

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND  
ARSTITEADUSKOND  
BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT  
FÜSIOLOOGIA OSAKOND

TAAVI VANAVESKI

***LSAMP* geeni ekspressioon inimese ajus**

Magistritöö (30 EAP)

Juhendajad: PhD Mari-Anne Philips

PhD Tambet Tõnissoo

Tartu 2014

## SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID .....	4
SISSEJUHATUS .....	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1.1. Limbiline süsteem .....	6
1.1.1. Amügdala tähtsus limbilises süsteemis .....	7
1.1.2. Hipokampuse tähtsus limbilises süsteemis.....	8
1.1.3. Prefrontaalkoore tähtsus limbilises süsteemis .....	9
1.2. IgLON perekond.....	11
1.2.1. IgLON perekonna tähtsus.....	12
1.3. <i>LSAMP</i> .....	14
2. EKSPERIMENTAALOSA .....	17
2.1. Töö eesmärgid .....	17
2.2. Materjal ja meetodika.....	18
2.2.1. Inimese koeproovid .....	18
2.2.2. Hiire koeproovid.....	18
2.2.3. RNA eraldamine ja cDNA süntees.....	19
2.2.4. Kvantitatiivne reaalaaja-PCR.....	19
2.2.5. SNP analüüs.....	22
2.2.6. Andmete statistiline analüüs .....	22
2.3. Tulemused .....	23

2.3.1. <i>LSAMP</i> geeni ekspressioon skisofreeniapatsientide dorsomediaalses prefrontaalkoores .....	23
2.3.2. <i>LSAMP</i> geeniekspressiooni seos polümorfismidega .....	24
2.3.3. <i>Lsmp</i> geeni ekspressioon hiires .....	25
2.3.4. <i>LSAMP</i> geeni ekspressioon inimese ajus.....	27
3. Arutelu .....	30
KOKKUVÕTE .....	35
SUMMARY .....	37
Expression of <i>LSAMP</i> gene in the human brain .....	37
TÄNUSÕNAD .....	39
KASUTATUD KIRJANDUS .....	40
KASUTATUD VEEBIAADRESSID .....	52
LISAD .....	54
LISA 1 .....	54
LIHTLITSENTS.....	55

## KASUTATUD LÜHENDID

ADHD – tähelepanu defitsiidi ja hüperaktiivsuse sündroom (ingl *attention deficit hyperactivity disorder*)

*BDNF* – ajus toodetavat närvikasvu faktorit kodeeriv geen (ingl *brain-derived neurotrophic factor*)

fMRI – funktsionaalne magnetresonantstomograafia (ingl *functional magnetic resonance imaging*)

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

HPRT – hüpoksantiin-guaaniin fosforibosüültransferaas (ingl *hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*)

IgLON – immunoglobuliin LON (ingl *immunoglobulin LON*)

IgSF – immunoglobuliini superperekond/ülemperekond (ingl *immunoglobulin superfamily*)

*Lsamp* – hiire limbilise süsteemiga seotud membraanvalku kodeeriv geen

*LSAMP* – inimese limbilise süsteemiga seotud membraanvalku kodeeriv geen

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

OBCAM – opioide siduv raku adhesiooni molekul (ingl *opioid-binding cell adhesion molecule*)

SEM – keskväärtuse standardviga (ingl *standard error of the mean*)

## SISSEJUHATUS

Adhesioonimolekulid on raku pinnal asetsevad glükoproteiinid, mis toimivad enamasti kui transmembraansed retseptorid (Gumbiner, 1996). Immunoglobuliinide superperekonda kuuluvad retseptorid, millel esineb vähemalt 1 immunoglobuliini domeen. Inimgenoom kodeerib 765 ühe või enama immunoglobuliini domeeniga adhesioonimolekuli (Lander jt, 2001). LSAMP geenil ja teistel IgLON perekonna esindajatel on 3 immunoglobuliini domeeni. IgLONid ekspresseeruvad rakumembraanil ja moodustavad nii homo- kui ka perekonnasiseseid heterodimeere ehk Digloneid. Erinevatel rakkudel paiknevad Diglonid interakteeruvad omavahel ja osalevad rakk-rakk vahendatud signaliseerimises (Reed jt, 2004). IgLON perekonna adhesioonimolekulide tähtsus avaldub närvisüsteemis, kus neid on seostatud neurogeneesi ja sünaptoogeneesiga (Hashimoto jt, 2009). IgLONid on ka potentsiaalsed tuumor-supressorid neuraalsetes ja mitteneuraalsetes kudedes (Chen jt, 2003; Ntougkos jt, 2005; Wang jt, 2008; Yen jt, 2009).

Käesoleva magistritöö käigus vaadeldakse lähemalt IgLON perekonna esindaja, *LSAMP*, geeni ekspressiooni nii inimesel kui ka hiirel. Hiire *Lsamp* geeni ekspressiooni on hiljuti seostatud sotsiaalse käitumise ja emotsioonide protsessimisega (Philips jt, 2014). Inimese korral seostub LSAMP valgu üleekspressioon dorsomediaalses prefrontaalkoores skisofreenia ja bipolaarse häirega (Behan jt, 2009). Lisaks on seostatud polümorfisme inimese *LSAMP* geenis meeste enesetapu, depressiooni, bipolaarse häire ja skisofreeniaga (Must jt, 2008; Koido jt, 2012; Koido jt, 2014). *LSAMP* geeni uurimise teeb huvitavaks alternatiivsete promootorite – 1a ja 1b esinemine. Kahe esimese eksoni vahele jääb 1,55 Mb ebaharilikult pikk intron. Kahe funktsionaalselt aktiivse promootori esinemise tulemusel katab *LSAMP* geen genoomis 2,2 Mb ala (Pimenta ja Levitt, 2004).

Käesoleva töö eesmärk on iseloomustada *LSAMP* geeni promootorite 1a ja 1b ekspressioonimustrit inimese ja hiire aju. Töö käigus vaadeldakse ka eelnevalt avaldatud kirjanduse põhjal inimese *LSAMP* geeni ekspressiooni seost skisofreeniaga dorsomediaalses prefrontaalkoores ja kahe polümorfismi seost 1a ja 1b promootorite ekspressioonitasemega.

Töö on koostatud Arstiteaduskonna Bio- ja siirdemeditsiini instituudi füsioloogia osakonnas.

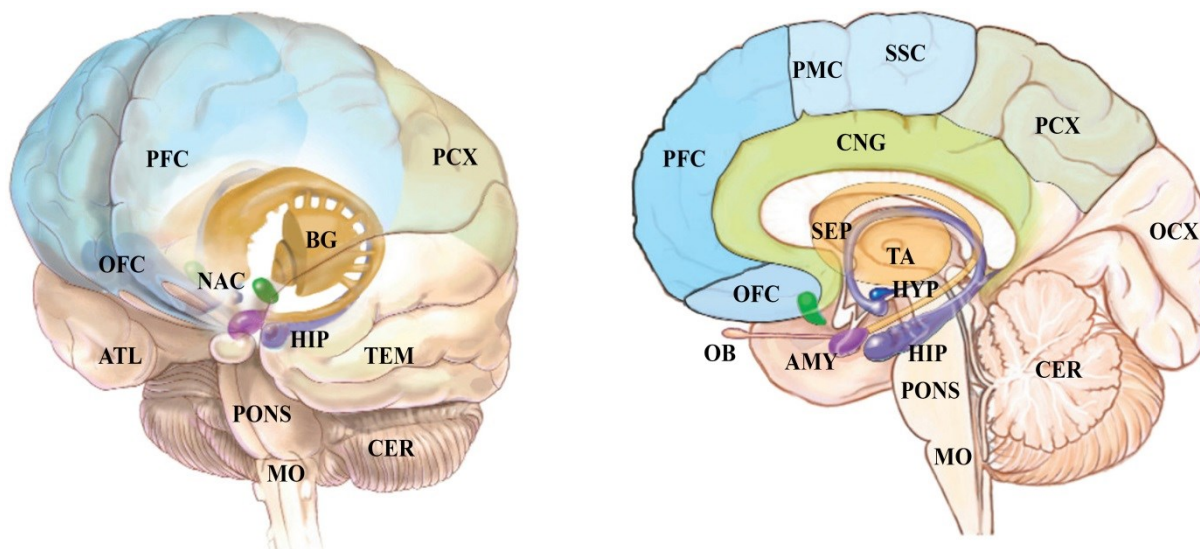
# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1. Limbiline süsteem

Limbiline süsteem on kokkuleppeline ajuosade kooslus, kuhu kuuluvad aju kortikaalsed ja subkortikaalsed osad: orbitofrontaalkoor, mediaalne prefrontaalkoor, tsingulaarkoor, temporaalkoor, insulaarkoor, parahipokampaalne koor ja eriti olulised osad nagu hipokampus, anterioorne osa taalamusest, hüpotaalamus, forniks, amügdala tuumade kompleks ja neid siduvad juhteteed (joonis 1). Need ajuosad vahendavad pikaajalist mälu, lõhnataju, emotsioone, mõnu- ja valutunde töötlust ning nendest tulenevat käitumist. Limbiline süsteem on oluline motivatsiooni, emotsioonide ja mälu kujunemisel ning kujundab emotsionaalset, seksuaalset ja adaptiivset käitumist. Hüpotaalamus-hüpofüüs raja kaudu avalduvad limbilise süsteemi mõjud somaatilises ja vegetatiivses närvisüsteemis (Heimer jt, 1999; Herman jt, 2005). Limbilise süsteemi struktuure on seostatud stressi ja ärevuse ning psühhiaatriliste häirete nagu autismi, depressiooni, paanikahäire, sotsiaalfoobia, skisofreenia, obsessiiv-kompulsiivse käitumise ning posttraumaatilise stressiga (Phan jt, 2006; Zhang jt, 2011; Anticevic jt, 2012; Blair jt, 2012; Lee jt, 2012; Poljac ja Bekkering, 2012; Sylvester, 2012; Anticevic jt, 2013; Anticevic jt, 2014).

Paljudele liikidele, eriti primaatidele, annab grupiviisiline sotsiaalne kooselu adaptiivse eelise. Sotsiaalses grupis hakkama saamine ja geenide edasipärandamine sõltub indiviidi võimest lugeda teiste liigikaaslaste sotsiaalseid vihjeid ning võimest neile adekvaatselt vastata (Silk, 2007). Sotsiaalsus on ka inimese fundamentaalne omadus. Inimese stressisüsteem on niivõrd tundlik sotsiaalsele stiimulile, et igasugune sotsiaalne pingeseisund nagu avalik esinemine või eksamite sooritamine kutsub esile stressihormooni kortisooli taseme tõusu (Kirschbaum ja Hellhammer, 1994; Dickerson ja Kemeny, 2004; Lindahl jt, 2005). Stressihormooni taseme tõus võib olla lühiajaline või pikaajaline ning enamasti käib stressiseisundiga kaasas ka terviserisk. Näiteks avaliku esinemise eel ja ajal tõuseb kortisooli tase märgatavalt ning langeb järgnevalt optimaalse stressivastuse korral. Olles esmakordselt uudses olukorras ennetab aju negatiivseid järelmõjusid ja valmistub kas põgenema või võitlema. Kui järgneval päeval katset korrata tõuseb kortisooli tase tunduvalt vähem. Olukorra kordudes on ajus olemas eelneva sündmuse kogemus, mis võimaldab hinnata stressivastuse vajalikust (Kirschbaum jt, 1995). Stressivastusega on tihedalt seotud hipokampus, amügdala ja orbitofrontaalkoor. Need ajustruktuurid osalevad keskkonnast tulenevate sisendite hindamises

ning adekvaatsete väljundite genereerimises. Psühhiaatriliste haigusseisundite korral võib esineda pidev stressivastus, mis põhjustab organismis asjatut ressurside kulu.



**Joonis 1. Inimese aju ehitust illustreerivad vaated.** Vasakul on esitatud aju ruumiline kujutis ja paremal sagitaallõige. Välja on toodud peamised kortikaalsed ja limbilise süsteemiga seotud subkortikaalsed alad. AMY – amügdala (bilateraalne; violetne), ATL – anterioorne temporaalsagar (bilateraalne), BG – basaalganglionid, CER – tserebellum ehk väikeaju, CNG – tsingulaarkoor (heleroheline), HIP – hipokampus (bilateraalne; sinine) ja forniks (sinine), MO – medulla ehk piklikaju, NAC – *nucleus accumbens* ehk naalduv tuum (bilateraalne), OB – haistesibul (bilateraalne), OCX – oksipitaalne koor, OFC – orbitofrontaalkoor, PCX – parietaalne koor, PFC – prefrontaalkoor, PMC – primaarne motoorne koor, PONS – pons ehk ajusild, SEP – *septum pellucidum* ehk de Morsier` vahesein (tsingulaarkoore all asub *corpus callosum* ehk mõhnkeha, mõhnkeha all de Morsier` vahesein, de Morsier` vaheseina all paikneb forniks, forniksi all taalamus), SSC – somatosensoorne koor, TA – taalamus (oranž), TEM – temporaalsagar (bilateraalne). Hipokampus seostub kognitiivsete võimete: õppimise ja mälu kujunemisega. Amügdala seostub emotsioonide protsessimisega, anterioorne temporaalsagar sotsiaalse kognitsiooni ning prefrontaalkoor mentaliseerimisega. Prefrontaalkoor vastutab emotsioonide ja käitumise kontrolli ning edasi lükatud gratifikatsiooni eest (Papez, 1937; Baron-Cohen jt, 1985; Adolphs jt, 1994; Baron-Cohen jt, 1999; Fowler jt, 2007; Frith ja Frith, 2007; Patterson jt, 2007; Paz jt, 2010; Naya ja Suzuki, 2011).

### 1.1.1. Amügdala tähtsus limbilises süsteemis

Suuremate ja üha komplekssemate inimgruppide moodustumine ning sotsiaalsete interaktsioonide üha kasvav komplekssus eeldab suuremat arvutusvõimsust sotsiaalsete interaktsioonide eest vastutavalt ajuosalt. Suurem kalkuleerimisvõimsus tuleneb suuremast neuronite arvust ja nende omavaheliste ühenduste hulgast. Primaatide uuringud on näidanud,

et amügdala suuruse ning sotsiaalsete interaktsioonide arvu ja kvaliteedi vahel esineb korrelatsioon (Lewis ja Barton, 2006). Isenditel, kes elavad suures sotsiaalses grupis, esineb amügdalas suurenenud kortikobasolateraalne kompleks (Bickart jt, 2010). Kortikobasolateraalne kompleks on tihedalt seotud nii hipokampuse kui ka orbitofrontaalkoorega. Uuringud inimestel on kinnitanud korrelatsiooni sotsiaalsuse ning suurenenud amügdala, temporaal- ja frontaalsagarate mahu vahel (Bickart jt, 2011; Kanai jt, 2011; Lewis jt, 2011; Powell jt, 2012). Amügdalat on ajalooliselt peetud oluliseks emotsioonide protsessimisel ja sotsiaalse käitumise kujunemisel. Amügdalat on eriti seostatud ärevuskäitumise ja hirmu kujunemisega. Metsiku šimpansi amügdala bilateraalsel eemaldamisel saadakse taltsas loom, kes ei reageeri enam hirmustiimulile (Klüver ja Bucy, 1939). Bilateraalse amügdala kahjustuse korral minetab inimene võime tuvastada näoilme hirmu või teisi emotsioone, kuigi võime tuvastada nägusid säilib (Adolphs jt, 1994). Amügdala on tihedalt seotud temporaalsagara anteriorse osaga, mida seostatakse sotsiaalse kognitsiooniga. Anterioorne temporaalsagar vastutab täpsemalt sotsiaalsete teadmiste salvestamise ja esile kutsumise eest. Sotsiaalsed teadmised on mälestused inimeste kohta näiteks nimed, biograafia ning abstraktsemat vormi teadmised nagu mälu tunnuste ja sotsiaalsete kontseptsioonide kohta (Patterson jt, 2007). Anterioorne temporaalsagar on tihedalt seotud nii amügdala kui ka orbitofrontaalkoorega (Olson jt, 2013). Amügdala funktsioon inimesel näib olevat tuvastada emotsioone ja anda vastav teave edasi orbitofrontaalkoorde.

