikatsioonide käigus (märgitud joonisel punaste kastidega). Juur on kõigi antud puud moodustavate taksonite eellane, so hiljutisim ühine eellane (*most recent common ancestor*). Molekulaarses fülogeneetikas kasutatakse DNA järjestusi (A, T, C, G) või aminohappelisi järjestusi. Selle puu konstrueerimisel on kasutatud aminohappelisi järjestusi ning harude pikkused on vastavuses muutuste (mutatsioonide) arvuga. Sisemised sõlmed geenipuul näitavad eellasgeeni lahknemist kaheks geeniliiniks, nende geenide DNA järjestused on muteerumise tulemusena erinevaks muutunud. Selle geenipuu puhul korreleerub geneetiline kaugus fülogeneetilise kaugusega, see tähendab, et töötab nn molekulaarne kell, mis igas puu harus ühtlase kiirusega mutatsioone juurde „tiksub“. Kui evolutsioon on toimunud eri liinides erineva kiirusega, siis distantsmeetod konstrueerib erinevate haru pikkustega puu.⁵



Joonis 7. IgLON geenipuu kujutab paralooide: *Opcml*, *Ntm*, *Lsamp*, *Negr1* ja *IGLON5* geeniliinide põlvnemissuhteid. Punased sõlmed geenipuul näitavad eellasgeeni lahknemist kaheks geeniliiniks. Joonise loomisel kasutati ENSEMBL andmebaasi. Kokku on antud geenipuul 325 geeni, millest lehekülje seadistuses on peidetud 315 ehk antud joonisel on näha vaid IgLON perekonna geene. Samuti on lehekülje seadistuses nähtavaks tehtud vaid inimese ja hiire ortoloogid.⁴

Geenipuul (Joonis 7) on näha, et IgLON perekonna ühise eellasgeeni duplikatsiooni käigus tekkis kaks geeniliini. Ühe geeniliini edasisel lahknemisel tekkisid ühest sõlmest *Lsamp* ja *Kilon* ja teisest sõlmest *Iglon5*. Teise geeniliini duplitseerumise käigus on tekkinud *Neurotrimin* ja *Obcam*.

2.3.2 Alternatiivsete promootorite 1a ja 1b ekspressioonid

Füsioloogia osakonnas on varem kirjeldatud ja analüüsitud *Lsampi* 1a ja 1b promootorspetsiifilist ekspressiooni. Töörühma poolt tehtud analüüside avaldamata tulemused näitavad, et sarnaselt *Lsamp* geenile on ka *Obcam*-il ja *Neurotrimini*-il kaks alternatiivset promootorit. Kuna 1a ja 1b promootoritelt tulev mRNA erineb vaid 5'järjestuse poolest (promootorspetsiifiline järjestus kodeerib N-terminaalset signaalpeptiidi), siis on lisaks promootor-spetsiifilisele ekspressioonile võimalik analüüsida ka mõlema promootori summaarset ekspressiooni kasutades universaalselt järjestuselt sünteesitud hübriidisatsiooniproovi. Universaalse prooviga hübriidisatsioonipildid on leitavad Alleni ajuatlasest (*Allen Brain Atlas*).⁶ Kuid universaalse prooviga hübriidisatsioonipildid ei anna meile ülevaadet eri promootorite transkriptide spetsiifikast. Sellest lähtuvalt sai minu töö eesmärgiks kirjeldada alternatiivsete promootorite spetsiifilist ekspressiooni hiire ajus. *Neurotrimini* ja *Obcami* promootor-spetsiifilise ekspressiooni tuvastamiseks kasutati mRNA *in situ* hübriidisatsiooni meetodikat. Matriitsiks RNA proovidele kasutati Füsioloogia

osakonnas eelnevalt valmistatud plasmiide, mis sisaldasid eksonite 1a ja 1b algusosa ning neile eelnevat 5' UTRi (spetsiifilised vastavalt 1a ja 1b promootorilt tulevale mRNAle).

2.3.2.1 *Neurotrimini* 1a ja 1b promootorite ekspressioon

Joonisel 8 on välja toodud *Neurotrimini* geeni kahe alternatiivse promootori spetsiifiline ekspressioonimuster hiire ajus. Mõlema promootori aktiivsus on detekteeriv (joonis 8, A - H) primaarses auditoorses alas (PAA, joonis 8, B, C, E, F, G), kiirusagara assotsiatsiooni piirkonnas (KA, joonis 8, C, G), primaarses somatosensoorses alas (PSA, joonis 8, C, F), dorsaalses striatumis negatiivse gradiendiga anterioosel-posterioosel teljel (Str, joonis 8, A, B, E, F) ning ventraalses striatumis on aktiivne eelkõige 1b.

Kui üldjoontes on ajukoos 1a ja 1b esindatus suhteliselt sarnane, siis erinevusena saab välja tuua olfaktoorses ajukoos e piriform koore, milles 1b ekspressioon ületab 1a oma (Pir2, joonis 8, A, B, C, E, F, G).

Hipokampuses on 1a ekspressioon tugev eelkõige CA1 (CA1, joonis 8, B, F, G) piirkonnas, posterioorsematel lõikudel on nõrgem signaal nähtav ka hammaskäärus ja CA3 piirkonnas (HK, CA3, joonis 8, B, C, F, G). Erinevalt 1a-st, on 1b ekspressioon nähtav ühtlaselt üle kogu hipokampuse. Struyk jt (1995) ei täheldanud üldekspressiooni hipokampuse hammaskäärus. Alleni ajuatlase jägi (universaalne proov) on ekspressioon täheldatav ainult CA1 piirkonnas, puududes CA3 ja hammaskäärus (CA1, CA3, HK joonis 8, J, K). Alleni ajuatlase ja antud töö ekspressiooni erinevused CA3 ja hammaskäärus piirkonnas võivad tuleneda erinevate proovide kasutamisest: kui Alleni atlas on kasutatud universaalset proovi, siis antud töös oli kasutatud 5' unikaalseid järjestusi. Võimalik, et 5' transkriptide suurem esindatus on tingitud alternatiivsest splaissingust.