### **1.1.2. Hipokampuse tähtsus limbilises süsteemis**

Hipokampus on oluline õppimisvõimes ja mälu kujunemises. Hipokampus võimaldab autobiograafilistes minevikusündmustes orienteerumist, nende sündmuste esile toomist ja võrdlust (Paz jt, 2010; Naya ja Suzuki, 2011). Võrdlevad mälu protsessid võimaldavad hinnata keskkonnast saadud teabe relevantsust eelnevate emotsionaalselt oluliste kogemustega võrreldes (Squire jt, 2007). Kontrastsemad muutused keskkonnas põhjustavad esmalt hipokampuse ja järgnevalt amügdala aktivatsiooni ning osalevad käitumusliku vastuse kujunemises (Fudge jt, 2012). Hipokampus näib olevat väliskeskkonnast tuleva teabe koordinaator limbilises süsteemis (Squire, 1993). Hipokampuse võib jaotada kolme ossa: ventraalne, intermediaalne ja dorsaalne. Dorsaalne osa on seotud kognitiivsete võimete: õppimise ja mälu. Ventraalne osa on seotud motivatsiooni ja emotsionaalse käitumisega.

Ventraalne osa on ühtlasi tihedas kontaktis amügdalaga. Dorsaalset ja ventraalset osa ühendav vahepealne regioon seob kognitiivse ja ruumilise teabe motiveeritud tegevuseks (Bast, 2007; Bast jt, 2009). Hipokampus on näide sellest, kuidas erinevad funktsioonid ajus ei paikne mitte kindlalt piiritletud anatoomilises alas, vaid moodustavad kontiinumi üle mitme ajuosa. Hipokampus demonstreerib ka, kuidas üks ajuosa võimaldab mitmesuguse teabe funktsionaalset töötlust.

### **1.1.3. Prefrontaalkoore tähtsus limbilises süsteemis**

Sotsiaalses keskkonnas on vajalik pidev enesekäitumise ja teiste sotsiaalsete objektide analüüs. Inimene on võimeline mõistma enda ja teise inimese käitumist mõjutavaid meeleseisundeid ning nende meeleseisundite ja nähtava käitumise vahelisi seoseid ehk inimene on võimeline mentaliseerima (Baron-Cohen jt, 1985, 1999; Frith ja Frith, 2007). Mentaliseerimine võimaldab sotsiaalseid käitumisi nagu petmine, koostöö, vastastikune mõistmine ja empaatia. Mentaliseerimine on suuresti seotud dorsomediaalse frontaalkoorega (Gallagher ja Frith, 2003; Amodio ja Frith, 2006). Kliinilised fMRI uuringud on näidanud, et patsiendid, kellel esinevad dorsomediaalse frontaalkoore kahjustused on mentaliseerimine tugevalt häiritud (Happe jt, 1999; Rowe jt, 2001; Stuss jt, 2001). Üldiselt on orbitofrontaalkoor oluline emotsioonide ja käitumise kontrollis ning gratifikatsiooni edasi lükkamises. Ilmselt paikneb emotsioonide loomekeskus amügdalas. Kuid kõrgemad sotsiaalsed kognitiivsed võimed avarduvad ainult hipokampuse, amügdala, anterioorse temporaalsagara ja orbitofrontaalkoore koostöös. Näiteks tuleneb empaatiavõime mediaalse, ventromediaalse ja orbitofrontaalse koore, anterioorse tsingulaarkoore ja anterioorse insula koostööst (Singer jt, 2004; Singer, 2006; Pessoa, 2008; Kennedy ja Adolphs, 2012; Melloni jt, 2014).

Väikesed kõrvalekalded limbilises süsteemis võivad põhjustada märgatavaid käitumuslikke muutusi. Näiteks on tähelepanu defitsiidi ja hüperaktiivsuse sündroomi (*attention deficit hyperactivity disorder*, ADHD) all kannatavatel patsientidel amügdala basolateraalne kompleks väiksem kui tervetel indiviididel. Amügdala basolateraalne kompleks on aga oluline hipokampuse, amügdala ja orbitofrontaalkoore ühendamisel. Hipokampuse, amügdala ja orbitofrontaalkoore ebapiisav sidusus võib selgitada ADHDga seotud käitumishäireid. Vajalik teave ei jõua ajuosade ebapiisava ühenduse tõttu orbitofrontaalkoore ja ei võimalda

vastu võtta adekvaatseid otsuseid (Plessen jt, 2006). Üldiselt on täiseas esinevate prefrontaalkoore kahjustuste korral täheldatud raskusi otsuste vastu võtmisel. Raskemate kahjustuste korral imikueas esineb lisaks düssotsiaalne käitumine: sõprade ja empaatiavõime puudumine, teiste inimeste vastane vägivaldsus ning kriminaalsus. Kuigi selliste patsientide kognitiivsed võimed on enamuses säilinud, on nende sotsiaalsed võimed olematud ja need indiviidid kujutavad selle tulemusena ohtu nii iseendale kui ka ühiskonnale (Anderson jt, 1999).

Üha enam leidub kinnitust, et limbiline süsteem vastutab mitte niivõrd spetsiifilise analüütilise funktsiooni, kuivõrd süsteemse lähenemise eest, mis võimaldab organismi poolt kogetavat teavet analüüsida. Limbiline süsteem koos mitte-limbiliste ajuosadega annab kogetud teabele organismi ellujäämise seisukohalt olulise hinnangu. Limbilise süsteemiga seotud haigused põhjustavad kõrvalekaldeid normaalsest prioritseerimisest ning toovad kaasa ebamäärase sotsiaalse käitumise, mis loomariigis viib tihti kohasuse languseni või organismi surmani (Silk, 2007). Inimesel esineb ebamäärane sotsiaalne käitumine psühhiaatriliste häirete nagu autismi, skisofreenia, düssotsiaalse isiksusehäire, depressiooni või ärevuse korral.

## 1.2. IgLON perekond

Ajustruktuuride korrektne moodustumine ja funktsionaalne terviklikus sõltub mitmete signaalmolekulide ja adhesiivsete kontaktide õigeaegsest moodustumisest. Vajalike kontaktide õigeaegne puudumine põhjustab aju tegevuses hälbeid, mis avalduvad erinevate haiguste kujul. Käesolev töö keskendub ühte sellist adhesioonimolekuli kodeeriva geeni – *LSAMP* uurimisele. Organismi arengus olulised raku adhesioonimolekulid võib jagada nelja suuremasse gruppi: immunoglobuliinide superperekond (*immunoglobulin superfamily*, IgSF), integriinid, kadheriinid ja selektiinid (Hynes, 1999). IgSF perekonna adhesioonivalke iseloomustab vähemalt ühe immunoglobuliini domeeni esinemine. Inimgenoom kodeerib 765 vähemalt ühe immunoglobuliini domeeniga adhesioonimolekuli (Lander jt, 2001). IgSF perekonna adhesioonivalgud on väga stabiilsed ja interakteeruvad rakumembraanil erinevate ligandide või opositsiooniliste retseptoritega.

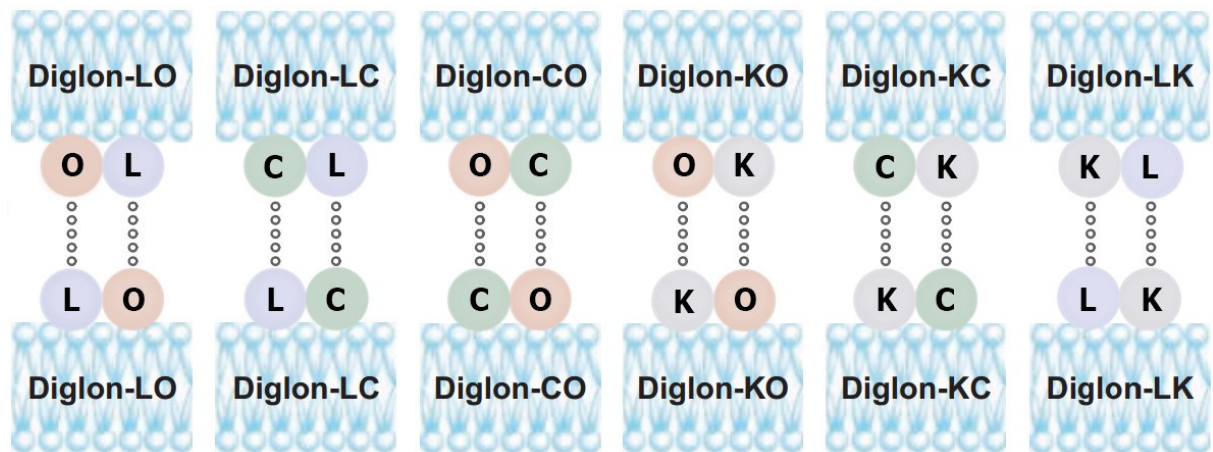
IgLON perekond kuulub IgSF alam perekondade hulka ja koosneb viiest geenist: *IgLON1* ehk opoide-siduv raku adhesioonimolekul (*opioid-binding cell adhesion molecule*, *OBCAM*) (Schofield jt, 1989), *IgLON2* ehk neurotrimin/*CEPU-1* (vastavalt närilise ja kana ortoloogid) (Struyk jt, 1995; Spaltmann ja Brümmendorf, 1996), *IgLON3* ehk limbilise süsteemiga assotsieeruv membraanvalk (*limbic system-associated membrane protein*, *LSAMP*) (Levitt jt, 1984), *IgLON4* ehk kilon/neurotractin (vastavalt närilise ja kana ortoloogid) (Funatsu jt, 1999; Marg jt, 1999) ja *IgLON5*.<sup>1</sup> Kõigil IgLONitel esineb 3 immunoglobuliini domeeni ning glükosüül-fosfatidüül-inositol (*glycosylphosphatidylinositol*, GPI) ankur, mille vahendusel toimub kinnitumine rakumembraanile.<sup>2</sup> IgLONid on suhteliselt väiksearvuline konserveerunud valke kodeeriv perekond.<sup>3</sup> IgLONid osalevad rakkudevahelises adhesiooniprotsessis enamasti kesknärvisüsteemis, eriti ajus, kuid vähesel määral ka ülejäänud organismis (Wang jt, 2008).<sup>4</sup>

IgLONite omavaheline valgujärjestuse kattuvus ulatub 45-73%. Kõige sarnasemad on *IgLON1* ja *IgLON2*, mille valgujärjestuste kattuvus ületab 70% piiri (lisa 1). Enim konserveerunud on valgujärjestuses immunoglobuliini domeenid. Konserveerunud on ka GPI ankur, millega IgLONid rakumembraani kinnituvad. *IgLON1* ja *IgLON2* paiknevad lähestikku inimese 11 kromosoomi pikema õla subtelomeraalses alas q12.1 regioonis. Geenid asetsevad teineteise suhtes invertsele ja nende vahele jääb 50 kb mittekodeeriv ala.<sup>5</sup> Ilmselt on antud regioonis aset leidnud hiljutine duplikatsioonisündmus, mis seletaks ka *IgLON1* ja *IgLON2*

valgujärjestuste suure kattuvuse. Inimese *LSAMP* geen asub 3. kromosoomi pikemas õlas.<sup>6</sup> *LSAMP* on keskmiselt kõige sarnasem kõigi teiste perekonna liikmetega ning on võimalik, et vastav sarnasus on funktsionaalselt oluline. *IgLON4* asub 1. kromosoomi lühemas õlas ja *IgLON5* 19. kromosoomi pikemas õlas.<sup>7,8</sup>

### 1.2.1. IgLON perekonna tähtsus

IgLON perekonna liikmed on võimelised moodustama rakumembraani lipiidiparvedel dimeere. Kaks hetero- või homofiilset IgLONit moodustavad funktsionaalse Digloni. Neljast IgLONist võib moodustuda kuni 6 heterofiilset Diglonit (joonis 2). Hetero- ja homofiilsed interaktsioonid erinevad afiinsuselt ning üldjuhul on heterofiilsed interaktsioonid tugevamad kui homofiilsed. Ilmselt on kõrge valgujärjestuse homoloogia vajalik perekonnasiseste dimeeride ehk Diglonite moodustumisel (Gil jt, 1998; Lodge jt, 2000; Reed jt, 2004; Akeel jt, 2011). Efektne näide Diglonite formeerumisest on Diglon-CO, *CEPU-1* ja *OBCAM*i dimeer, mis blokeerib rakukultuuris väikeaju granulaarrakkude alampopulatsiooni neuroitide väljakasvud (Reed jt, 2004).



**Joonis 2. Võimalikud IgLONite dimeerid ehk Diglonid.** O – OBCAM, L – LSAMP, C – CEPU-1/neurotrimin, K – kilon. Kaks IgLONit moodustavad funktsionaalse dimeeri ehk Digloni. Näiteks moodustub Diglon-LO LSAMPi ja OBCAMi dimeeriseerumisel rakumembraanil (Reed jt, 2004).

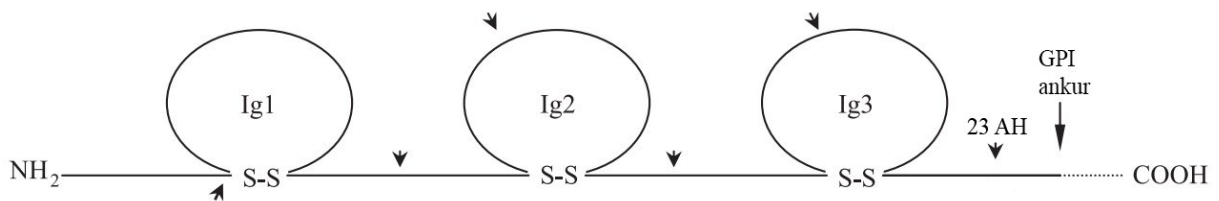
IgLONid on potentsiaalsed tuumor-supressorid (Chen jt, 2003; Ntougkos jt, 2005; Wang jt, 2008; Yen jt, 2009). Lisaks osalevad IgLONid neurogeneesis ja sünaptoogeneesis (Hashimoto jt, 2009). Nende roll avaldub enamasti Diglonitena neuronite adhesioonis ja kasvukoonuste aktivatsioonis või inhibitsioonis (Zhukareva ja Levitt, 1995; Spaltmann ja Brümmendorf,

1996; Gil jt, 1998; Mann jt, 1998; Marg jt, 1999; Lodge jt, 2000; Gil jt, 2002). IgLONite väga madal ekspressioon organites viitab nende olulisusele pigem kesknärvisüsteemis. Ka IgLONitele keskendunud teadusuuringud on kinnitanud nende närvisüsteemi keskset rolli (Reed jt, 2004; McNamee jt, 2011; Ye jt, 2014). Mitmed uuringud on omistanud *OBCAM*ille tuumor-supressori rolli nii munajuhas kui ka kesknärvisüsteemis (Sellar jt, 2003; Czekierdowski jt, 2006; Reed jt, 2007). Ühtlasi on polümorfisme *OBCAM*i geenis seostatud skisofreeniaga (O'Donovanet jt, 2008; Panichareon jt, 2012). Neurotrimini on seostatud intelligentsuse, aksonite juhtimise ja sünaptoogeneesiga (Chen jt, 2001; Pan jt, 2011). Hiljutine uuring on seostanud neurotrimini ja *OBCAM*i ekspressiooni muutusi autismi-laadsete arenguhäiretega (Minhas jt, 2012). Kilonit, sarnaselt *OBCAM*iga, on seostatud kesknärvisüsteemi kasvajatega (Takita jt, 2011). *LSAMP*i on seostatud inimesel neeruvähiga (Chen jt, 2003). Lisaks esineb *Lsamp*-/- hiirtel evolutsiooniliselt jätkusuutmatu käitumismuster: alanenud isasloomade vaheline agressiivsus, isasloomade vahelise sotsiaalse hierarhia mittemõistmine või selle eiramine ja tavapärasest vähemärev käitumine. Sellised hiired satuvad looduses kergemini kiskjate küüsi, kannatavad sotsiaalse tagakiusamise all ja annavad väiksema tõenäosusega järglasi (Innos jt, 2012). Inimese neuropsühhiaatriliste seisundite korral nagu bipolaarne häire või skisofreenia esineb dorsomediaalses prefrontaalkoores *LSAMP* valguga 20% üleekspressioon (Behan jt, 2009). Lisaks on polümorfisme *LSAMP* geenis seostatud inimesel enesetapu, depressiooni, bipolaarse häire ja skisofreeniaga (Must jt, 2008; Koido jt, 2012; Koido jt, 2014). *LSAMP* geeni ekspressiooni häirimise tulemus on evolutsiooniliselt ebasoodne sotsiaalne käitumine, mis langetab indiviidi kohasust.

### 1.3. *LSAMP*

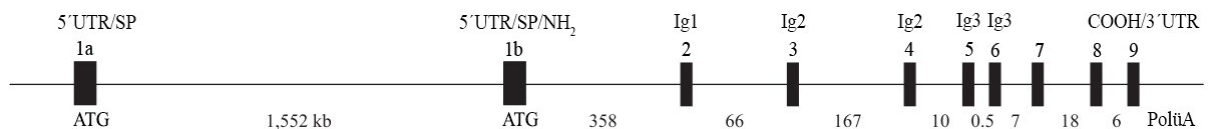
Limbilise süsteemiga seotud membraanvalk (ingl *limbic-system associated membrane protein*, LSAMP) on *LSAMP* geeni poolt kodeeritud 64- kuni 68-kDa tugevalt glükosüleeritud adhesioonimolekul, mida iseloomustavad 3 immunoglobuliini domeeni ja GPI ankur (joonis 3). LSAMP ekspresseerub enamasti limbilises süsteemis postsünaptiliselt rakukehal ja dendriitidel ning kuni 2 nädalat pärast sündi aksonite pinnal (Levitt, 1984; Horton ja Levitt, 1988; Zacco jt, 1990; Cote jt, 1995). Ekspressioonimuutus kesknärvisüsteemis aksoni pinnalt rakukehale ja dendriitidele võib olla seotud esialgsete juhteteede paika seadmisega. LSAMPil võib esineda alternatiivse splaissimise tõttu mitmeid valgu isovorme, mis omavad pre- ja postsünaptiliselt erinevaid rolle (Eagleson jt, 2003). LSAMP-positiivsetes hipokampuse ja peririnaalkoore neuronites indutseerib LSAMP molekuli üleekspressioon adhesiooni ja neuriitide välja kasvu (Pimenta jt, 1995; Zhukareva ja Levitt, 1995). Samas inhibeerib LSAMP neuronite väljakasve LSAMP-negatiivsetes dorsaaljuure ganglionites (Gil jt, 2002). Hipokampuses võivad moodustuda Diglonid IgLON1, IgLON4 ja LSAMP molekulide vahel, mis ekspressioonipiirkondade kattumise tõttu edutavad neuronite väljakasvude teket. Samas inhibeerivad IgLON4 ja LSAMP dimeerid superioorse kaelaganglioni neuronite väljakasve (Eagleson jt, 2003). Erinevad seondumispartnerid võivad seletada, miks LSAMP valk kord inhibeerib ja teine kord indutseerib väljakasvude teket.

*LSAMP* geen esineb 2,2 Mb alas , millest suurema osa moodustab peaaegu 1,6 Mb esimene intron (Pimenta ja Levitt, 2004). *LSAMP* geenil on näidatud kahe esimese eksoni 1a ja 1b olemasolu. Mõlemale esimesele eksonile eelneb funktsionaalne promootor (joonis 4). Lisaks esineb *LSAMP* geenil alternatiivne splaissimine, mille funktsioon on seni ebaselge, kuid võib olla seotud eri isovormide tekkega. *LSAMP* geeni iseloomustab liikidevaheline tugev konserveerumine. Näiteks esineb inimese ja roti ortoloogide vahel 94% DNA järjestuste kattuvus ja märkimisväärne 99% valgujärjestuse kattuvus. 338 aminohappes erineb vaid neli ning antud erinevus ei muuda valgu tertsiaarstruktuuri. Järjestusest ilmneb kolme C2 tüüpi immunoglobuliini domeeni esinemine (Pimenta ja Levitt, 2004). Esimene immunoglobuliin domeen näib olevat vajalik neuriitide välja kasvuks ja teine immunoglobuliin domeen neuriitide inhibitsiooniks. Lisaks võib kolmanda immunoglobuliini domeeni roll olla siduda täiendavaid partnermolekule inhibitsiooni või induktsiooni esile kutsumisel (Eagleson jt, 2003).



**Joonis 3. LSAMP valgu struktuur.** Joonisel on rõhutatud GPI ankruga ja 23 aminohappelise insertiooni asukohta. Eraldi on noolekestega välja toodu eksonite piirid (Pimenta ja Levitt, 2004).

Esimene immunoglobuliini domeen asub täielikult eksonis 2, teine domeen eksonites 3 ja 4 ning kolmas domeen eksonites 5 ja 6. Eksonid 7 ja 8, vastavalt 12 ja 11 koodonit pikad, alluvad alternatiivsele splaissimisele, mille korral lisandub või puudub 69-nukleotiidne lisajärjestus (joonis 4). 69 nukleotiidist saadakse 23 aminohappeline insertioon enne kolmandat immunoglobuliini domeeni. Viimases eksonis paikneb valgu C-terminust kodeeriv ala ja 3'-UTR koos polüadenüülatsioonisaadikuga (joonis 3) (Pimenta ja Levitt, 2004).

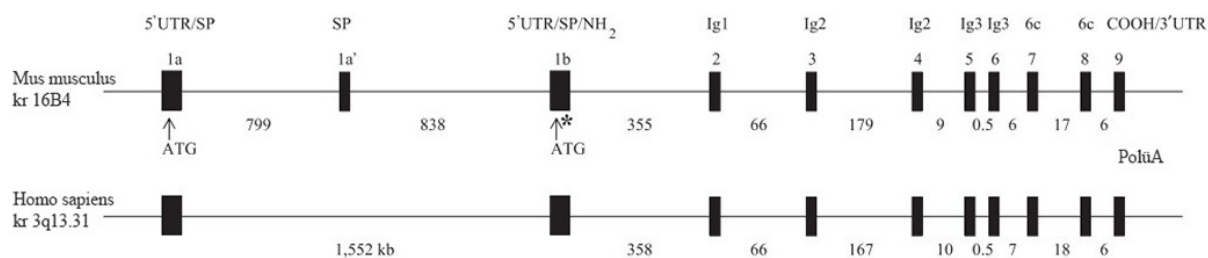


**Joonis 4. Inimese LSAMP geeni struktuur.** Joonisel on esimene ekson (1a) ja alternatiivne esimene ekson (1b) ning immunoglobuliini domeene kodeerivad eksonid 2-6 (Pimenta ja Levitt, 2004).

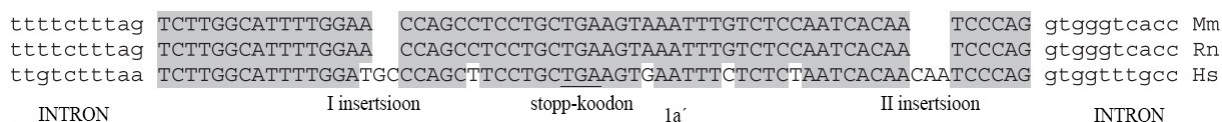
Järjestuse analüüs detekteerib ka signaalpeptiidi kodeeriva ala, mis võimaldab ilmselt LSAMP valgu alternatiivset post-translatsioonilist modifitseerimist. Ilmneb ka GPI domeen, kus paikneb valgu hüdrofoobset C-terminust kodeeriv ala. Alternatiivses valgu isovormis paikneb GPI ankruga järel veel lisaks signaalpeptiidile 23 aminohappeline lisajärjestus, mis ilmselt tõstab adhesioonimolekuli kontaktpinna rakumembraanist kõrgemale soodustades nii interaktsioonide toimumist LSAMP molekuli ja opositsioonilise partneri vahel (Pimenta ja Levitt, 2004).

Suurte geenide korral on nende konserveerumise põhjuseks regulatoorsed alad 5'-UTR ja/või 3'-UTR regioonis ning intronitel. Seda on näidatud immunoglobuliini superperekonna korral, kus L1 ja neurogranin CAMid sisaldavad esimeses intronis regulatoorseid elemente, nii enhanserit (*enhancer*) kui ka vaigistajat (*silencer*). Ka *Lsamp* geenil esineb koospetsiifiline regulatoorne mehhanism, mis tagab kõrge ekspressioonitaseme ajus, kuid madala taseme organites (Kallunki jt, 1995, 1997, 1998; Edelman ja Jones, 1998). Samas tagab kahe

promootori olemasolu paindlikku ekspressiooni arenenud ja arenevas organismis (Ayoubi ja Van De Ven, 1996).



**Joonis 5. Hiire ja inimese *LSAMP* geeni struktuuri võrdlus.** Hiirel on 1a' ekson, mis inimesel puudub. Välja on toodud erinev signaalpeptiidi kodeerimine (SP), inimesel vastavalt 1a ja 1b või 1b' eksoni poolt ning hiirel 1a, 1a' ja 1b eksoni poolt (Pimenta ja Levitt, 2004).



**Joonis 6. Hiire (Mm), roti (Rn) ja inimese (Hs) *LSAMP* geeni 1a' eksoni järjestuste erinevused.** Inimese esineb kaks insertiooni, mille tulemusel tekkis esmalt stopp-koodon ja järgnevalt rikuti akseptorsait. Inimese 1a' eksonit ei kaasata 1a 1a transkripti struktuuri. Hiirel ja rotil kaasatakse ka 1a' ekson 1a transkripti struktuuri (Pimenta ja Levitt, 2004).

Närlise geenis paiknevad vastavalt 1a ja 1a' eksonid, millele järgneb 1b ekson, seejärel eksonid 2 kuni 9. Samas inimesel 1a' ekson puudub. Inimesel on 1a' ekson läinud kaduma kahe mutatsioonilise sündmuse tagajärjel. Esmalt põhjustas kahe nukleotiidi lisandumine 1a' järjestuses allavoolu stopp-koodoni. Järgnevalt leidis ilmselt aset teine mutatsiooniline sündmus stopp-koodonist omakorda allavoolu, mille tulemusel rikuti 1a' eksoni akseptorsait. Akseptorsaidi defekti tõttu inimesel 1a' eksonit enam transkripti koosseisu ei kaasata (joonis 6). Hiirel toimub signaalpeptiidi kodeerimine 1a, 1a' ja 1b või 1b eksoni poolt, kuid inimesel paikneb 1a ja 1b eksonite vahel peaaegu 1,6 Mbp intron ja signaalpeptiid kodeeritakse 1a ja 1b' või 1b ja 1b' eksoni poolt. Inimesel paikneb 69-nukleotiidne signaaljärjestuse esimene osa 1a eksonil ja teine osa 1b eksoni lõpus. Kui transkriptsioon algab 1a promootorilt, lisandub 1b eksonist signaalpeptiidi kodeeriv osa, ekson 1b', aga ülejäänud 1b eksonist jääb transkriptist välja. Samas 1b promootori poolt kodeeritavas transkriptis on vaid 1b eksoni lõpuosas olev osaline signaaljärjestus (Pimenta ja Levitt, 2004). Signaalpeptiidi roll võib olla seotud post-translatsioonilise modifitseerimisega, mis omakorda võib olla vajalik erinevate glükosüleeritud isovormide esinemiseks rakumembraanil.

## **2. EKSPERIMENTAALOSA**

### **2.1. Töö eesmärgid**

1. Määrata kvantitatiivse reaalkaja-PCRiga *LSAMP* promootorite – 1a ja 1b – ekspresioonitasemed inimese ja hiire erinevates ajuosades
2. Võrrelda *LSAMP* promootorite ekspressiooni inimesel ja hiirel
3. Hinnata *LSAMP* promootorite ekspressiooni võimalikke muutusi skisofreeniahaigete dorsomediaalses prefrontaalkoores võrreldes tervete indiviididega
4. Hinnata polümorfismide mõju *LSAMP* transkriptide ekspresioonitasemele

## 2.2. Materjal ja meetodika

### 2.2.1. Inimese koeproovid

Inimese koeproovid eraldati *post-mortem* vastava ala spetsialisti poolt. Proovide kogumine ja töötlemine toimus Tartu Ülikooli inimuuringute eetika komitee otsuse 223/T-4 alusel. Vastava uurimustöö eesmärk on uurida IgLON geenipererkonna ekspresioonitaset mõjutavate genoomsete polümorfismide seost skisofreenia- ja suitsiidiriskiga. Käesolevas töös kasutati LSAMP ekspresiooni uurimisel kontrollindiviidide koeproove.

Skisofreeniapatsientide ja tervete indiviidide dorsomediaalse prefrontaalse koore koeproovid saadi Austraalia ajupankade ühenduselt (ingl *Australia Brain Bank Network*, ABBN). Kokku saadi 60 proovi, nende hulgas 30 proovi skisofreeniapatsientidelt.

### 2.2.2 Hiire koeproovid

Katseloomadena kasutati isaseid BL/6 metsiktüüpi hiiri. Katseloomad paljundati Tartu Ülikooli Arstiteaduskonna bio- ja siirdemeditsiini instituudi füsioloogia osakonnas. Hiirte geneetiline taust oli C57BL/6 (BL/6).

Loomad olid katsete teostamise ajal vanuses 16 nädalat. Kõik katseloomad olid isased ja neid hoiti puuris 8 kaupa. Katseloomad elasid 12 h/12 h valge/pime tsükli 22 °C juures, valge tsükli algusega kell 7 hommikul. Hiirtele oli võimaldatud vaba juurdepääs granuleeritud spetsiaaltoidule ja joogiveele tilgapudelist. Katse teostati Eesti Vabariigi Põllumajandusministeeriumi poolt välja antud loa alusel (number 39, välja antud 2005). Kõik loomadega seotud protseduurid olid heaks kiidetud Tartu Ülikooli Loomkatsete Eetika Komitee poolt.

Katseloomad surmati tservikaalse dislokatsiooni läbi vastava koolituse läbinud spetsialisti poolt. Järgnevalt eemaldati pea keha küljest ning aju koljust. Eemaldatud aju prepareeriti jääl treenitud eksperdi poolt. Organite eraldamine toimus pea eemaldamise järgselt. Võimalusel eemaldati terviklik organ. Eraldatud ajustruktuurid ja organid külmutati koheselt vedelas lämmastikus ning säilitati temperatuuril -80°C. Hiire aju prepareerimine toimus hiire aju atlase alusel (Franklin ja Paxinos, 1997).

### 2.2.3. RNA eraldamine ja cDNA süntees

Rakuline RNA eraldati organite ja ajuosade homogeniseerimisel. Homogeniseerimisel kasutati Trizol® reagenti (Invitrogen) ning tootja juhiseid. Proovid homogeniseeriti esialgu 100 µl Trizoli® reagensis. Järgnevalt proovid uhmerdati ja lisati ülejäänud osa reagenti, kuni soovitud 500 µl mahuni. Järgnevalt inkubeeriti toatemperatuuril 5 minutit ja lisati kloroformi 200 µl (Sigma-Aldrich) ning raputati tuube 15 sekundit. Inkubeeriti veel 2 minutit ja tsentrifuugiti eeljahutatud tsentrifuugis (Eppendorf 5810 R) 12 000 rpm 15 min 4°C juures. RNAd sisaldav vesifaas tõsteti ümber uude katsutisse ja lisati 250 µl isopropanooli (Naxo BioTop) RNA sadestamiseks. Proovid segati, inkubeeriti 10 minutit toatemperatuuril ja tsentrifuugiti 12 000 rpm 10 min 4°C juures. Järgnevalt isopropanool eemaldati ning lisati 1 ml jääkülma 75% etanooli. Proovid tsentrifuugiti viimast korda 7500 rpm 10 min 4°C juures. Etanool eemaldati ja katsutisse lisati 50 µl vett, misjärel suspendeeriti RNA sade üles. Proovid segati vorteksil ning mõõdeti RNA kontsentratsioonid NanoDrop ND-1000 spektrofotomeetril (NanoDrop Technologies).

cDNA sünteesil kasutati SuperScript™ III pöördtranskriptaasi (Invitrogen) ja heksameerseid oligonukleotiide vastavalt tootja juhendile. 20 µl reaktsiooni kohta võeti 1 µl (50 µg/ml) heksameerset praimerit (Applied Biosystems) ja 1 µl 10 mM dNTP segu (Fermentas). Praimerite seondumisel inkubeeriti proove 5 min 65°C juures. Järgnevalt tõsteti tuubid reaktsiooni peatamiseks vähemalt 1 min jääle. cDNA sünteesiks lisati proovidele 4 µl 5X First-Strand Buffer [250 mM Tris-HCl (pH 8,3 toatemperatuuril), 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>], 1 µl 0.1 M DTT, 1,25 µl H<sub>2</sub>O ja 0,75 µl SuperScript™ III pöördtranskriptaasi (200 U/µl). Proove inkubeeriti 60 min 50°C juures. Seejärel peatati reaktsioon hoides katsuteid 15 min 70°C juures. Sünteesitud cDNA proovid säilitati -80°C juures.