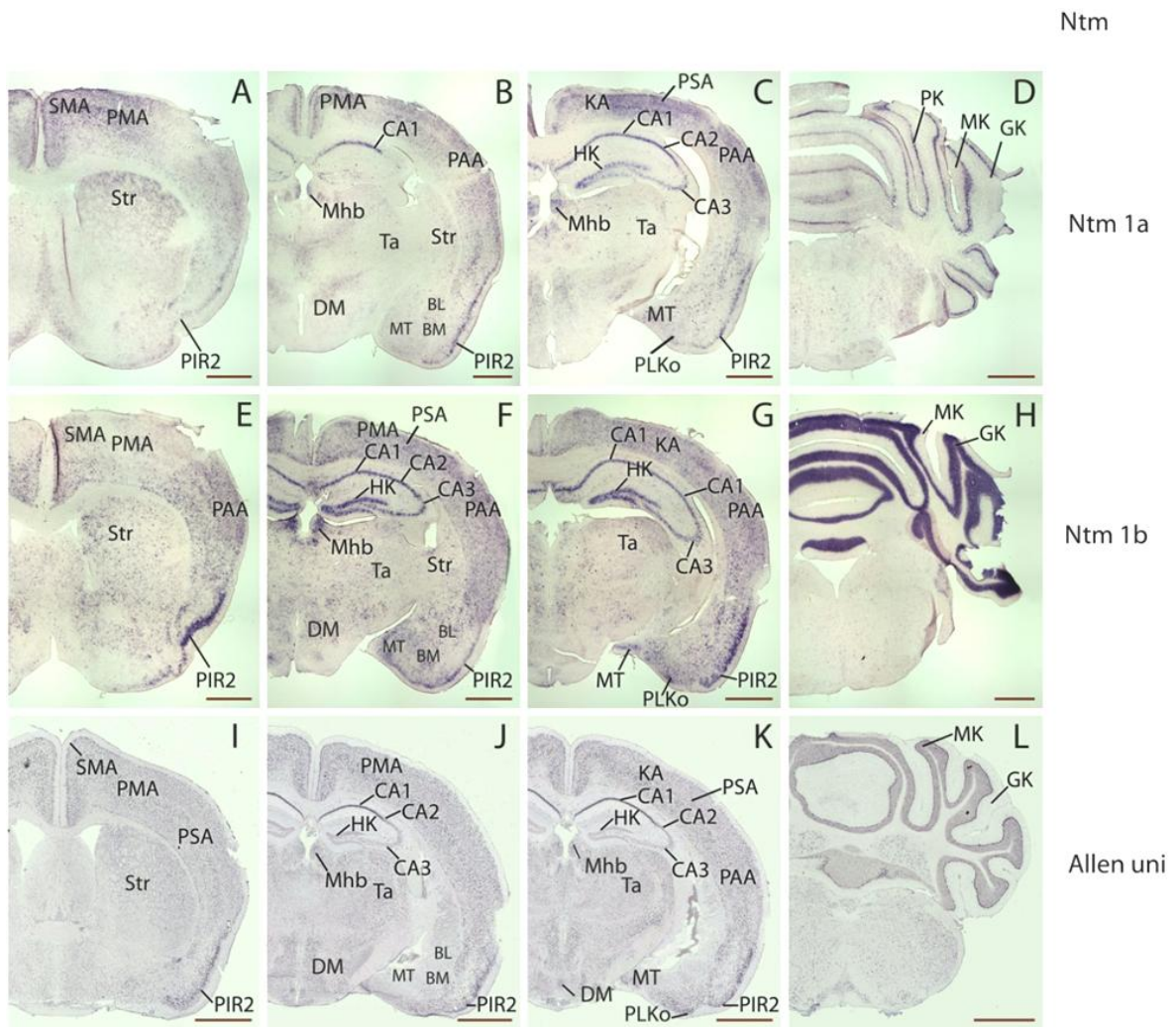
Mandelkehas ehk amügdalas on spetsiifiliselt aktiivsem 1b promootor, mis ekspresseerub eelkõige amügdala mediaalses (MT, joonis 8, B, C, F, G), basolateraalses (BL, joonis 8, B, F), basomediaalses (BM, joonis 8, B, F) ning posterolateraalses kortikaalses tuumas (PLKo, joonis 8, G).

Vaheajus on aktiivsem 1b promootor: ekspressioon on täheldatav mediaalses habenulas (Mhb, joonis 8, B, C, F), hajusalt üle kogu taalamuse (Ta, joonis 8, F, G, J, K) ning hüpotalamuse dorsomediaalses tuumas (DM, joonis 8, B, F).

Kõige vastandlikumalt on alternatiivsed Neurotrimini promootorid ekspresseerunud väikeajus. Kui 1a on selektiivselt aktiivne vaid Purkinje rakkude kihis (PK, joonis 8 D), siis 1b on aktiivne vaid granulaarrakkudes (GK, joonis 8, D, H).

Katse andmed kattuvad eelnevalt kirjanduses välja toodud üldekspressiooni tulemustega, kus tehti *in situ* hübriidsatsiooniga kindlaks ekspressioon olfaktoorses ajukoores, hüpotalamuses, hipokampus, sensoorses ja motoorses korteksis, taalamuses, väikeaju granulaarses rakukihis ning Purkinje rakkudes. (Lajtha, A 2007; Gil jt 2002).

Kui varasemad tööd on vaadanud summeeritult 1a ja 1b promootoreid, siis antud töös on esmakordselt kirjeldatud alternatiivete promootorite poolt algatatud ekspressioonid.



Joonis 8. Neurotrimin 1a ja 1b promootori spetsiifiline ekspressioon hiire ajus. *in situ* RNA hübridisatsioon. Promootor 1a transkripti-spetsiifiline proov (A, B, C, D), promootor 1b spetsiifiline proov (E,F,G,H) ning universaalne proov (I, J, K, L) Alleni aju atlasest (Allen uni).⁶ Pir2 - olfaktoorne ajukoos, KA-kiirusaga assotsiatsiooni piirkond, PAA - primaarne auditoorne ala, PSA - primaarne somatosensoorne ala, PMA - primaarne motoorne ala, SMA - sekundaarne motoorne ala, Str- Striaatum, CA1- hipokampuse *Cornu ammonis 1* piirkond, CA2 - hipokampuse *Cornu ammonis 2* piirkond, CA3 - hipokampuse *Cornu ammonis 3* piirkond, HK- hammaskäär, BL - amügdala basolateraalne tuum, BM - amügdala basomediaalne tuum, PLKo - amügdala posterolateraalne kortikaalne tuum, MT - amügdala mediaalne tuum, DM- hüpotalamuse dorsomediaalne tuum, Mhb - mediaalne habenula, MK - väikeaju molekulaarne kiht, GK - väikeaju granulaarne rakukiht, väikeaju Purkinje rakkude kiht (PK). Mõõtkava on A-H 1 mm ning I-L 1, 029 mm.