### 2.2.4. Kvantitatiivne reaalkaja-PCR

Praimerite selektsioon leidis aset Primer3 tarkvara vahendusel. Võimalikud praimerid valiti välja ampliconide spetsiifilisuse alusel geelelektroforeesi käigus. Järgnevalt testiti valitud praimereid ka kvantitatiivse reaalkaja-PCR (qRT-PCR) reaktsioonis. HPRT koduhoidja praimerid valiti eelnevalt läbiviidud katsete põhjal (tabel 1). *LSAMP* eksonite 1a ja 1b korral kasutati universaalset sondi ja universaalset reverse praimerit. Mõlemal juhul erines *forward*

primer. Inimese *forward* ja *reverse* primerite asetus tagab 1a *forward* primeri korral 125 ja 1b *forward* primeri korral 124 aluspaari pikkuse ampliconi tekke (joonis 7). Hiire korral erineb ainult 1a *forward* primeri asetus, mis asub 1a eksoni asemel 1a' eksonil (joonis 8).

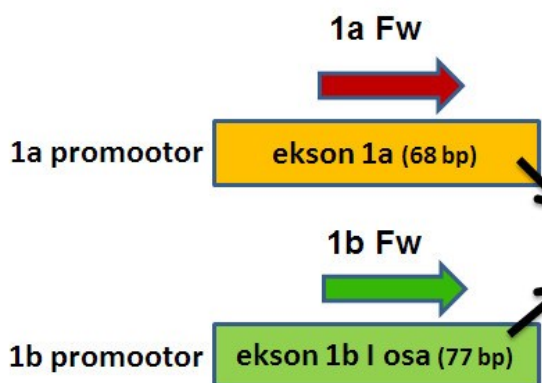
**Tabel 1. Reaalaja-PCRi reaktsioonis kasutatud inimese primerite ja sondide järjestused.**

<b>Oligo</b>	<b><i>Forward</i></b>	<b><i>Reverse</i></b>	<b>Sond</b>
<b>Lsamp 1a</b>	<b>5'-TCC TGT CCC TCT TCT CAT TGC-3'</b>	<b>5'-TTC TTG TCT TCT ACA ACG CAC CTG-3'</b>	<b>5'-FAM-AAC CGA GGC ACG GAC AAC-NFQ-MGB-3'</b>
<b>Lsamp 1b</b>	<b>5'-GAT TGC TCT GCC TTC TTC CCA-3'</b>	<b>5'-TTC TTG TCT TCT ACA ACG CAC CTG-3'</b>	<b>5'-FAM-AAC CGA GGC ACG GAC AAC-NFQ-MGB-3'</b>
<b>HPRT</b>	<b>5'-GAC TTT GCT TTC CTT GGT CAG G-3'</b>	<b>5'-AGT CTG GCT TAT ATC CAA CAC TTC G-3'</b>	<b>5'-VIC-TTT CAC CAG CAA GCT TGC GAC CTT GA- TAMRA-3'</b>

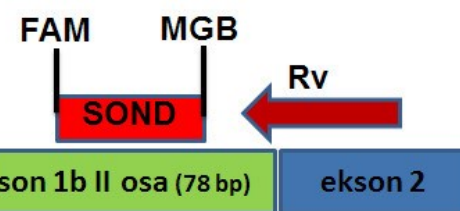
**Tabel 2. Reaalaja-PCRi reaktsioonis kasutatud hiire primerite ja sondide järjestused.**

<b>Oligo</b>	<b><i>Forward</i></b>	<b><i>Reverse</i></b>	<b>Sond</b>
<b>Lsamp 1a</b>	<b>5'-GCA TTT TGG AAC CAG CCT CCT G-3'</b>	<b>5'-TTC TTG TCT TCT ACC ACA CAC CTG-3'</b>	<b>5'-FAM-AAC CGA GGC ACG GAC AAC-NFQ-MGB- 3'</b>
<b>Lsamp 1b</b>	<b>5'-CGA TCG GAA ACA GTT GCC GC-3'</b>	<b>5'-TTC TTG TCT TCT ACC ACA CAC CTG-3'</b>	<b>5'-FAM-AAC CGA GGC ACG GAC AAC-NFQ-MGB- 3'</b>
<b>HPRT</b>	<b>5'-GCA GTA CAG CCC CAA AAT GG-3'</b>	<b>5'-AAC AAA GTC TGG CCT GTA TCC AA-3'</b>	<b>5'-VIC-AAG CTT GCT GGT GAA AAG GAC CTC TCG- TAMRA-3'</b>

## LSAMP transkriptide varieeruv osa

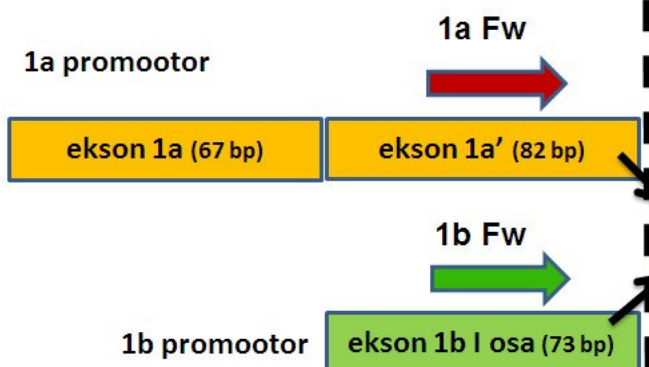


## LSAMP transkriptide universaalne osa

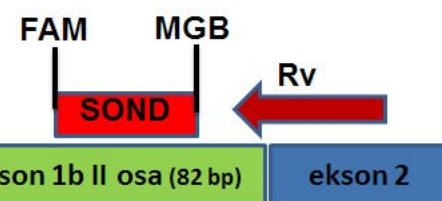


Joonis 7. Inimese *LSAMP* forward ja reverse praimerite asetus cDNAi kvantitatiivse reaallaja-PCRi reaktsiooni jaoks. Inimese 1a forward ja 1b forward ning universaalse reverse praimerite asetus tagab vastavalt 124 ja 125 aluspaarise ampliconi tekke.

## Lsamp transkriptide varieeruv osa



## Lsamp transkriptide universaalne osa



Joonis 8. Hiire *Lsamp* forward ja reverse praimerite asetus cDNAi kvantitatiivse reaallaja-PCRi reaktsiooni jaoks. Hiire 1a forward ja 1b forward ning universaalse reverse praimerite asetus tagab vastavalt 124 ja 125 aluspaarise ampliconi tekke.

*LSAMP* transkriptide tase kvantiteeriti reaallaja-PCRi reaktsioonis. Kõik reaktsioonid viidi läbi eraldi korduste (singleplex) kujul kasutades TaqMan® geeniekspressiooni segu 10X PCR Buffer [200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl] ja TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) reagenti. Kvantitatiivne reaallaja-PCR viidi läbi ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) ja ABI Prism 7900 SDS 2.4.2 tarkvara vahendusel. Reaktsiooni maht oli 10 µl ja igast proovist (1a, 1b ja HPRT) villiti neli kordust.

*LSAMP* transkriptide ekspressiooni tase mõõdeti FAM-märgistatud MGB-sondi kasutades ja standardiseeriti koduhoidja geeni HPRT VIC-TAMRA sondi suhtes. HPRT efektiivsus ja stabiilsus referentsgeeninena on eelnevalt tõestatud (Raud jt, 2009). Andmed analüüsiti ja teisendati  $2^{-\Delta CT}$  kujule (Livak ja Schmittgen, 2001).

### **2.2.5. SNP analüüs**

SNP analüüsis vaadeldi kahte inimese *LSAMP* geeniga assotsieeruvat polümorfismi rs1676232 ja rs9874470. Polümorfismi rs1676232 on varem seostatud vasaku koronaar- ehk pärgarteri aterosklerootiliste haigustega (Wang jt, 2008). Polümorfismi rs9874470 on seostatud inimesel enesetapuga (Must jt, 2008).

Inimese parema või vasaku hipokampuse koeproovist eraldati genoomne DNA FavorPrep™ Tissue DNA Extraction Mini Kit (Favorgen) abil vastavalt tootja juhistele. Polümorfismide esinemist kontrolliti TaqMan® SNP Genotyping Assay (Life Technologies) vahendusel. Polümorfismi rs1676232 korral vaadeldi A alleeli esinemist VIC ja G alleeli esinemist FAM reporteriga ning polümorfismi rs9874470 korral C alleeli esinemist VIC ja T alleeli esinemist FAM reporteriga. Kvantitatiivne PCRi (qPCR) reaktsioon viidi läbi 5x HOT FIREPol® Probe qPCR Mix Plus (ROX) reaktsioonisegus (Solis BioDyne) vastavalt tootja juhistele. Reaktsioone korrati vähemalt kaks korda ja villiti 4 kordust. Reaktsioon ja analüüs viidi läbi vastavalt ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) ja ABI Prism 7900 SDS 2.4.2 tarkvara vahendusel.

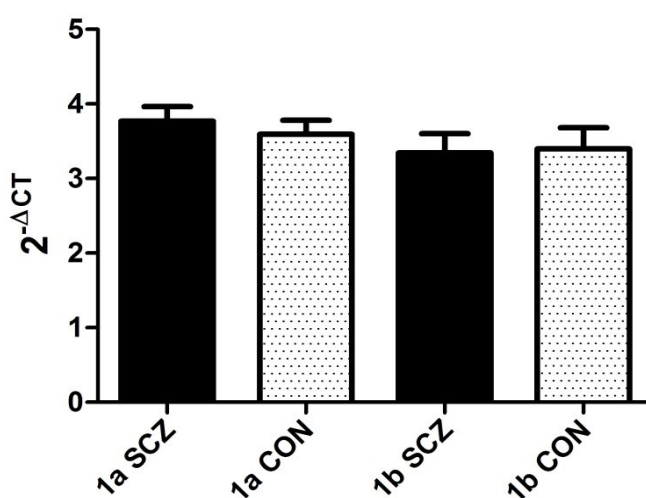
### **2.2.6 Andmete statistiline analüüs**

Reaalaja-PCRi andmete statistiline analüüs viidi läbi paardumata Studenti T-testiga. Tulemused väljendati keskmiste väärtustena koos keskväärtuse standardveaga (ingl *standard error of the mean*, SEM). Graafikud loodi GraphPad Prism 5 tarkvara vahendusel. Pilte töödeldi Adobe Photoshop CS6 vahendusel.

## 2.3. Tulemused

### 2.3.1. *LSAMP* geeni ekspressioon skisofreeniapatsientide dorsomediaalses prefrontaalkoores

Käesoleva töö käigus võrreldi skisofreeniapatsientide ja tervete indiviidide *LSAMP* geeni ekspressiooni taset dorsomediaalses prefrontaalkoores. Võrdluse eesmärk oli tuvastada kõrgenenud *LSAMP* transkriptide ekspressioon skisofreeniapatsientide dorsomediaalses prefrontaalkoores. Eelnevalt avaldatud teabe põhjal esineb skisofreeniapatsientidel 20% *LSAMP* valgu üleekspressioon dorsolateraalses prefrontaalkoores (Behan jt, 2009).



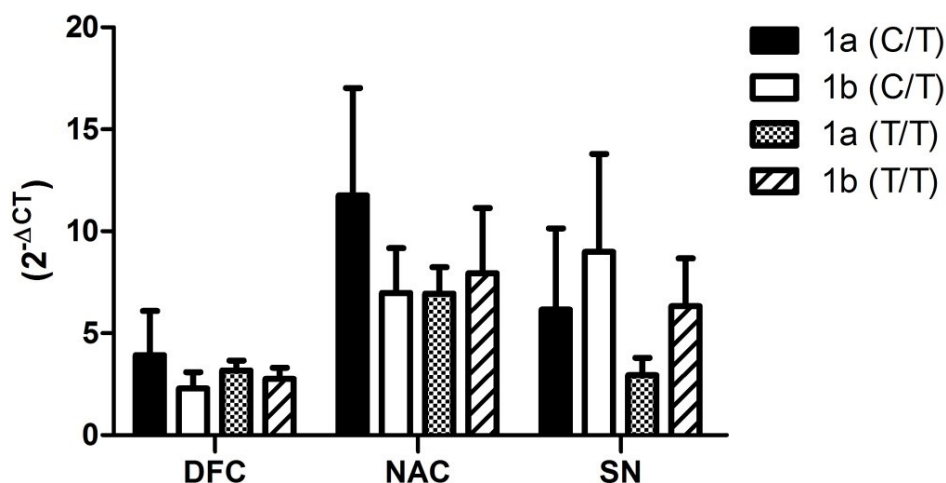
**Joonis 9. 1a ja 1b promootorite suhteline ekspressiooni tase skisofreeniapatsientide ja tervete indiviidide dorsomediaalses prefrontaalkoores.** 1a SCZ – skisofreeniapatsientide 1a promootori (n=30) ja 1b SCZ – skisofreeniapatsientide 1b promootori ekspressioon (n=30), 1a CON – tervete indiviidide 1a promootori (n=30) ja 1b CON – tervete indiviidide 1b promootori ekspressioon (n=30)  $2^{-\Delta CT}$  kujul koos SEMiga.

*LSAMP* geeni promootorite 1a ja 1b dorsomediaalse prefrontaalkoores ekspressioonid on esitatud joonisel 9 promootorite järgi  $2^{-\Delta CT}$  kujul koos keskväärtuse standardveaga. Kokku saadi 60 proovi, nende hulgas 30 proovi skisofreeniapatsientidelt ja 30 proovi kontrollgrupilt. Skisofreeniapatsientide dorsomediaalse prefrontaalkoores 1a promootori keskmine ekspressioon on  $3,770 \pm 0,195$  ja 1b  $3,342 \pm 0,262$   $2^{-\Delta CT}$ . Tervete indiviidide 1a promootori keskmine ekspressioon on  $3,593 \pm 0,189$  ja 1b  $3,396 \pm 0,285$   $2^{-\Delta CT}$  (joonis 9). Üldeekspressioon kombineerituna mõlemalt promootorilt on skisofreeniapatsientidel  $7,112 \pm 0,457$  ja kontrollgrupil  $6,988 \pm 0,475$   $2^{-\Delta CT}$ . Keskmised väärtused on toodud välja koos keskväärtuse standardveaga. Kokkuvõtvalt ei omanud skisofreeniapatsientide ja tervete indiviidide

promootorite 1a ja 1b aktiivsused statistiliselt olulisi erinevusi (1a korral  $p=0,51$  ja 1b korral  $p=0,89$ ).

### 2.3.2. *LSAMP* geeniekspressiooni seos polümorfismidega

Käesoleva töö käigus vaadeldi kahe *LSAMP* geeni polümorfismi rs1676232 ja rs9874470 seost promootorite aktiivsusega. Polümorfism rs1676232 asub *LSAMP* geeni esimeses intronis ja polümorfism rs9874470 teises intronis. Polümorfismi rs1676232 on varem seostatud vasaku koronaar- ehk pärgarteri ateroskleroosiga (Wang jt, 2008). Polümorfism rs9874470 seostub skisofreeniaga ja meeste lõpuleviidud enesetapuga (Must jt, 2008; Koido jt, 2014).



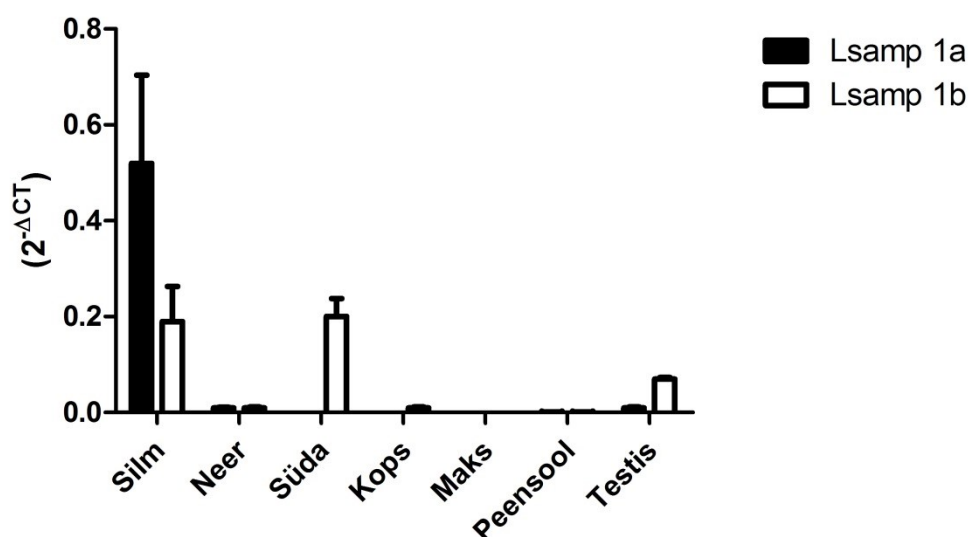
**Joonis 10. 1a ja 1b promootorite ekspressioon polümorfismi tüübi järgi.** Välja on toodud DFC – dorsolateraalne prefrontaalkoore (T/T  $n=4$  ja C/T  $n=3$ ), NAC – *nucleus accumbens*'i (T/T  $n=4$  ja C/T  $n=3$ ) ja SN – *substantia nigra* (T/T  $n=4$  ja C/T  $n=3$ ) ekspressioonid. Ekspressioonid on välja toodud  $2^{-\Delta CT}$  kujul koos SEMiga.

Tartus eraldatud *post-mortem* indiviidide hipokapuse koeproovidest eraldati genoomne DNA. DNA proove analüüsiti kahe polümorfismi rs1676232 ja rs9874470 suhtes. Polümorfismi rs1676232 korral esineb analüüsis ilmselt hälve, kuna kõikidel juhtudel oli tulemuseks sama genotüüp. Polümorfismi rs1676232 korral on vajalik edasine optimiseerimine. Polümorfismi rs9874470 korral vaadeldi polümorfismi ja dorsofrontaalse koore, *nucleus accumbens*'i, *substantia nigra* 1a ja 1b promootorite ekspressiooni seoseid. Dorsolateraalsetes

prefrontaalkoores ei esinenud 1a ja 1b promootorite ekspresioonis statistiliselt olulisi erinevusi (1a korral  $p=0,71$  ja 1b korral  $p=0,66$ ). *Nucleus accumbens*'is ei esinenud 1a ja 1b promootorite ekspresioonis statistiliselt olulisi erinevusi (1a korral  $p=0,35$  ja 1b korral  $p=0,83$ ). *Substantia nigra*'s ei esinenud 1a ja 1b promootorite ekspresioonis statistiliselt olulisi erinevusi (1a korral  $p=0,4$  ja 1b korral  $p=0,61$ ).

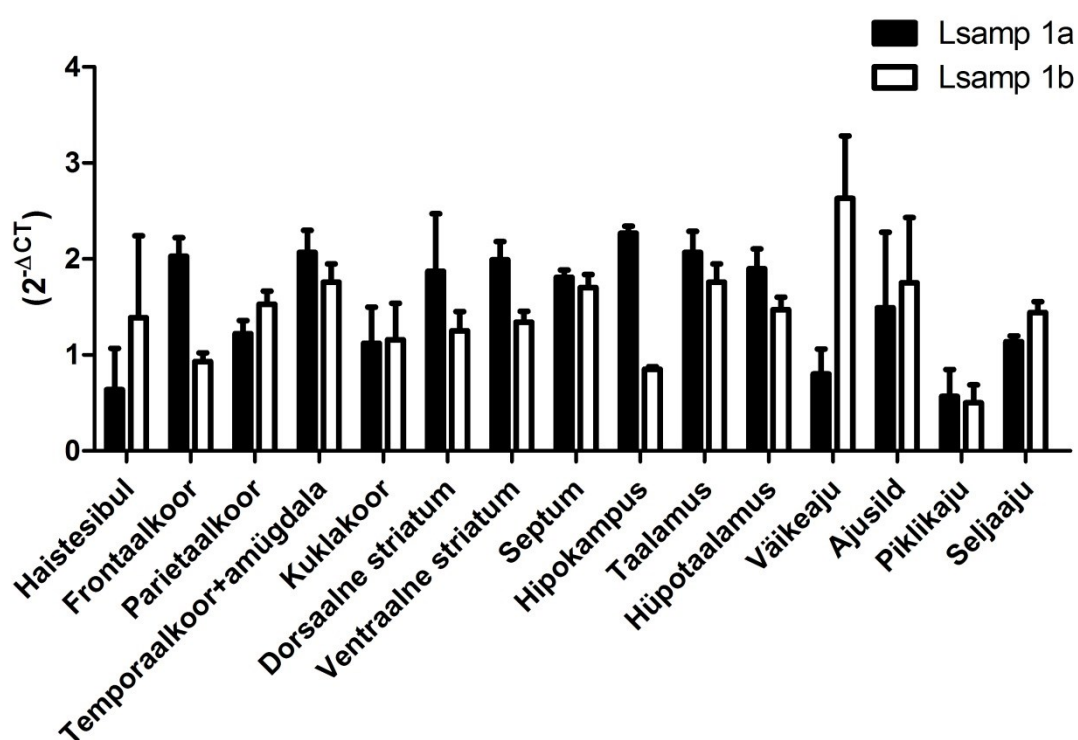
### 2.3.3. *Lsamp* geeni ekspressioon hiires

Hiire koeproovide eesmärk on pakkuda võrdlusmaterjali inimese koeproovide tulemustele ja kinnitada juba varem sooritatud katsete tulemusi. Selleks analüüsiti reaalaaja-PCRi vahendusel mitmeid hiire neuraalseid ja mitteneuraalseid kudesid. Joonisel 10 on välja toodud hiire organite kvantitatiivsed reaalaaja-PCRi tulemused  $2^{-\Delta CT}$  kujul koos keskvaertuse standardveaga. Kvantiteeritav ekspressioon esineb silmas 0,52 1a ja 0,19 1b promootorilt, neerus 0,005 1a ja 0,069 1b promootorilt, südames 0,2 1b promootorilt, kopsus 0,014 1b promootorilt. Madal ekspressioonitase on detekteeritav sooles 0,001 1a ja 0,002 1b promootorilt ning pankreases 0,002 1b promootorilt. Hiire maksas *Lsamp* ekspressiooni ei esine. Hiire mitteneuraalsete koeproovide tulemused kinnitavad *Lsamp* geeni ekspressiooni esinemist ka väljaspool neuraalseid kudesid.



**Joonis 11. *Lsamp* geeni ekspressioon hiire mitteneuraalsetes kudedes.** *Lsamp* geeni ekspressioon on välja toodud promootorite 1a ja 1b järgi  $2^{-\Delta CT}$  kujul koos SEMiga. Silm, neer, süda, kops, maks ( $n=3$ ) ja testis, peensool ( $n=1$ ).

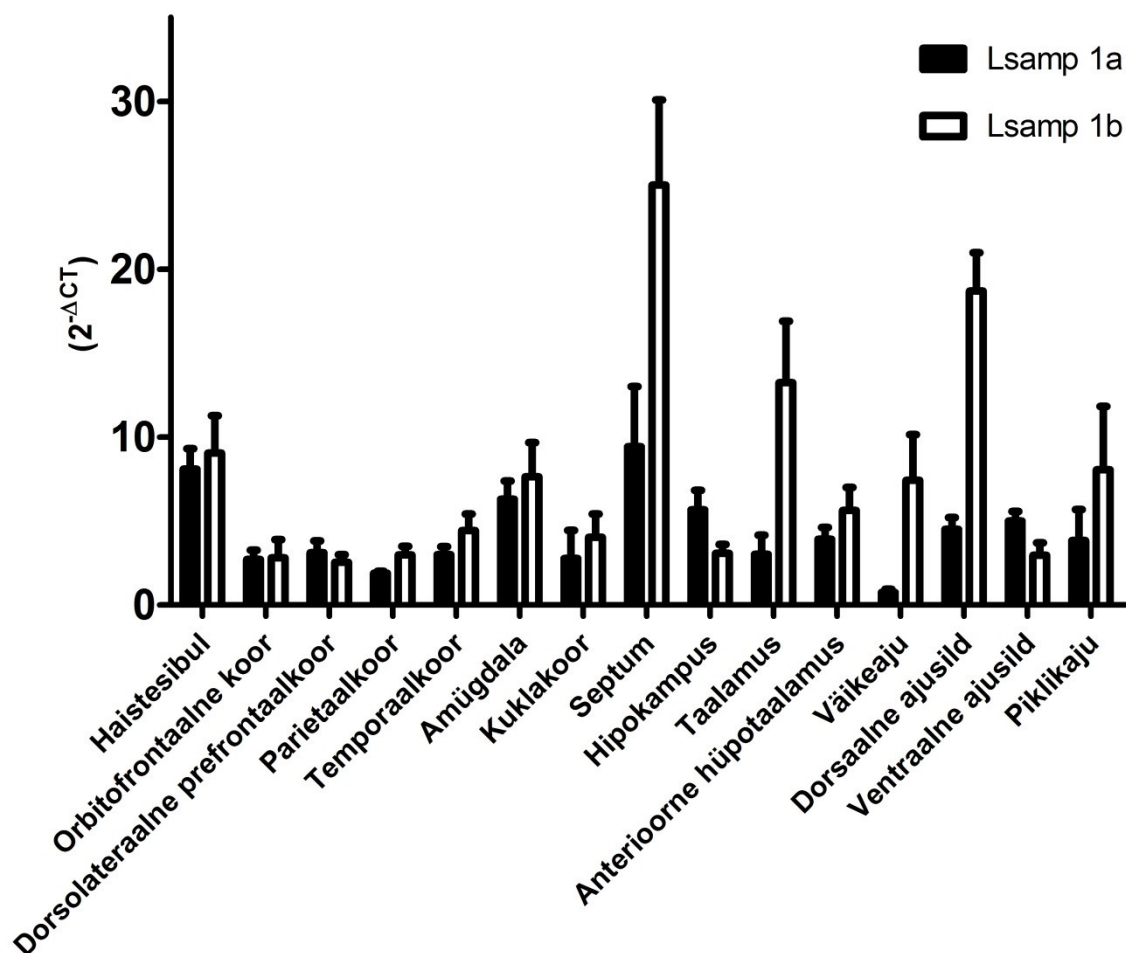
Hiire neuraalsete kudede ekspressiooniandmed on välja toodud joonisel 12. Hiire ajus esineb kahe *Lsmp* promootori ekspressioon kõigis vaadeldud ajuosades. Järgnevad reaalka-PCRi tulemused on esitatud  $2^{-\Delta CT}$  kujul koos keskväärtuse standardveaga. Ekspressioon esineb haistesibulas 0,64 1a ja 1,39 1b, frontaalkoores 2,03 1a ja 0,93 1b, parietaalkoores 1,22 1a ja 1,53 1b, temporaalkoores 2,37 1a ja 1,44 1b, kuklakoores 1,12 1a ja 1,16 1b, dorsaalses striatumis 1,87 1a ja 1,25 1b, ventraalses striatumis 1,98 1a ja 1,34 1b, septumis 1,81 1a ja 1,7 1b, hipokampus 2,25 1a ja 0,85 1b, taalamuses 2,07 1a ja 1,76 1b, hüpotaalamuses 1,9 1a ja 1,47 1b, väikeajus 0,8 1a ja 2,63 1b, ajusillas 1,49 1a ja 1,75 1b, piklikajus 0,57 1a ja 0,5 1b, seljaajus 1,14 1a ja 1,44 1b promootorilt.



**Joonis 12. *Lsmp* geeni ekspressioon hiire neuraalsetes kudedes.** *Lsmp* promootorite ekspressioon hiire neuraalsetes kudedes on esitatud  $2^{-\Delta CT}$  kujul koos standardveaga. Haistesibul, parietaalkoor, kuklakoor, dorsaalne striatum, ventraalne striatum, septum, väikeaju, ajusild, piklikaju, seljaaju (n=3) ja frontaalkoor, temporaalkoor, hipokampus, taalamus, hüpotaalamus (n=8).

### 2.3.4. *LSAMP* geeni ekspressioon inimese ajus

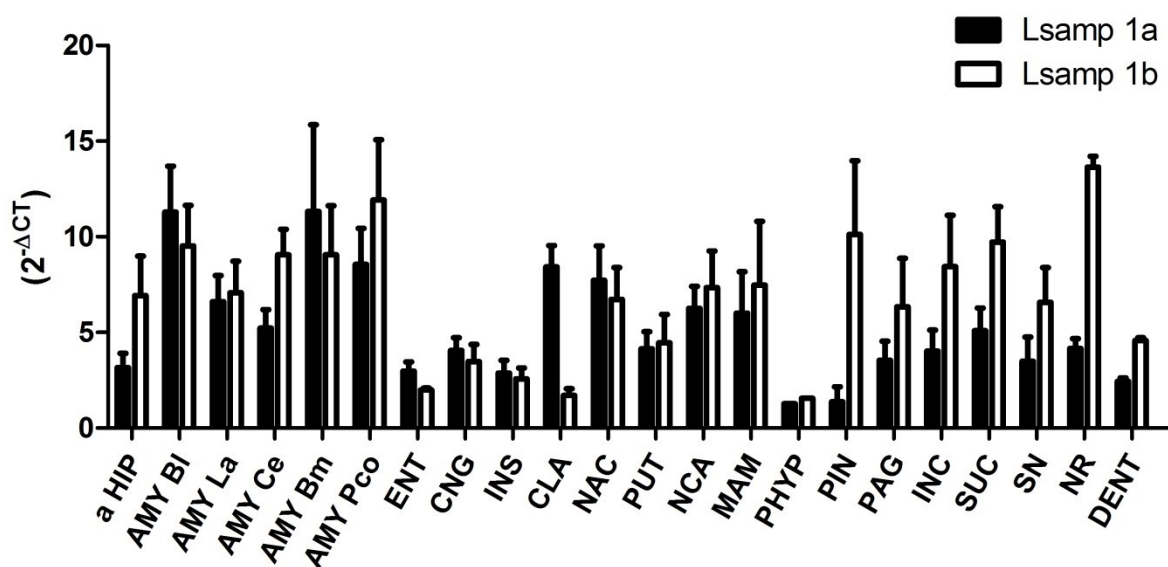
Käesolevas töös vaadeldi *LSAMP* geeni ekspressiooni inimese ajus. Eelnevalt on kirjeldatud *LSAMP* valgu ekspressiooni dorsomediaalses prefrontaalkoores, kuid käesolevas töö käsitleb esmakordselt süstemaatiliselt inimese neuraalsete kudede 1a ja 1b promootorite ekspressiooni.



**Joonis 13.** *LSAMP* promootorite ekspressioon inimese neuraalsetes kudedes. Ekspressioon on esitatud  $2^{-\Delta CT}$  kujul koos SEMiga. Dorsolateraalne prefrontaalkoor, hipokampus ( $n=7$ ); amügdala, septum, väikeaju ( $n=5$ ); orbitofrontaalkoor, temporaalkoor ( $n=4$ ); haistesibul, parietaalkoor, kuklakoor, taalamus ( $n=3$ ); anterioorne hüpotaalamus, piklikaju ( $n=2$ ); dorsaalne ja ventraalne ajusild ( $n=1$ ).

Inimese *post-mortem* indiviidide koeproovid analüüsiti reaalaaja-PCRi vahendusel. Ekspressiooniandmed on esitatud  $2^{-\Delta CT}$  kujul koos keskväertuse standardveaga joonisel 13 ja 14. Joonisel 13 on välja toodud inimese neuraalsed koed joonise 12 hiire neuraalsete kudede järjestuse alusel. Inimese ajus esineb kahe *LSAMP* promootori ekspressioon kõigis eraldatud

ajuosades. Ekspressioon esineb haistesibulas 8,1 1a ja 9,05 1b, orbitofrontaalses koos 2,72 1a ja 2,81 1b, dorsolateraalses prefrontaalkoos 3,12 1a ja 2,54 1b, parietaalkoos 1,89 1a ja 2,98 1b, temporaalkoos 3,01a ja 4,44 1b, amügdalas 6,31 1a ja 7,63 1b, kuklakoos 2,78 1a ja 4,03 1b, septumis 9,44 1a ja 25,02 1b, hipokampuses 5,68 1a ja 3,08 1b, taalamuses 3,03 1a ja 13,24 1b, anterioorses hüpotaalamuses 3,92 1a ja 5,64 1b, väikeajus 0,75 1a ja 7,42 1b, dorsaalses ajusillas 4,52 1a ja 18,71 1b, ventraalses ajusillas 5,01 1a ja 2,97 1b, piklikajus 3,85 1a ja 8,06 1b promootorilt.