2.3.2.2 *Obcam* 1a ja 1b promootorite ekspressioon

Joonisel 9 on välja toodud *Obcam* geeni kahe alternatiivse promootori ekspressioonimuster hiire ajus. Mõlema promootori aktiivsus ajukoos on detekteeritav (joonis 9, A - H) olfaktoorses ajukoos (PIR2, joonis 9, A, B, C, E, F, G), kiirusagara assotsiatsiooni piirkonnas (KA, joonis 9, C, G) ja primaarses auditoorses alas (PAA, joonis 9, B, G). *Obcam* 1a promootori ekspressioon on tugevam 1b omast primaarses motoorses alas (PMA, joonis 9, A, B, F) ning primaarses somatosensoorses alas (PSA, joonis 9, A, B, E, F). Kui üldjoontes on ajukoos 1a ja 1b esindatus suhteliselt sarnane, siis erinevusena saab välja tuua olfaktoorse ajukoore e piriform koore, milles 1b ekspressioon ületab 1a oma (Pir2, joonis 8 A, B, C, E, F, G),

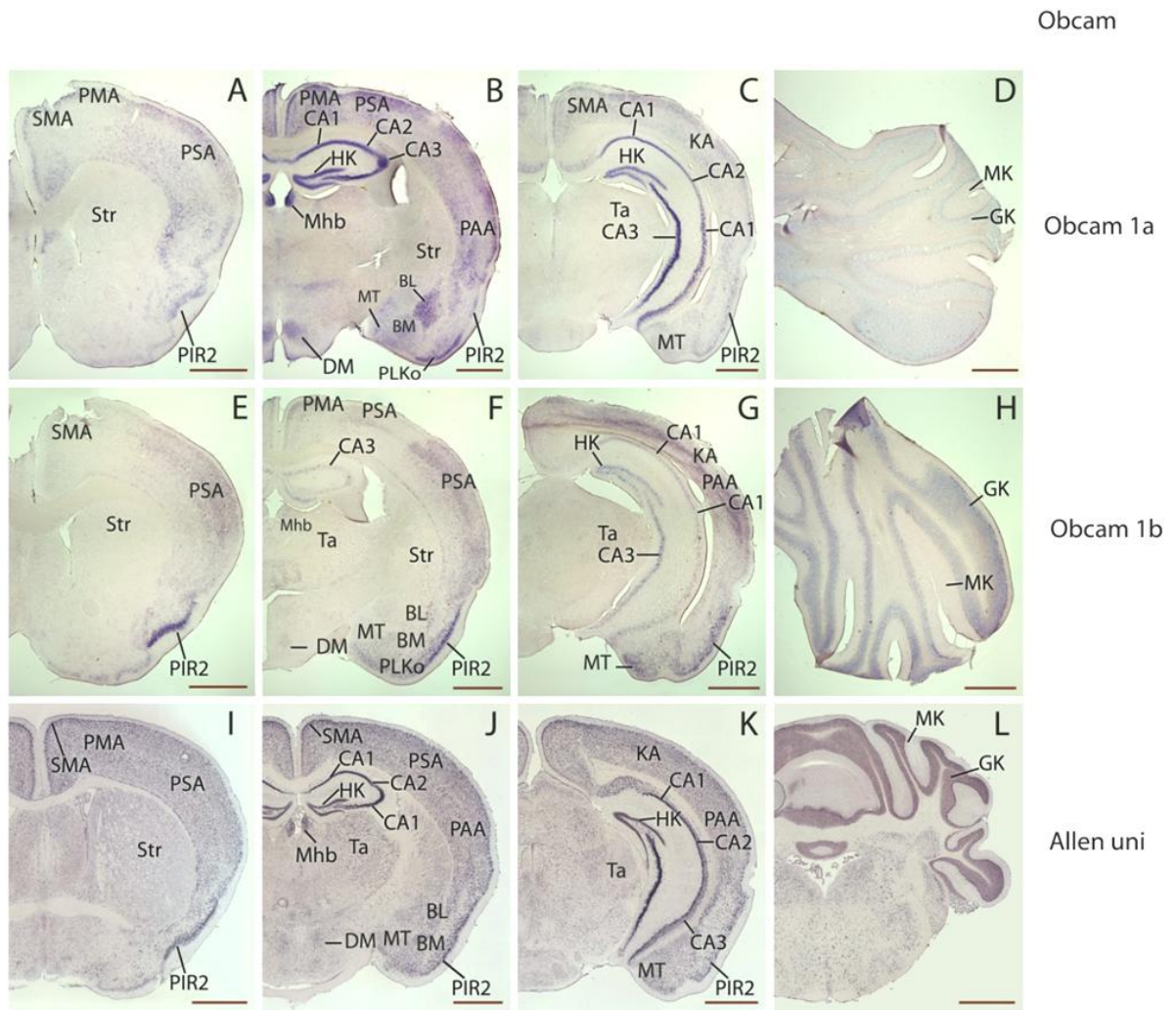
Kõige vastandlikumalt on alternatiivsed *Obcam* promootorid ekspresseerunud hipokampuses. *Obcam* 1a promootori ekspressioon on tugevam 1b omast piirkondades (CA1, CA3, HK, joonis 9, B, C, F, G,). Hipokampuse CA2 piirkonnas oli *Obcam* 1b transkripti ekspressioon tunduvalt nõrgem kui kõrval paiknevates CA1 ja CA3 piirkondades (pole näidatud).

Amügdalas on *Obcam* 1a promootori ekspressioon tugevam 1b omast amügdala posterolateraalses kortikaalses tuumas (PLKo, joonis 9, B, F), basolateraalses tuumas (BL, joonis 9, B, F), basomediaalses tuumas (BM, joonis 9, B, F) ning mediaalses tuumas (MT, joonis 9, B, C, F, G).

Vaheajus oli samuti *Obcam* 1a promootori ekspressioon tugevam 1b omast hüpotalamuse dorsomediaalses tuumas (DM, joonis 9, B, F) ja mediaalses habenulas (Mhb, joonis 9, A, C, F).

Väikeajus on 1b promootori transkripti osakaal 1a omast tunduvalt suurem granulaarses rakukihis (GK, joonis 8, D, H).

Antud eksperimendis saadud tulemused kattuvad eelnevalt Struyk jt (1995) tulemustega, kus tugev üldekspressioon esines suurajukoos, hipokampuse CA1, CA2, CA3 piirkonnas ja hammaskäärus ning olfaktoorses ajukoos. Samuti leidsid nad, et väikeaju granulaarses kihis esineb väiksem ekspressioon kui *Neurotrimini* korral. Alleni ajuatlase universaalse prooviga hübriidsatsioonipiltidel (joonis 8, I-L) on samuti näha tugev ekspressioon suurajukoos ning ekspressioonimuster kattub Struyk jt (1995) tulemustega.



Joonis 9. Obcam 1a ja 1b promootori spetsiifiline ekspressioon hiire aju. Ekspressioon on näidatud kasutades *in situ* RNA hübridisatsiooni meetodit. Promootor 1a transkripti-spetsiifiline proov (A, B, C, D), promootor 1b spetsiifiline proov (E,F,G,H) ning universaalne proov (I, J, K, L) Alleni aju atlasest (Allen uni)⁷. Pir2 - olfaktoorne ajukoor, KA- kiirusaga assotsiatsiooni piirkond, PAA - primaarne auditoorne ala, PSA - primaarne somatosensoorne ala, PMA - primaarne motoorne ala, SMA - sekundaarne motoorne ala, Str- Striaatum, CA1- hipokampuse *Cornu ammonis* 1 piirkond, CA2 - hipokampuse *Cornu ammonis* 2 piirkond, CA3 - hipokampuse *Cornu ammonis* 3 piirkond, HK- hammaskäär, BL - amügdala basolateraalne tuum, BM - amügdala basomediaalne tuum, PLKo - amügdala posterolateraalne kortikaalne tuum, MT - amügdala mediaalne tuum, DM- hüpotalamuse dorsomediaalne tuum, Mhb - mediaalne habenula, MK - väikeaju molekulaarne kiht, GK - väikeaju granulaarne rakukiht. Mõõtkava on A-H 1 mm ning I-L 1, 118 mm.

2.3.2.3 IgLON perekonna seos neuropsühhiaatriliste häiretega

IgLON perekonna valkude polümorfisme ja ekspressioonitasemeid on seostatud erinevate psühhiaatriliste haigustega: paanikahäirete, skisofreeniaga, meeleoluhäirete, suitsiidsuse ja depressiivsusega. On näidatud, et hiired, kellel puudub Lsmp valk on vähem ärevad. Kuna hiired, kes on mutantsed, kas Lsmp, Kilon või Neurotremini suhtes, on elujõulised, ei ole antud perekond oluline organismi põhifunktsioonide kujunemiseks. Mutantsetel hiirtel esineb mitmeid käitumuslikke eripärasid, näidates et IgLON perekonna olulisus on seotud eelkõige aju funktsioneerimise peenmehhanismide kujunemises. Antud väitega on kooskõlas mitmed uuringud, mis näitavad, et IgLON perekonna valgud mõjutavad neuriitide kasvu ning sünapside teket (Koido jt, 2006; Must jt, 2008; Koido jt, 2012; Behan jt, 2009; Gil jt, 1998).

IgLON valkude alternatiivsete promootorite regulatsiooni ja ekspressiooni iseärasuste kirjeldamine on oluline aju funktsioneerimise mõistmaks.

Käesolevas töös leiti, et *Neurotrimini* 1b ja *Obcami* 1a promootorid on aktiivsemad hipokampuse ja amügdala piirkonnas, mis on tuntud kui "klassikalised" limbilised struktuurid ning mille funktsioon seisneb emotsionaalses käitumises ja motivatsioonis (Heimer ja Van Hoesen, 2006). Kirjanduses on näidatud, et hipokampus on oluline õppimisvõimes ja mälu kujunemises. Võrdlevad mälu protsessid võimaldavad hinnata keskkonnast saadud teabe tähtsust (Squire jt, 2007). Keskkonnast tuleva informatsiooni vastuvõtmine põhjustab esmalt hipokampuse ja järgnevalt amügdala aktivatsiooni ning seeläbi kujundab käitumusliku vastuse (Fudge jt, 2012).

Amügdala piirkonnas esineb kõige tugevam eksperssioon *Obcami* promootor 1a poolt amügdala basolateraalses (BL), basomediaalses (BM) ja posterolateraalses kortikaalses tuumas (PLKo). Neid piirkondi on kirjanduses seostatud emotsioonidega seonduva süsteemiga ja kõrgemate kognitiivsete võimetega (Klüver ja Bucy, 1939).

Väikeajus on ekspressioon peamiselt algatatud *Neurotrimini* ja *Obcami* promootor 1b poolt, kus tugev ekspressioon on nähtav granulaarses rakukihis. Kirjanduses on seostatud väikeaju rolli motoorsete ning samuti kognitiivsete funktsioonidega (Kandel jt 2000).

Obcami 1b promootori aktiivsus piirdub valdavalt vaid ajukoore assotsiatiivsetes alades, mis ei teeninda isoleeritult ühtki meelt. Nad koguvad infot mitmetest tunderetseptoritest ja töötlevad neid nii, et inimesel tekib integreeritud arusaam ümbritsevast (Kandel jt 2000).

Samuti kinnitati antud töös, et *Neurotrimini* ja *Obcami* geenide ekspressioonimustrid on erinevad, mis langeb kokku kirjanduses leitud infoga. Struyk jt (1995) leidsid, et Neurotrimini ja Obcami lahkuminev ekspressioon vihjab sellele, et neil on arengu käigus koos teiste IgLON perekonna liikmetega tähtis osa neuronaalsete rakupindade mitmekesisuse loomisel. Gil jt (1998) leidsid hiljem, et Neurotrimin ja Obcam on mõlemad adhesioonimolekulid, mis vahendavad läbi erinevate mehhanismide neuronite vahelist kontaktide loomist ning suunavad neuronite kasvu õige sihtmärgi suunas vastavalt rakutüübi spetsiifikale.