**Joonis 14. LSAMP promootorite ekspressioon inimese neuraalsetes kudedes.** Joonisel on välja toodud inimese neuraalsed koed, mida on keeruline hiire aju prepreerimisel eristada. Ekspressioonid on esitatud  $2^{-\Delta CT}$  kujul koos SEMiga. *Nucleus accumbens* – NAC, mammilaarkehad – MAM, *substantia nigra* – SN (n=7); amügdala basolateraalne tuum – AMY BI, amügdala lateraalne tuum – AMY La, amügdala tsentraalne tuum – AMY Ce, amügdala basomediaalne tuum – AMY Bm, *nucleus caudatus* – NCA, tsingulaarkoor – CNG, *inferior colliculus* – INC, insula – INS, *superior colliculus* – SUC (n=6); anterioorne hipokampus – a HIP, amügdala posterioorne kortikaalne tuum – AMY Pco, *putamen* – PUT (n=4); käbikheha – PIN (n=3); *nucleus ruber* – NR, periaqueductal gray – PAG (n=2); entorinaalne koor – ENT, claustrum – CLA, posterioorses hüpotaalamus – PHYP, *dentate nucleus* – DENT (n=1).

Joonisel 13 on välja toodud ka teised inimajust eraldatud neuraalsete kudede ekspressioonitasemed. Neid kudesid on hiire aju prepreerimisel keeruline eristada hiire aju väiksuse tõttu. Järgnevad ekspressioonitasemed on esitatud  $2^{-\Delta CT}$  kujul koos keskvärtuse standardveaga. Ekspressioon esineb anterioorses hipokampuses 3,16 1a ja 6,92 1b, amügdala basolateraalses tuumas 11,29 1a ja 9,53 1b, amügdala lateraalses tuumas 6,61 1a ja 7,63 1b, amügdala tsentraalses tuumas 5,23 1a ja 9,06 1b, amügdala basomediaalse tuumas 11,33 1a ja

9,05 1b, amügdala posterioorses kortikaalses tuumas 8,56 1a 11,93 1b, entorinaalses koores 2,98 1a ja 1,99 1b, tsingulaarkoores 4,06 1a ja 3,47 1b, insulas 2,88 1a ja 2,57 1b, *claustrum*'is 8,43 1a ja 1,71 1b, *nucleus accumbens*'is 7,72 1a ja 6,72 1b, putamenis 4,14 1a ja 4,46 1b, *nucleus caudatus*'es 6,25 1a ja 7,34 1b, mammilaarkehades 6,01 1a ja 7,47 1b, posterioorses hüpotaalamuses 1,27 1a ja 1,56 1b, käbikehas 1,38 1a ja 10,13 1b, *periaqueductal gray*'is 3,55 1a ja 6,35 1b, *inferior colliculus*'es 4,03 1a ja 8,45 1b, *superior colliculus*'es 5,09 1a ja 9,72 1b, *substantia nigra*'s 3,49 1a ja 6,58 1b, *nucleus ruber*'is 4,15 1a ja 13,64 1b ja *dentate nucleus*'es 2,44 1a ja 4,58 1b promootorilt.

### 3. Arutelu

Käesolevas töös kirjeldati *LSAMP* geeni kahe alternatiivse promootori 1a ja 1b laialdast ekspresioonimustrit inimese ja hiire ajus ning hiire korral näidati madala ekspresioonitaseme esinemist ka mitmes mitteneuraalses koes.

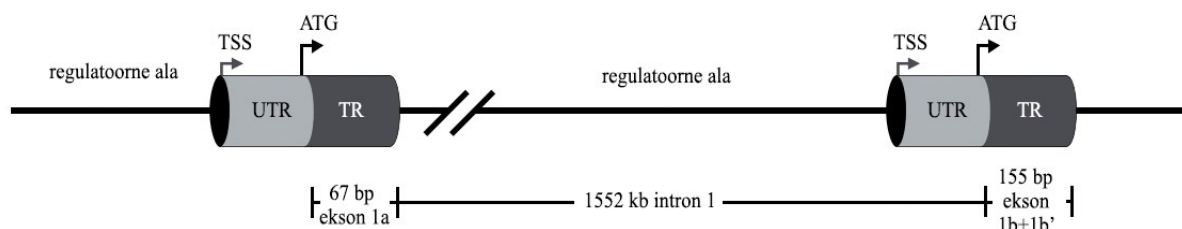
*LSAMP* geeni ekspresioon sõltub kahest alternatiivsest promootorist 1a ja 1b. Alternatiivne promootorite kasutus on välja kujunenud selroogsete arengus ja võimaldab paindlikku koe- ja/või arenguspetsiifilist geeniekspressiooni (Ayoubi ja Van De Ven, 1996). Erinevatel geenidel esineb ka rohkem kui kaks erinevat promootorit. Näiteks on ajus toodetaval närvikasvu faktoril (*brain-derived neurotrophic factor, BDNF*) 9 promootorit. *BDNF* geeni promootorid 1-8 asuvad mittekodeerivate esimeste eksonite ees ja promootor 9 esimese kodeeriva eksoni ees. Inimese *BDNF* geenil esineb alternatiivsete promootorite ja splaissimise tõttu 19 erinevat transkripti.<sup>9</sup> Samas kodeerivad erinevad *BDNF*i transkriptid enamasti sama valku või valku, millele on lisandunud kas N-terminaalne 8 aminohappeline signaalpeptiid või puudub sisemine 48 aminohappeline insertioon (Aid jt, 2007).

Inimese *LSAMP* geen kodeerib sarnaselt *BDNF*iga 23-aminohappelist signaalpeptiidi 1a ja 1b eksonis. Lisaks esineb alternatiivsel valguvormil ka 23-aminohappeline insertioon, mis võib muuta valgu tertsiaarstruktuuri. *LSAMP* valgul esineb kaks tugevalt glükosüleeritud isovormi, 64- ja 68-kDa, mis saadakse alternatiivse post-translatsioonilise modifikatsiooni käigus. Erinevate isovormide saamine sõltub ilmselt signaalpeptiidi olemasolust (Ayoubi ja Van De Ven, 1996; Pimenta ja Levitt, 2004). Näiteks võib alternatiivse post-translatsioonilise modifikatsiooni läbinud isovorm olla rakumembraani pinnal stabiilsem. Varem avaldatud kirjanduse alusel peaks *LSAMP* valk olema skisofreeniapatsientide dorsomediaalses prefrontaalkoores 20% üleekspressioonunud (Behan jt, 2009), kuid käesolevas magistris töös seda transkriptsiooni tasandil ei täheldatud. 20% kõrgemat *LSAMP* ekspressiooni skisofreeniapatsientide dorsomediaalses prefrontaalkoores võib seletada stabiilsema isovormi esinemine rakumembraanil. Tulevased uuringud peaks seletama post-translatsiooniliste modifikatsioonide mõju *LSAMP* valgu ekspresioonile rakumembraanil.

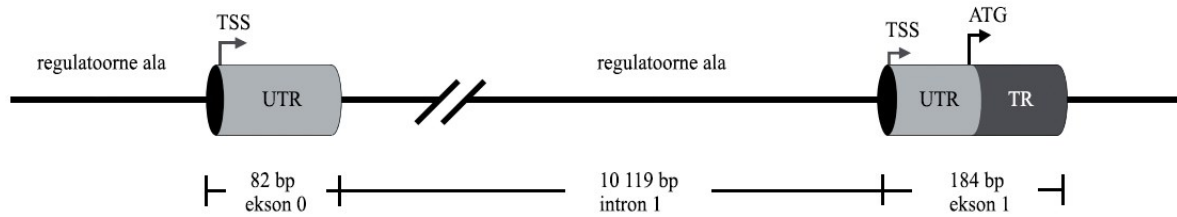
*BDNF* geeni ja ilmselt ka *LSAMP* geeni alternatiivsete promootorite ees esinevad erinevad regulatoorsed järjestused. Näiteks avalduvad *BDNF*i esimesed eksonid 1-3 ainult ajus ja esimesed eksonid 4-6 ka väljaspool neuraalseid kudesid (Aid jt, 2007). Käesoleva töö käigus detekteeriti *LSAMP* geeni promootorite 1a ja 1b suhteline ekspresioonitase inimese ja hiire

ajus. Hiirel vaadeldi *Lsamp* geeni ekspressiooni ka mitteneuraalsetes kudedes. Katsete tulemusena selgus, et *Lsamp* ekspressioon on kõrgeim silmas, südames, testistes ja neerus. Eelnevad uuringud ei ole erinevate *Lsamp* transkriptide ekspressiooni varem tuvastanud. Hiire organeid, neeru ja maksa, on varem analüüsitud *western bloti* meetodil, kuid LSAMP valgu ekspressiooni ei ole samuti varem tuvastatud (Innos jt, 2011). Tõenäoliselt on LSAMP valgu ekspressioon mitteneuraalsetes kudedes väga madal ja enamik meetodeid ei ole piisavalt tundlikud LSAMP valgu ekspressiooni tuvastamiseks. Inimese *LSAMP* geeni madalat ekspressioonitaset on seostatud neeruvähi progressiooniga (Chen jt, 2003). *Lsamp* 1b promootori kõrgem aktiivsus südames langeb kokku varasemate leidudega inimesel, mis on viidanud *LSAMP* osalusele aterosklerootiliste muutuste kujunemisele südame pärgarteris (Hansson 2005; Wang jt, 2008).

Inimese 1a ja 1b esimesed eksonid on vajalikud signaalpeptiidi kodeerimisel, kuid eelnev reguleeriv ala reguleerib ekspressiooni aktiivsust ilmselt arengu- ja koe- või rakuliini spetsiifiliselt. Enamuuritud adhesioonimolekuli, *L1CAM* näitel, võib mõlema promootori ees paikneda rida reguleerivaid motiive, mis seletavad vajaduse nii kahe promootori kui ka pika esimese introni järele (joonis 15). *L1CAM*i mõlemas promootoris esinevad mitmed reguleerivad motiivid, mis võimaldavad koe- ja arenguspetsiifilist regulatsiooni (joonis 16) (Pfeifer jt, 2010).



**Joonis 15. *LSAMP* geeni struktuur inimesel.** Joonisel on kodeerivad eksonid 1a ja 1b ning nende vahele jääv pikk esimene intron. Eksonite 1a ja 1b pikkus on toodud välja ilma UTR alata. Välja on toodud ka võimalikud reguleerivad alad *L1CAM* näitel.



**Joonis 16. L1CAM geeni struktuur inimesel.** Joonisel on mittekodeeriv ekson 0 ja esimene kodeeriv ekson 1 ning nende vahele jääv pikk esimene intron. Eksoni 1 (76 bp) pikkus on toodud koos UTR alaga (Pfeifer jt, 2010).

Mitme reguleeriva elemendi esinemine seletab *LSAMP* geeni kõikuva ekspresiooni inimese neuraalsetes kudedes. Inimese aju koorealades ja väikeajus esineb madal ekspresioon. Samas esineb amügdala tuumades, septumis, taalamuses ja dorsaalses ajusillas kõrge ekspresioon. Inimajus esinevad märkimisväärsed kõikumised eri ajuosade vahel. Dorsaalse ja ventraalse ajusilla vahel esineb 2,91 kordne vahe. Samas kõigub inimesel ka promootorite kasutus rohkem kui hiirel ja seda eriti 1b promootori korral. Inimese väikeajus on 1b promootor 9,83 korda aktiivsem kui 1a. Hiire väikeajus on 1b promootor 3,3 korda aktiivsem, kuigi üldiselt domineerib 1a promootori ekspresioon. Hiire ja inimese väikeajus on 1b promootori ekspresioonitrend sarnane, kuid on inimesel ligi 3 korda aktiivsem. Samas on inimese *claustrum*'is 1a promootor 4,91 korda aktiivsem kui 1b, kuigi üldiselt domineerib inimesel 1b promootori aktiivsus. Kõrgeim üldekspressioon (1a+1b) 34,46 esineb inimese septumis, kus 1b promootori aktiivsus on 2,65 korda suurem. Kõrge ekspresioon koondub limbilise süsteemiga seotud alade ümber ning on eriti kõrge amügdala tuumades ja limbilise süsteemi tsentris. *LSAMP* geeni erinev ekspresioonimuster viitab ka inimese ja hiire reguleeriva süsteemi eripäradele. Hiire ja inimese reguleeriva süsteemi erinevused on vähemalt osaliselt seotud 1a' eksoniga. Inimesel 1a' ekson puudub ja ei osale signaalpeptiidi kodeerimisel. Edasised uuringud peaksid selgitama tervikliku 1a ja 1b eksoni poolt kodeeritava signaalpeptiidi ja 1b' eksoni poolt kodeeritava osalise signaalpeptiidi tähtsuse. Edasised uuringud peaksid suhtuma ettevaatusega inimese *LSAMP* ja hiire *Lsamp* geeni võrdlemisse reguleerivate eripärade tõttu.

Käesoleva töö käigus vaadeldi ka kahte *LSAMP* geeni polümorfismi rs1676232 ja rs9874470, mis võivad muuta reguleerivate motiivide struktuuri genoomis. Polümorfism rs1676232 asub *LSAMP* geeni esimeses intronis ja polümorfism rs9874470 teises intronis. Polümorfismi rs1676232 on varem seostatud vasaku koronaar- ehk pärgarteri ateroskleroosiga (Wang jt, 2008). Polümorfismi rs1676232 korral on ateroskleroosi progresseerumise põhjuseks peetud

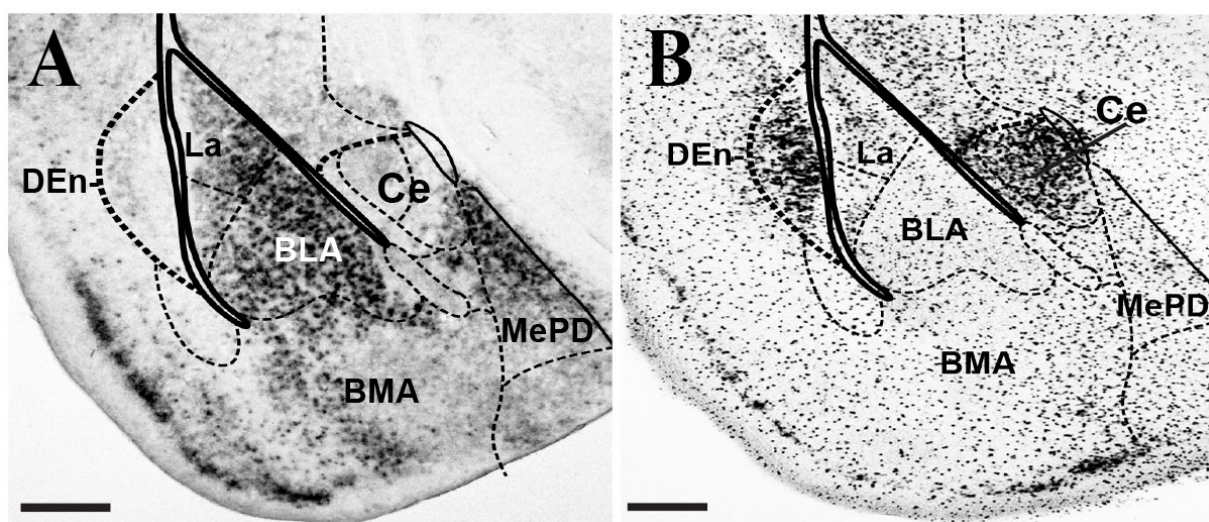
*LSAMP* ekspressiooni vähenemist pärgarteri silelihaste rakkudes. *LSAMP* ekspressiooni vähenemisel hakkavad silelihaste rakud vohama ja põhjustavad aterosklerootilise naastu teket, mis omakorda võib põhjustada isheemiat ning infarkti (Hansson 2005). Polümorfism rs9874470 seostub skisofreeniaga ja lõpuleviidud meeste enesetapuga (Must jt, 2008; Koido jt, 2014). Polümorfismi rs9874470 korral ei esinenud dorsofrontaalses kooses, *nucleus accumbens*'is, *substantia nigra*'s statistiliselt olulist mõju geeniekspressioonile. Polümorfismi rs1676232 korral on vaja jätkata optimeerimist. Ühtlasi on vaja statistiliselt usaldusväärsete tulemuste jaoks suurendada valimit. Suurema valimi korral on võimalik testida ka teiste polümorfismide mõju *LSAMP* ekspressioonile ja seda ka eri kudedes.