KOKKUVÕTE

Käesoleva töö käigus kirjeldati IgLON geeniperekonna geenide põlvnemissuhteid ning ühe duplitseerumise käigus tekinud *Neurotrimini* ja *Obcami* geenide alternatiivsete promootorite 1a ja 1b spetsiifilist ekspressiooni metsikut tüüpi hiire ajus kasutades *in situ* hübriidisatsiooni meetodit. Töös arutati *Neurotrimini* ja *Obcami* geeni alternatiivsete promootorite vastandliku ekspressiooni üle erinevates aju osades ning võrreldi tulemusi Alleni ajuatlase universaalse proovi hübriidisatsioonipiltidega.

Tabell (vt Lisa 1) näitab kokkuvõtvalt metsiktüüpi täiskasvanud hiire *Obcami* ja *Neurotrimini* alternatiivsete promootorite ekspressioone.

Töö põhitulemused:

- *Neurotrimini* ja *Obcami* geenide promootorid 1a ja 1b on aktiivsed *in vivo* ning nende ekspressioonimustrid ei ole kattuvad:
 - *Neurotrimin* 1a promootor on aktiivne eelkõige motoorses ajukooses, anterioorses dorsaalses striatumis, hipokampuse CA1 piirkonnas ning Purkinje rakkudes.
 - *Neurotrimin* 1b promootor on aktiivne eelkõige ajukooses, hipokampuses, amügdalas, ventraalses striatumis, mediaalses habenulas ja väikeaju granulaarrakkudes.
 - *Obcam* 1a promootor on aktiivne eelkõige ajukooses, hipokampuses, basolateraalses amügdalas, hüpotalamuse dorsomediaalses tuumas ja mediaalses habenulas.
 - *Obcam* 1b promootori aktiivsus esineb eelkõige olfaktoorses ajukooses.

Edasised uuringud peaksid keskenduma alternatiivsetelt promootoritelt kodeeritavate signaalpeptiidide funktsioonide mõistmisele. Samuti peaks kirjeldama Kilonit ja IgLON5 ekspressioone ning analüüsima IgLON perekonna siseste homo- ja heterodimeeride moodustumist.

Describing transcription of NTM and OBCAM genes initiated by the alternative promoters (1a and 1b) in the mouse brain

Kadri Seppa

Summary

IgLONs are a family of five cell adhesion molecules belonging to the Ig superfamily that are thought to play a role in cell-cell recognition and growth-cone migration. LSAMP was the first member to be identified, followed by opioid-binding CAM (OBCAM), Neurotrimin (NTM)/CEPU-1, Kilon/Neurotractin and IgLON 5. IgLONs are organized in the plane of the membrane as heterodimers and function predominantly as subunits of heterodimeric proteins (Diglons), IgLONs can form six Diglons (Reed *et al.* 2004). Neurotrimin (Ntm) together with the opioid-binding cell adhesion molecule (OBCAM) comprise the IgLON family of neural cell adhesion molecules. These glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins are expressed in distinct neuronal systems. In the case of Ntm, its expression pattern suggests a role in the development of thalamocortical and pontocerebellar projections (Struyk *et al.*, 1995). Ntm, and other members of the IgLON family, regulate the development of neuronal projections via attractive and repulsive mechanisms that are cell type specific and are mediated by homophilic and heterophilic interactions (Gil *et al.*, 1998).

The aim of the current Bachelor's thesis was to describe IgLONs family and transcription of NTM and OBCAM genes initiated by the alternative promoters (1a and 1b) in the mouse brain using *in situ* hybridization method.

The results of current work can be summarized as follows:

- The activity of *Ntm* and *Obcam* 1a and 1b promoters have different expression pattern in adult mouse brain.
- *Ntm* promoter 1a shows greater activity in motor cortex, anterior striatum, hippocampal formation area CA1 and in the Pukinje cells.
- *Ntm* promoter 1b shows greater activity in cerebral cortex, hippocampal formation, amygdala, ventral striatum, medial habenular nucleus and cerebellum's granular cell layer.

- *Obcam* promoter 1a shows greater activity cerebral cortex, hippocampal formation, basolateral amygdaloid nucleus, medial habenular nucleus and in dorsomedial hypothalamus nucleus.
- *Obcam* 1b promoter activity predominates in piriform cortex.

Ntm and *Obcam* genes have important role in cell adhesion, they are highly conserved among species and have very complicated regulation. Future studies should describe Kilon and IgLON5 expression and review Diglon formation. Furthermore it is important to reveal the function of alternatively translated signal peptides.

TÄNUSÕNAD

Sooviksin eelkõige tänada oma juhendajat Kersti Lillevälja abivalmiduse ja õpetamise eest. Samuti on suureks abiks olnud Mari-Anne Philips, Triin Tekko ja Katyayani Singh.

KIRJANDUS

Ann DK, Hasegawa J, Ko JL, Chen ST, Lee NM, et al. 1992. Specific reduction of opioid receptor binding in transfected NG108-15 cells. *J Biol Chem* 267: 7921-7926.

Barclay, A. N. (2003). Membrane proteins with immunoglobulin-like domains—a master superfamily of interaction molecules. *Semin. Immunol.* 15 (4): 215–223.

Baye TM, Perry RT, Wiener HW, Chen Z, Harrell LE, Go RC (2008). Candidate gene discovery procedure after follow-up confirmatory analyses of candidate regions of interests for Alzheimer's disease in the NIMH sibling dataset. *Dis Markers*;24:293–309.

Behan, A. T., Byrne, C., Dunn, M. J., Cagney, G., ja Cotter, D. R. (2009). Proteomic analysis of membrane microdomain-associated proteins in the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia and bipolar disorder reveals alterations in LAMP, STXBP1 and BASP1 protein expression. *Mol. Psychiatry* 14: 601–613.

Blacker D, Bertram L, Saunders AJ, Moscarillo TJ, Albert MS, Wiener H, jt. (2003) Results of a high-resolution genome screen of 437 Alzheimer's disease families. *Hum Mol Genet*;12:23–32.

Bouchard Jr TJ ja McGue M (1981). Familial studies of intelligence: a review. *Science*;212:1055–9.

Chen S, Gil O, Ren YQ, Zanazzi G, Salzer JL, Hillman DE (2001). Neurotrimin expression during cerebellar development suggests roles in axon fasciculation and synaptogenesis. *J Neurocytol*, 30: 927–937.

Colman R. D. ja Filbin T. M. (2006). Cell adhesion molecules. George J. Siegel, R. Wayne Albers, Scott T. Brady, Donald L. Price, *Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects* 7nd ed., Amsterdam: Elsevier Academic Press, lk 111–121.

Devlin B, Daniels M, Roeder K (1997). The heritability of IQ. *Nature*;388:468–71.

Ewoud Roberto Eduard Schmidt, Sara Brignani, Youri Adolfs, Suzanne Lemstra, Jeroen Demmers, Marina Vidaki, Amber-Lee Skye Donahoo, Kersti Lilleväli, Eero Vasar, Linda Jane Richards, Domna Karagogeos, Sharon Margriet Kolk, Ronald Jeroen Pasterkamp

- (2014). Subdomain-mediated axon-axon signaling and chemoattraction cooperate to regulate afferent innervation of the lateral habenula. *Neuron*; 83(2):372-87.
- Fudge LJ, deCampo MD, Becoats TK (2012). Revisiting the hippocampal-amygdala pathway in primates: association with immature-appearing neurons. *Neuroscience*, 212: 104–119.
- Funatsu N, Miyata S, Kumanogoh H, Shigeta M, Hamada K, Endo Y, Sokawa Y, Maekawa S (1999). Characterization of a novel rat brain glycosylphosphatidylinositol-anchored protein (Kilon), a member of the IgLON cell adhesion molecule family. *J Biol Chem*, 274: 8224-8230.
- Gil OD, Zhang L, Chen S, Ren YQ, Pimenta A, Zanazzi G, jt. (2002). Complementary expression and heterophilic interactions between IgLON family members neurotrimin and LAMP. *J Neurobiol*;51:190–204
- Gil, D. O., Zanazzi, G., Struyk, F. A., Salzer, L. J. (1998). Neurotrimin mediates bifunctional effects on neurite outgrowth via homophilic and heterophilic interactions. *J. Neurosci.* 18 (22): 9312–9325.
- Goodman, C. S., Bastiani, M. J., Doe, C. Q., Lac, S., Helfand, S. L., Kuwada, J. Y., Thomas, J. B. (1984). Cell recognition during neuronal development. *Science* 225 (4668): 1271–1279.
- Govitrapong P, Zhang X, Loh HH, Lee NM. 1993. Transfection of NG108-15 cells with antisense opioid-binding cell adhesion molecule cDNA alters opioid receptor–G protein interaction. *J Biol Chem* 268: 18280-18285.
- Gumbiner MB (1996). Cell Adhesion: The Molecular Basis of Tissue Architecture and Morphogenesis. *Cell*, 84: 345–357.
- Hynes RO (1999). Cell adhesion: old and new questions. *Trends Cell Biol*, 9(12): 33-37.
- Ilangumaran S, Arni S, Gerhild van Echten-Deckert, Borisch B and Hoessli D C (1999). Microdomain-dependent Regulation of Lck and Fyn Protein-Tyrosine Kinases in T Lymphocyte Plasma Membranes. *Mol. Biol. Cell* 10 (4): 891–905.
- Joshi, H. C. (1994). Microtubule organizing centers and γ -tubulin. *Cytoskeleton* 6 (1): 55–62.

- Kemler R. 1993. - Trend in Genetics 9, 317-321.
- Klüver H, Bucy PC (1939). Preliminary analysis of functions of the temporal lobes in monkeys. Arch Neurol Psychiatry, 42: 979–1000.
- Koido K, Traks T, Balõtshev R, Eller T, Must A, Koks S, Maron E, Tõru I, Shlik J, Vasar V, Vasar E (2012). Associations between LSAMP gene polymorphisms and major depressive disorder and panic disorder. Transl Psychiatry, 14;2: e152.
- Koido, K., Koks, S., Must, A., Reimets, A., Maron, E., Shlik, J. (2006). Association analysis of limbic system-associated membrane protein gene polymorphisms in mood and anxiety disorders. Eur. Neuropsychopharmacol 16 (1): S9.
- Lajtha, A. (2007). Handbook of neurochemistry and molecular neurobiology: Neural protein metabolism and function, 2nd ed, USA, Springer, lk 77–80.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W jt. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature, 409: 860-921.
- Lein ES, Hawrylycz MJ, Ao N, Ayres M, Bensinger A, Bernard A, jt. (2007). Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. Nature ;445:168–76.
- Levitt P (1984). A monoclonal antibody to limbic system neurons. Science, 223: 299–301.
- Liu F, Arias-Vasquez A, Sleegers K, Aulchenko YS, Kayser M, Sanchez-Juan P, jt. (2007) A genomewide screen for late-onset Alzheimer disease in a genetically isolated Dutch population. Am J Hum Genet;81:17–31.
- Liu J, Li G, Peng X, Liu B, Yin B, Tan X, jt. (2004). The cloning and preliminarily functional analysis of the human neurotrimin gene. Sci China C Life Sci;47:158–64.
- Lodge AP, Howard MR, McNamee CJ, Moss DJ (2000). Co-localisation, heterophilic interactions and regulated expression of IgLON family proteins in the chick nervous system. Mol. Brain Res. 82: 84–94.
- Marg A, Sirim P, Spaltmann F, Plagge A, Kauselmann G, Buck F, Rathjen FG, Brummendorf T (1999). Neurotractin, a novel neurite outgrowth-promoting Ig-like protein that interacts with CEPU-1 and LAMP. The Journal of Cell Biology, 145: 865-876.

McGue M, Bouchard TJ, Iacono W, Lykken D (1993). Behavioral genetics of cognitive ability: A life-span perspective. Washington, DC: American Psychological Association.

Minhas HM, Pescosolido MF, Schwede M, Piasecka J, Gaitanis J, Tantravahi U, Morrow EM (2013). An unbalanced translocation involving loss of 10q26.2 and gain of 11q25 in a pedigree with autism spectrum disorder and cerebellar juvenile pilocytic astrocytoma. *Am J Med Genet A*, A(4): 787-791.

Moritz, M. and Agard, D. A. (2001). γ -Tubulin complexes and microtubule nucleation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11 (2): 174–181.