*LSAMP* geeni funktsioon avaldub koostöös teiste IgLON perekonna esindajatega. Näiteks indutseerib *Lsamp* ja *OBCAM* geeni üleekspressioon hiire hipokampuse neuronites dendriitidel sünapside teket. Samal ajal omab Kilon inhibeerivat efekti ja Neurotriminil efekt puudub. Diglonite Kilon-Neurotrimin, Kilon-OBCAM, LAMP-Neurotrimin ja Neurotrimin-OBCAM üleekspressiooni korral esineb jällegi inhibeeriv efekt. *Lsamp* geeni ning valgu võimalikku osalust hipokampuses toimuva sünaptoogeneesiga on näidatud nii *in vitro* kui ka *in vivo* uuringutes (Hashimoto jt, 2009; Qiu jt, 2010). *LSAMP* valgu üleekspressioon tõstab *in vitro* hipokampuse rakukultuuris sünaptoogeneesi taset. *Lsamp*-defitsiitse hiire korral on näidatud muutusi hipokampuse sünaptilises ülekandes ja plastilisuses (Hashimoto jt, 2009; Qiu jt, 2010). Käesolev töö kinnitab *LSAMP* geeni ekspressiooni nii inimese kui ka hiire hipokampuses.

Joonisel 17 on välja toodud *Lsamp* geeni kahe alternatiivse promootori heterogeenne ekspressioonimuster hiire aju amügdala piirkonnas (Philips jt, 2014). Promootor 1a (joonis 17, A) on aktiivne amügdala lateraalses tuumas (La), basolateraalses tuumas (BLA) ja mediaalses tuumas (MePD). Promootor 1b aktiivsus on märkimisväärne põhiliselt tsentraalses tuumas (Ce). Teistes amügdala tuumades on 1b signaal võrreldav baastasemega, mis on täheldatav üle kogu hiire aju. Käesolevas töös eraldati need tuumad inimese ajust ja teostati kvantitatiivne reaalkaja-PCRi analüüs. Kõrvutades hiire andmeid käesoleva töö inimese andmetega (joonis 14), selgub promootorite aktiivsuse proportsionaalne sarnasus. Ka inimese amügdala lateraalses ning mediaalses tuumas on 1a promootor aktiivsem ning 1b kõrgeim aktiivsus on tuvastatav tsentraalses tuumas.

Kokkuvõtvalt on 1a promootor hiires aktiivsem kui 1b promootor. Inimesel on aga vastupidi 1b promootor aktiivsem kui 1a promootor. Samas esineb nii inimesel kui ka hiirel mõlema

promootori aktiivne ekspressioon laialdaselt kogu ajus. Promootorite selektiivne inaktiivsus esineb hiire mitteneuraalsetes kudedes. Näiteks esineb südames märkimisväärne 1b promootori aktiivsus ja puudub täielikult 1a promootori aktiivsus. Hiire amügdala tuumade värvingute ja inimese ekspressiooniandmete võrdlemisest selgub, et üldine ekspressiooniprofiil on vähemalt amügdalas hiirel ja inimesel sarnane. *LSAMP* valgu struktuuri 99% sarnasus viitab konserveerunud funktsioonile, mis võiks avalduda ka geeniekspressiooni regulatsioonis. Inimesel esineb küll 1b promootori suurem aktiivsus septumis, taalamuses, dorsaalses ajusillas (joonis 13). Samas väikeaju umbes 3-kordne 1b promootori aktiivsus võrreldes hiirega vihjab, et inimese reguleeritud süsteemis on 1b promootori aktiivsus ülereguleeritud, mida võivad seletada mutatsioonilised sündmused inimese *LSAMP* geenis. Edasised uuringud peaksid keskenduma hiire ja inimese *LSAMP* geeni reguleerivate eripärade seletamisel. Oluline on seletada ka translatsiooni tasandil toimuvat regulatsiooni ja IgLON perekonna siseste homo- ja heterodimeeride moodustumist.



**Joonis 17. *Lsamp* 1a ja 1b promootorite ekspressioonitaseme erinevus hiire amügdala tuumades.** A – *Lsamp* 1a promootori *in situ* RNA hübridatsiooni värving. B – *Lsamp* 1b promootori spetsiifiline beeta-galaktositaasi värving. Mõlemad värgvingud väljendavad promootorite aktiivsust. BLA – amügdala basolateraalne tuum, BMA – amügdala basomedialne tuum, Ce – amügdala tsentraalne tuum, Den – dorsaalne endopiriformne tuum, La – amügdala lateraalne tuum, MePD amügdala mediaalne tuum (posterioorne dorsaalne osa). Scale bar 500  $\mu$ m (Philips jt, 2014).

## KOKKUVÕTE

Käesolev magistritöö kirjeldab *LSAMP* geeni kahe alternatiivse promootori 1a ja 1b ekspresioonimustrit inimese ja hiire ajus. Töö tulemusel tuvastati laialdane *LSAMP* geeni ekspresioon nii inimese kui ka hiire neuraalsetes kudedes kvantitatiivse reaalaaja-PCRi meetodil. Kõigis eraldatud neuraalsetes kudedes esines nii inimesel kui ka hiirel mõlema promootori aktiivsus. Ühtlasi selgus, et *LSAMP* ekspresioonimuster erineb inimese ja hiire ajus. Inimesel domineerib 1b promootori aktiivsus, kuid hiirel 1a promootori aktiivsus. Näib, et inimese 1b promootori aktiivsus on suurenenud mutatsiooniliste sündmuste tulemusel *LSAMP* geenis. Töö käigus kirjeldatakse ka statistiliselt oluliste seoste puudumist *LSAMP* ekspresiooni ja polümorfismi rs9874470 vahel ning dorsomediaalse prefrontaalkoore *LSAMP* geeni ekspresiooni ja skisofreenia vahel.

Lisaks neuraalsetele kudedele tuvastati hiirel *Lsamp* geeni ekspresioon mitteneuraalsetes kudedes. Neuraalsetest kudedest madalam ekspresioonitase esines silmas, südames, testistes ja neerus ning väga madal ekspresioonitase kopsus ja sooles. Huvitav on märkida, et inimese ja hiire neuraalsetes kudedes ei esine promootorite selektiivset inaktivatsiooni. Kuid hiire südames esineb ainult 1b promootori aktiivsus, mis viitab 1a promootori inaktivatsioonile. Inimese südames on *LSAMP* ekspresiooni alanemist seostatud ateroskleroosi progresseerumisega südame pärgarteris. Sel juhul võib 1a promootori aktiveerimine supresseerida ateroskleroosi progressiooni südame pärgarteris.

Käesolevas töös on välja toodud mitmeid hüpoteese *LSAMP* geeni regulatsiooni ja funktsiooni kohta. Arutletud on *LSAMP* võimaliku osaluse üle tuumorite supressioonis, aksonite juhtimises ja sünaptogeneesis. Edasised uuringud keskenduvad *in silico* regulatoorseste motiivide tuvastamisele ja transkriptsiooni regulatsiooni ning erinevate promootorite kasutuse seletamisele. Ühtlasi vajab lähemat uurimist 1b promootori ekspresioon inimese südames ja *LSAMP* geeni ekspresioon seos südame pärgarteri ateroskleroosilise progressiooniga.

Järgnevalt on välja toodud käesoleva magistritöö peamised tulemused:

1. *LSAMP* geen ekspresseerub laialdaselt nii inimese kui ka hiire ajus. Kõrgem *LSAMP* ekspresioon esineb subkortikaalses ja madalam ekspresioon kortikaalses alas.

2. Inimesel domineerib 1b promootori ja hiirel 1a promootori aktiivsus, mis on oletatavasti seotud mutatsiooniliste sündmustega inimese *LSAMP* geenis.
3. Käesolevas magistritöös ei tuvastatud *LSAMP* geeni 1a ja 1b promootorite ekspresiooni statistiliselt olulist erinevust skisofreeniapatsientide ja kontrollgrupi dorsomediaalses prefrontaalkoores.
4. Käesolevas magistritöös ei tuvastatud polümorfismi rs9874470 statistiliselt olulist mõju geeniekspresioonile dorsomediaalses prefrontaalkoores, *nucleus accumbens*'is ega *substantia nigra*'s.

## SUMMARY

### Expression of *LSAMP* gene in the human brain

Limbic system-associated membrane protein (LSAMP) is a neural cell adhesion molecule involved in neurogenesis and synaptogenesis. LSAMP protein is a member of the immunoglobulin superfamily and is characterized by three immunoglobulin domains and a glycosylphosphatidylinositol anchor. The amino acid sequence of LSAMP is highly conserved among species. There is, for example, a 99% sequence identity between human and rodent LSAMP, which indicates strong phylogenetic conservation of the protein structure and associated function. LSAMP protein is expressed on the neuronal dendrites and somata, where it interacts with other IgLON family members. Functional studies have shown that LSAMP can promote or inhibit neurite outgrowth depending on interactions with other members of the IgLON family by forming homo- or heterophilic IgLON dimers or Diglons on the surface of the cell membrane.

The human *LSAMP* gene is composed of 10 exons distributed over 2.2 megabases (Mb). Two first exons are separated by 1.55 Mb intron, which contributes to the unusually large size of the gene. Alternatively spliced *Lsmp* mRNAs are generated from distinct promoter regions 1a and 1b associated with the first two exons that encode distinct signal peptides although they translate to identical mature polypeptide. Additional diversity is created by the use of two small exons to include an insertion of 23 amino acids within the polypeptide C-terminal region of the mature protein. The alternative promoter usage may be associated with developmental and tissue-specific expression of the *LSAMP* gene.

The purpose of the present study was to characterize the activity of the two alternative promoters 1a and 1b of the *LSAMP* gene in the human and mouse brain. Based on previously published information showing that the levels of the LSAMP protein are approximately 20% increased in the *post mortem* frontal cortex both in patients with schizophrenia and bipolar disorder, we also tested the association between *LSAMP* expression levels in the dorsolateral prefrontal cortex and schizophrenia. Based on the previous studies showing that *LSAMP* single nucleotide polymorphisms are associated with schizophrenia, depression and male completed suicide, we also tested the association between *LSAMP* expression levels and polymorphisms rs1676232 and rs9874470, although in the case of rs1676232 future optimization is required.

The current work revealed a broad expression pattern of *LSAMP* 1a and 1b transcripts in the human and mouse brain. The quantitative real time-PCR expression was detected in all neural tissue samples and some mouse non-neural tissue samples. The study revealed also different activity patterns of *LSAMP* 1a and 1b promoters. 1b promoter activity dominates in human neural tissues and 1a in mouse neural tissues. It seems that higher activity of 1b promoter in human can be the result of mutational events in the human *LSAMP* gene. In the current study we also concluded that there is no statistically significant association between *LSAMP* expression levels and polymorphism rs9874470. We concluded also that there is no statistically significant association between *LSAMP* expression levels in the dorsolateral prefrontal cortex and schizophrenia.

The current work provided new insights about *LSAMP* gene expression. In the discussion part, we reviewed possible functions of *LSAMP* in tumor suppression, axon guidance and synaptogenesis. Future studies will concentrate on *in silico* analysis to predict transcriptional factor-binding sites on the *LSAMP* gene. Future studies should also elaborate the function of 1b promoter activity in the human heart and the associations between *LSAMP* and atherosclerosis.

The results of this thesis have been outlined below:

1. The current work revealed a broad expression pattern of *LSAMP* 1a and 1b transcripts in the human and mouse brain. Higher expression was detectable in the subcortical and lower expression in the cortical areas.
2. In human, 1b promoter is functionally more active than 1a. It seems that higher activity of 1b promoter in human can be the result of mutational events in the human *LSAMP* gene.
3. The current study revealed that there is no statistically significant association between *LSAMP* expression levels in the dorsolateral prefrontal cortex and schizophrenia.
4. The current study revealed that there is no statistically significant association between *LSAMP* expression levels in the dorsomedial prefrontal cortex, *nucleus accumbens*, *substantia nigra* and polymorphism rs9874470.

## **TÄNUSÕNAD**

Ma tänan oma juhendajat Mari-Anne Philipsit kannatlikuse ja Jürgen Innost abivalmiduse eest, oma kaasjuhendajat Tambet Tõnissood parandusettepanekute eest ja Kerstit huvitava diskussiooni eest. Ma tänan kõiki õppejõude, õpetajaid ja oma vanemaid nende panuse eest minu haridusse ja haritusse.

## **KASUTATUD KIRJANDUS**

Adolphs R, Tranel D, Damasio H, Damasio A (1994). Impaired recognition of emotion in facial expressions following bilateral damage to the human amygdala. *Nature*, 372: 669–672.

Aid T, Kazantseva A, Piirsoo M, Palm K, Timmusk T (2007). Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited. *J Neurosci Res*, 85(3): 525–535.

Akeel M, McNamee CJ, Youssef S, Moss D (2011). Diglons inhibit initiation of neurite outgrowth from forebrain neurons via an IgLON-containing receptor complex. *Brain Res* 16;1374: 27-35.

Amodio DM, Frith CD (2006). Meeting of minds: the medial frontal cortex and social cognition. *Nat Rev Neurosci*, 7: 268–277.

Anderson WS, Bechara A, Damasio H, Tranel D, Damasio RA (1999). Impairment of social and moral behavior related to early damage in human prefrontal cortex. *Nature Neuroscience* 2, 1032–1037.

Anticevic A, Cole MW, Repovs G, Murray JD, Brumbaugh MS, Winkler AM, Savic A, Krystal JH, Pearlson GD, Glahn DC (2013). Characterizing thalamo-cortical disturbances in schizophrenia and bipolar illness. *Cerebral Cortex*, doi:10.1093/cercor/bht165.

Anticevic A, Hu S, Zhang S, Savic A, Billingslea E, Wasyluk S, Repovs G, Cole MW, Bednarski S, Krystal JH, Bloch MH, Li CS, Pittenger C (2014). Global resting-state functional magnetic resonance imaging analysis identifies frontal cortex, striatal, and cerebellar dysconnectivity in obsessive-compulsive disorder. *Biol Psychiatry*, 15;75(8): 595-605.

Anticevic A, Repovs G, Krystal JH, Barch DM (2012). A broken filter: prefrontal functional connectivity abnormalities in schizophrenia during working memory interference. *Schizophr Res*, 141: 8–14.

Ayoubi TA, Van De Ven WJ (1996). Regulation of gene expression by alternative promoters. *FASEB J*, 10(4): 453-460.

Baron-Cohen S, Leslie AM, Frith U (1985). Does the autistic child have a "theory of mind"? *Cognition*, 21(1): 37-46.

Baron-Cohen S, Ring HA, Wheelwright S, Bullmore ET, Brammer MJ, Simmons A, Williams SC (1999). Social intelligence in the normal and autistic brain: an fMRI study. *Eur J Neurosci*, 11(6): 1891-1898.

Bast T (2007). Toward an integrative perspective on hippocampal function: from the rapid encoding of experience to adaptive behavior. *Rev Neurosci*, 18: 253–281.

Bast T, Wilson IA, Witter MP, Morris RG (2009). From rapid place learning to behavioral performance: a key role for the intermediate hippocampus. *PLoS Biol*, 7: e1000089.

Behan AT, Byrne C, Dunn MJ, Cagney G, Cotter DR (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.

Bickart K, Wright CI, Dautoff RJ, Dickerson BC, Feldman Barrett L (2010). Amygdala volume and social networks in humans. *Nature Neuroscience*, 14(2): 163–164.