Mouse Genome Sequencing Consortium, Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, Rogers J, Abril JF, Agarwal P, Agarwala R, Ainscough R, Alexandersson M, An P, Antonarakis SE, Attwood J, Baertsch R, Bailey J, Barlow K, Beck S, Berry E, Birren B, Bloom T, Bork P, Botcherby M, Bray N, Brent MR, Brown DG, Brown SD, Bult C, Burton J, Butler J, Campbell RD, Carninci P, Cawley S, Chiaromonte F, Chinwalla AT, Church DM, Clamp M, Clee C, Collins FS, Cook LL, Copley RR, Coulson A, Couronne O, Cuff J, Curwen V, Cutts T, Daly M, David R, Davies J, Delehaunty KD, Deri J, Dermitzakis ET, Dewey C, Dickens NJ, Diekhans M, Dodge S, Dubchak I, Dunn DM, Eddy SR, Elnitski L, Emes RD, Eswara P, Eyraas E, Felsenfeld A, Fewell GA, Flicek P, Foley K, Frankel WN, Fulton LA, Fulton RS, Furey TS, Gage D, Gibbs RA, Glusman G, Gnerre S, Goldman N, Goodstadt L, Grafham D, Graves TA, Green ED, Gregory S, Guigó R, Guyer M, Hardison RC, Haussler D, Hayashizaki Y, Hillier LW, Hinrichs A, Hlavina W, Holzer T, Hsu F, Hua A, Hubbard T, Hunt A, Jackson I, Jaffe DB, Johnson LS, Jones M, Jones TA, Joy A, Kamal M, Karlsson EK, Karolchik D, Kasprzyk A, Kawai J, Keibler E, Kells C, Kent WJ, Kirby A, Kolbe DL, Korf I, Kucherlapati RS, Kulbokas EJ, Kulp D, Landers T, Leger JP, Leonard S, Letunic I, Levine R, Li J, Li M, Lloyd C, Lucas S, Ma B, Maglott DR, Mardis ER, Matthews L, Mauceli E, Mayer JH, McCarthy M, McCombie WR, McLaren S, McLay K, McPherson JD, Meldrim J, Meredith B, Mesirov JP, Miller W, Miner TL, Mongin E, Montgomery KT, Morgan M, Mott R, Mullikin JC, Muzny DM, Nash WE, Nelson JO, Nhan MN, Nicol R, Ning Z, Nusbaum C, O'Connor MJ, Okazaki Y, Oliver K, Overton-Larty E, Pachter L, Parra G, Pepin KH, Peterson J, Pevzner P, Plumb R, Pohl CS, Poliakov A, Ponce TC, Ponting CP, Potter S, Quail M, Reymond A, Roe BA, Roskin KM, Rubin EM, Rust AG, Santos R, Sapojnikov V, Schultz B, Schultz J, Schwartz MS, Schwartz S, Scott C, Seaman S, Searle S, Sharpe T, Sheridan A, Shownkeen R, Sims S, Singer JB, Slater G, Smit A, Smith DR, Spencer B,

Stabenau A, Stange-Thomann N, Sugnet C, Suyama M, Tesler G, Thompson J, Torrents D, Trevaskis E, Tromp J, Ucla C, Ureta-Vidal A, Vinson JP, Von Niederhausern AC, Wade CM, Wall M, Weber RJ, Weiss RB, Wendl MC, West AP, Wetterstrand K, Wheeler R, Whelan S, Wierzbowski J, Willey D, Williams S, Wilson RK, Winter E, Worley KC, Wyman D, Yang S, Yang SP, Zdobnov EM, Zody MC, Lander ES (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*;420(6915):520-62.

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

Nosjean, O., Briolay, A., and Roux, B. (1997). Mammalian GPI proteins: sorting, membrane residence and functions. *Biochim. Biophys. Acta.* 1331: 153–186.

Ogdie MN, Macphie IL, Minassian SL, Yang M, Fisher SE, Francks C, jt. (2003) A genomewide scan for attention-deficit/hyperactivity disorder in an extended sample: suggestive linkage on 17p11. *Am J Hum Genet*;72:1268–79.

Ou, Y. and Rattner, J. B. (2004). The centrosome in higher organisms: structure, composition and duplication. *Int. Rev. Cytol.* 238: 119–182.

Pan Y, Wang KS, Aragam N (2011). NTM and NR3C2 polymorphisms influencing intelligence: Family-based association studies. *Prog Neuro-psychopharmacol Biol Psychiatry*, 35: 154–160.

Pan, Y., Wang, K.- S., Aragam, N. (2011). NTM and NR3C2 polymorphisms influencing intelligence: Family - based association studies. *Progress in NeuroPsychopharmacology & Biological Psychiatry* 35: 154–160.

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

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

- Pimenta, A. F., Fischer, I., Levitt, P. (1996). cDNA cloning and structural analysis of the human limbic-system-associated membrane protein (LAMP). *Gene* 170: 189–195.
- 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: 3961-3973.
- Schofield PR, McFarland KC, Hayflick JS, Wilcox JN, Cho TM, Roy S, Lee NM, Loh HH, Seeburg PH (1989). Molecular characterization of a new immunoglobulin superfamily protein with potential roles in opioid binding and cell contact. *EMBO J*, 8: 489-495.
- Schol-Gelok S, Janssens AC, Tiemeier H, Liu F, Lopez-Leon S, Zorkoltseva IV, jt. (2010). A genome-wide screen for depression in two independent Dutch populations. *Biol Psychiatry*;68:187–96.
- Sellar GC, Watt KP, Rabiasz GJ, Stronach EA, Li L, Miller EP, jt. (2003). OPCML at 11q25 is epigenetically inactivated and has tumor-suppressor function in epithelial ovarian cancer. *Nat Genet* 2003;34:337–43.
- Spaltmann F, Brümmendorf T (1996). CEPU-1, a novel immunoglobulin superfamily molecule, is expressed by developing cerebellar Purkinje cells. *The Journal of Neuroscience*, 76(5): 1770-1779.
- Squire LR, Wixted JT, Clark RE (2007). Recognition memory and the medial temporal lobe: a new perspective. *Nat Rev Neurosci*, 8(11): 872-883.
- Struyk AF, Canoll PD, Wolfgang MJ, Rosen CL, Deustachio P, Salzer JL (1995). Cloning of Neurotrimin defines a new subfamily of differentially expressed neural cell-adhesion molecules. *The Journal of Neuroscience* 15: 2141-2156.
- Zacco A, Cooper V, Chantler PD, Fisher-Hyland S, Horton HL, Levitt P (1990). Isolation, biochemical characterization and ultrastructural analysis of the limbic system associated membrane protein (LAMP), a protein expressed by neurons comprising functional neural circuits. *J Neurosci*, 10: 73–90.
- Zhao J, Bradfield JP, Li M, Wang K, Zhang H, Kim CE, Annaiah K, Glessner JT, Thomas K, Garris M, Frackelton EC, Otieno FG, Shaner JL, Smith RM, Chiavacci RM, Berkowitz RI, Hakonarson H, Grant SF (2009). The role of obesity-

associated loci identified in genome-wide association studies in the determination of pediatric BMI. *Obesity (Silver Spring)* 17(12):2254-7.

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

Treves A, Tashiro A, Witter MP, Moser EI (2008) What is the mammalian dentate gyrus good for? *Neuroscience* 154: 1155-1172.

Walsh, F. S., Doherty, P. (1997). Neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily: Role in Axon Growth and Guidance. *Ann. Rev. of Cell and Dev. Biol.* 13: 425–456.

van der Zwaag B, Franke L, Poot M, Hochstenbach R, Spierenburg HA, Vorstman JA, jt. (2009). Gene-network analysis identifies susceptibility genes related to glycobiology in autism. *PLoS ONE*;4:e5324.

Varma, R. and Mayor, S. (1998). GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. *Nature* 394: 798–801.

Willer CJ, Speliotes EK, Loos RJ jt (2009). Six new loci associated with body mass index highlight a neuronal influence on body weight regulation. *Nat. Genet.* 41 (1): 24–34. doi:10.1038/ng.287.

Williams AF, Davis SJ, He Q, Barclay AN (1989). *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*;54 Pt 2:637-47.

Vorstman JA, Staal WG, van Daalen E, van Engeland H, Hochstenbach PF, Franke L (2006). Identification of novel autism candidate regions through analysis of reported cytogenetic abnormalities associated with autism. *Mol Psychiatry* 2006;11(1):18–28.

Kasutatud veebiaadressid

link 1:

http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000142549;r=19:51815102-51833608;t=ENST00000270642; 25.02.15

link 2:

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?term=NTM\[gene\]%20AND%20txid9606\[orgn\]](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?term=NTM[gene]%20AND%20txid9606[orgn]); 25.02.15

link 3:

<http://www.brightfocus.org/alzheimers/about/understanding/anatomy-of-the-brain.html>; 12.03.15

link 4:

http://www.ensembl.org/Mus_musculus/Gene/Compara_Tree?anc=9537496;db=core;g=ENSMUSG00000059974;g1=ENSG00000182667;r=9:28994750-29963141; 15.02.15, Ensembl 2015

link 5: http://www.evolution-textbook.org/content/free/contents/Chapter_27_Web.pdf; 08.04.15

link 6: <http://mouse.brain-map.org/experiment/show/573>; 04.05.15 Allen Institute for Brain Science 2015, pildid 18, 28, 29, 48.

link 7: <http://mouse.brain-map.org/experiment/show/73992920>; 04.05.15 Allen Institute for Brain Science 2015, pildid 37, 51, 65 ja 93.

Kasutatud raamatud:

1. Dan Sanes, Thomas Reh, William Harris (2006). Development of the Nervous System, 2nd Edition. from Dan Sanes, Thomas Reh, William Harris. ISBN-9780080472492, Ebook, lk 138.
2. Eric R Kandel, James H Schwarz, Thomas M Jessell (2000). Principles of neural science, 4th Edition, lk 600-629;647.
3. Lajtha, A. (2007). Handbook of neurochemistry and molecular neurobiology: Neural protein metabolism and function, 2nd ed, USA, Springer, lk 77–80.

LISAD

LISA 1

Tabel 1. Obcam ja Neurotrimini ekspressioon neljapalli süsteemis, kus 4 näitab kõige tugevamat ekspressiooni ja 1 kõige nõrgemat. Ekspressioon on tuvastatud metsiktüüpi täiskasvanud hiire ajus. Tabeli tulemused lähtuvad jooniste 8 ja 9 andmetest.

Ajupiirkond	Lühend	Ntm		Obcam		Funktsioon
		1a	1b	1a	1b	
Suurajukoor						
Olfaktoorne ajukoor	Pir 2	2	4	4	4	olfaktoorne
Kiirusaga assotsiatsiooni piirkond	KA	3	3	1	1	
Primaarne auditoorne ala	PAA	3	3	2	2	auditoorne
Primaarne somatosensoorne ala	PSA	4	3	3	3	somatosensoorne
Primaarne motoorne ala	PMA	3	1	3	1	motoorne
Sekundaarne motoorne ala	SMA	3	1	1	-	motoorne
Hipokampuse moodustumine						
Striaatum / juttkeha	Str	1	1	0	0	motoorne
Hipokampuse osa CA1	CA1	2	3	4	1	limbiline
Hipokampuse osa CA2	CA2	2	3	4	-	limbiline
Hipokampuse osa CA3	CA3	1	3	4	1	limbiline
Hammaskäär	HK	1	3	4	1	limbiline
Amügdala						
Amügdala basolateraalne tuum	BL	0	1	4	1	limbiline
Amügdala basomediaalne tuum	BM	0	1	4	1	limbiline
Amügdala posterolateraalne kortikaalne tuum	PLKo	1	2	3	1	limbiline
Amügdala mediaalne tuum	MT	1	4	2	1	limbiline
Hüpotalamus						
Hüpotalamuse dorsomediaalne tuum	DM	0	1	3	1	
Taalamus	Ta	0	0	0	0	
Mediaalne habenula	Mhb	2	3	4	1	
Väikeaju						
Väikeaju molekulaarne rakukiht	MK	0	0	0	0	
Väikeaju granulaarne rakukiht	GK	1	4	0	2	

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Kadri Seppa (08.04.1993)

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

***Neurotrimini ja Obcam* geenide alternatiivsete promootorite 1a ja 1b poolt algatatud transkriptsiooni kirjeldamine hiire ajus**

Mille juhendajad on Kersti Lilleväli ja Tambet Tõnissoo,

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **08.08.2018** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

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

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

Tartus, 25.05.2015