Bickart KC, Wright CI, Dautoff RJ, Dickerson BC, Barrett LF (2011). Amygdala volume and social network size in humans. *Nat Neurosci*, 14: 163–164.

Blair KS, Vythilingam M, Crowe SL, McCaffrey DE, Ng P, Wu CC, Scaramozza M, Mondillo K, Pine DS, Charney DS, Blair RJ (2012). Cognitive control of attention is differentially affected in trauma-exposed individuals with and without post-traumatic stress disorder. *Psychol Med*, 43: 85–95.

Chen J, Lui WO, Vos MD, Clark GJ, Takahashi M, Schoumans J, Khoo SK, Petillo D, Lavery T, Sugimura J, Astuti D, Zhang C, Kagawa S, Maher ER, Larsson C, Alberts AS, Kanayama HO, Teh BT (2003). The t(1;3) breakpoint-spanning genes LSAMP and NORE1 are involved in clear cell renal cell carcinomas. *Cancer Cell*, 4: 405-413.

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.

- Côté PY, Levitt P, Parent A (1995). Distribution of limbic system-associated membrane protein immunoreactivity in primate basal ganglia. *Neuroscience*, 69(1): 71-81.
- Czekierdowski A, Czekierdowska S, Szymanski M, Wielgos M, Kaminski P, Kotarski J (2006). Opioid-binding protein/cell adhesion molecule-like (OPCML) gene and promoter methylation status in women with ovarian cancer. *Neuro Endocrinol Lett*, 27: 609–613.
- Dickerson SS, Kemeny ME (2004). Acute stressors and cortisol responses: a theoretical integration and synthesis of laboratory research. *Psychol Bull* 130(3): 355-391.
- Eagleson KL, Pimenta AF, Burns MM, Fairfull LD, Cornuet PK, Zhang L, Levitt P (2003). Distinct domains of the limbic system-associated membrane protein (LAMP) mediate discrete effects on neurite outgrowth. *Mol Cell Neurosci*, 24(3): 725-740.
- Edelman GM, Jones FS (1998). Gene regulation of cell adhesion: a key step in neural morphogenesis. *Brain Res Brain Res Rev*, 26(2-3): 337-352.
- Fowler SJ, Volkow DN, Kassed AC, Chang L (2007). Imaging the Addicted Human Brain. *Sci Pract Perspect*, 3(2): 4–16.
- Franklin K., Paxinos G. (1997). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego, Academic Press.
- Frith CD, Frith U (2007). Social cognition in humans. *Curr Biol*, 17: 724–732.
- 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.
- Gallagher HL, Frith CD (2003). Functional imaging of 'theory of mind'. *Trends Cogn Sci*, 7(2): 77-83.

- Gil DO, Zanazzi G, Struyk FA, Salzer LJ (1998). Neurotrimin mediates bifunctional effects on neurite outgrowth via homophilic and heterophilic interactions. *The Journal of Neuroscience*, 18(22): 9312–9325.
- Gil OD, Zhang L, Chen S, Ren Y, Pimenta A, Zanazzi G, Hillman D, Levitt P, Salzer JL (2002). Complementary expression and heterophilic interactions between IgLON family members Neurotrimin and LAMP. *J Neurobiol*, 51: 190-204.
- Gumbiner MB (1996). Cell Adhesion: The Molecular Basis of Tissue Architecture and Morphogenesis. *Cell*, 84: 345–357.
- Hansson GK (2005). Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*, 352: 1685–1695.
- Happé F, Brownell H, Winner E (1999). Acquired 'theory of mind' impairments following stroke. *Cognition*, 70(3): 211-240.
- Hashimoto T, Maekawa S, Miyata S. (2009). IgLON cell adhesion molecules regulate synaptogenesis in hippocampal neurons. *Cell Biochem Funct*, 27(7): 496-498.
- Heimer L, Hoesen VW (2006). The limbic lobe and its output channels: Implications for emotional functions and adaptive behavior. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 30(2): 126–147.
- Herman PJ, Ostrander MM, Mueller KN, Figueiredo H (2005). Limbic system mechanisms of stress regulation: Hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 29: 1201–1213.
- Horton HL, Levitt P (1988). A unique membrane protein is expressed on early developing limbic system axons and cortical targets. *J Neurosci*, 8(12): 4653–4661.
- Hynes RO (1999). Cell adhesion: old and new questions. *Trends Cell Biol*, 9(12): 33-37.
- Innos J, Philips MA, Leidmaa E, Heinla I, Raud S, Reemann P, Plaas M, Nurk K, Kurrikoff K, Matto V, Visnapuu T, Mardi P, Kõks S, Vasar E (2012). Lower anxiety and a decrease in agonistic behaviour in *Lsamp*-deficient mice. *Behav Brain Res* 217(1): 21-31.

Innos J, Philips MA, Leidmaa E, Heinla I, Raud S, Reemann P, Plaas M, Nurk K, Kurrikoff K, Matto V, Visnapuu T, Mardi P, Kõks S, Vasar E (2011). Lower anxiety and a decrease in agonistic behaviour in Lsamp-deficient mice. *Behav Brain Res*, 217(1): 21-31.

Kallunki P, Edelman GM, Jones FS (1997). Tissue-specific expression of the L1 cell adhesion molecule is modulated by the neural restrictive silencer element. *J Cell Biol*, 138(6): 1343-1354.

Kallunki P, Edelman GM, Jones FS (1998). The neural restrictive silencer element can act as both a repressor and enhancer of L1 cell adhesion molecule gene expression during postnatal development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95(6): 3233-3238.

Kallunki P, Jenkinson S, Edelman GM, Jones FS (1995). Silencer elements modulate the expression of the gene for the neuron-glia cell adhesion molecule, Ng-CAM. *J Biol Chem*, 270(36): 21291-21298.

Kanai R, Bahrami B, Roylance R, Rees G (2011). Online social network size is reflected in human brain structure. *Proc R Soc B*, 279: 1327–1334.

Kennedy DP, Adolphs R (2012). The social brain in psychiatric and neuro-logical disorders. *Trends Cogn Sci* 16: 559–572.

Kirschbaum C, Hellhammer DH (1994). Salivary cortisol in psychoneuroendocrine research: recent developments and applications. *Psychoneuroendocrinology*, 19(4): 313-333.

Kirschbaum C, Prüssner JC, Stone AA, Federenko I, Gaab J, Lintz D, Schommer N, Hellhammer DH (1995). Persistent high cortisol responses to repeated psychological stress in a subpopulation of healthy men. *Psychosom Med* 57(5): 468-74.

Klüver H, Bucy PC (1939). Preliminary analysis of functions of the temporal lobes in monkeys. *Arch Neurol Psychiatry*, 42: 979–1000.

Koido K, Janno S, Traks T, Parksepp M, Ljubajev Ü, Veiksaar P, Must A, Shlik J, Vasar V, Vasar E (2014). Associations between polymorphisms of LSAMP gene and schizophrenia. *Psychiatry Res*, 30;215(3): 797-798.

- 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.
- 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.
- Lee RS, Hermens DF, Porter MA, Redoblado-Hodge MA (2012). A meta-analysis of cognitive deficits in first-episode major depressive disorder. *J Affect Disord*, 140: 113–124.
- Lewis KP, Barton RA (2006). Amygdala size and hypothalamus size predict social play frequency in nonhuman primates: a comparative analysis using independent contrasts. *J Comp Psychol*, 120: 31–37.
- Lewis P, Rezaie R, Browne R, Roberts N, Dunbar RIM (2011). Ventromedial prefrontal volume predicts understanding of others and social network size. *NeuroImage*, 57: 1624–1629.
- Levitt P (1984). A monoclonal antibody to limbic system neurons. *Science*, 223: 299–301.
- Levitt P (1984). A monoclonal antibody to limbic system neurons. *Science*, 223: 299–301.
- Lindahl M, Theorell T, Lindblad F (2005). Test performance and self-esteem in relation to experienced stress in Swedish sixth and ninth graders—saliva cortisol levels and psychological reactions to demands. *Acta Paediatr*, 94(4): 489-495.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4): 402-408.
- 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.
- Mann F, Zhukareva V, Pimenta A, Levitt P, Bolz J (1998). Membrane associated molecules guide limbic and non-limbic thalamocortical projections. *J Neuroscience*, 18: 9409-9419.

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.

McNamee CJ, Youssef S, Moss D (2011). IgLONs form heterodimeric complexes on forebrain neurons. *Cell Biochem Funct*, 29(2):114-119.

Melloni M, Lopez V, Ibanez A (2014). Empathy and contextual social cognition. *Cogn Affect Behav Neurosci*, 14(1): 407-425.

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.

Must A, Tasa G, Lang A, Vasar E, Kõks S, Maron E, Väli M (2008). Association of limbic system-associated membrane protein (LSAMP) to male completed suicide. *Medical Genetics*, 9:34.

Naya Y, Suzuki WA (2011). Integrating what and when across the primate medial temporal lobe. *Science*, 333: 773–776.

Ntougkos E, Rush R, Scott D, Frankenberg T, Gabra H, Smyth JF, Sellar GC (2005). IgLON family in epithelial ovarian cancer: expression profiles and clinicopathologic correlates. *Clin Cancer Res*, 15;11(16): 5764-5768.

O'Donovan MC, Craddock N, Norton N, Williams H, Peirce T, Moskvina V, Nikolov I, Hamshere M, Carroll L, Georgieva L, Dwyer S, Holmans P, Marchini JL, Spencer CC, Howie B, Leung HT, Hartmann AM, Möller HJ, Morris DW, Shi Y, Feng G, Hoffmann P, Propping P, Vasilescu C, Maier W, Rietschel M, Zammit S, Schumacher J, Quinn EM, Schulze TG, Williams NM, Giegling I, Iwata N, Ikeda M, Darvasi A, Shifman S, He L, Duan J, Sanders AR, Levinson DF, Gejman PV, Cichon S, Nöthen MM, Gill M, Corvin A, Rujescu D, Kirov G, Owen MJ, Buccola NG, Mowry BJ, Freedman R, Amin F, Black DW, Silverman JM, Byerley WF, Cloninger CR; Molecular Genetics of Schizophrenia Collaboration (2008). Identification of loci associated with schizophrenia by genome-wide association and follow-up. *Nat Genet*, 40(9):1053-1055.

- Olson IR, McCoy D, Klobusicky E, Ross LA (2013). Social cognition and the anterior temporal lobes: a review and theoretical framework. *Soc Cogn Affect Neurosci*, 8: 123–133.
- 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.
- Panichareon B, Nakayama K, Thurakitwannakarn W, Iwamoto S, Sukhumsirichart W (2012). OPCML gene as a schizophrenia susceptibility locus in Thai population. *J Mol Neurosci*, 46: 373–377.
- Papez, JW (1937). A proposed mechanism of emotion. *Arch Neurol Psychiatry*, 38: 725–743.
- Paz R, Gelbard-Sagiv H, Mukamel R, Harel M, Malach R, Fried I (2010). A neural substrate in the human hippocampus for linking successive events. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107: 6046–6051.
- Patterson K, Nestor JP, Rogers TT (2007). Where do you know what you know? The representation of semantic knowledge in the human brain. *Nature Reviews Neuroscience* 8: 976-987.
- Pessoa L (2008). On the relationship between emotion and cognition. *Nat Rev Neurosci*, 9: 148–158.
- Pfeifer M, Schirmer U, Geismann C, Schäfer H, Sebens S, Altevogt P (2010). L1CAM expression in endometrial carcinomas is regulated by usage of two different promoter regions. *BMC Mol Biol*, 11:64. DOI: 10.1186/1471-2199-11-64.
- Phan KL, Fitzgerald DA, Nathan PJ, Tancer ME (2006). Association between amygdala hyperactivity to harsh faces and severity of social anxiety in generalized social phobia. *Biol Psychiatry*, 59: 424–429.
- Philips MA, Lilleväli K, Heinla I, Luuk H, Hundahl CA, Kongi K, Vanaveski T, Tekko T, Innos J, Vasar E (2014). Lsamp is implicated in the regulation of emotional and social behavior by use of alternative promoters in the brain. *Brain Struct Funct*. DOI: 10.1007/s00429-014-0732-x.

- 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 AF, Zhukareva V, Barbe MF, Reinoso BS, Grimley C, Henzel W, Fischer I, Levitt P (1995). The limbic system-associated membrane protein is an Ig superfamily member that mediates selective neuronal growth and axon targeting. *Neuron*, 15: 287–297.
- Plessen KJ, Bansal R, Zhu H, Whiteman R, Amat J, Quackenbush GA, Martin L, Durkin K, Blair C, Royal J, Hugdahl K, Peterson BS (2006). Hippocampus and amygdala morphology in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Arch Gen Psychiatry*, 63(7): 795-807.
- Poljac E, Bekkering H. 2012. A review of intentional and cognitive control in autism. *Front Psychol*, 3:436.
- Powell J, Lewis AP, Roberts N, García-Fiñana M, Dunbar MIR (2012). Orbital prefrontal cortex volume predicts social network size: an imaging study of individual differences in humans. *Proc Biol Sci*, 279(1736): 2157–2162.
- Qiu S, Champagne DL, Peters M, Catania EH, Weeber EJ, Levitt P, Pimenta AF (2010). Loss of limbic system-associated membrane protein leads to reduced hippocampal mineralocorticoid receptor expression, impaired synaptic plasticity, and spatial memory deficit. *Biol. Psychiatry*, 68(2):197-204.
- Raud S, Sütt S, Luuk H, Plaas M, Innos J, Kõks S, Vasar E (2009). Relation between increased anxiety and reduced expression of alpha1 and alpha2 subunits of GABA(A) receptors in *Wfs1*-deficient mice. *Neurosci Lett*, 460(2): 138-142.
- 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.
- Reed JE, Dunn JR, du Plessis DG, Shaw EJ, Reeves P, Gee AL, Warnke PC, Sellar GC, Moss DJ, Walker C. 2007. Expression of cellular adhesion molecule ‘OPCML’ is down-regulated in gliomas and other brain tumours. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 33: 77–85.

Rowe AD, Bullock PR, Polkey CE, Morris RG (2001). "Theory of mind" impairments and their relationship to executive functioning following frontal lobe excisions. *Brain*, 124: 600–616.

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.

Sellar GC, Watt KP, Rabiasz GJ, Stronach EA, Li L, Miller EP, Massie CE, Miller J, Contreras-Moreira B, Scott D, Brown I, Williams AR, Bates PA, Smyth JF, Gabra H (2003). OPCML at 11q25 is epigenetically inactivated and has tumor suppressor function in epithelial ovarian cancer. *Nat Genet*, 34: 337–343.

Silk JB (2007). Social components of fitness in primate groups. *Science*, 317: 1347–1351.

Singer T (2006). The neuronal basis and ontogeny of empathy and mind reading: review of literature and implications for future research. *Neurosci Biobehav Rev*, 30: 855–863.

Singer T, Seymour B, O'Doherty J, Kaube H, Dolan RJ, Frith CD (2004). Empathy for pain involves the affective but not sensory components of pain. *Science*, 303: 1157–1162.

Spaltmann F, Brümmendorf T (1996). CEPU-1, a novel immunoglobulin superfamily molecule, is expressed by developing cerebellar Purkinje cells. *The Journal of Neuroscience*, 16(5): 1770-1779.

Squire LR, Zola-Morgan M, Clark RE (2007). Recognition memory and the medial temporal lobe: a new perspective. *Nat Rev Neurosci*, 8(11): 872-883.

Squire LR. The hippocampus and spatial memory (1993). *Trends Neurosci*, 16(2): 56–57.

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.

Stuss DT, Gallup GG Jr, Alexander MP (2001). The frontal lobes are necessary for 'theory of mind'. *Brain*, 124: 279–286.

Sylvester CM, Corbetta M, Raichle ME, Rodebaugh TL, Schlaggar BL, Sheline YI, and others (2012). Functional network dysfunction in anxiety and anxiety disorders. *Trends Neurosci*, 35: 527–535

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.

Zhang J, Wang J, Wu Q, Kuang W, Huang X, He Y, Gong Q (2011). Disrupted brain connectivity networks in drug-naïve, first-episode major depressive disorder. *Biol Psychiatry*, 70: 334–342.

Zhukareva V, Levitt P (1995). The limbic system-associated membrane-protein (LAMP) selectively mediates interactions with specific central neuron populations. *Development*, 121: 1161-1172.

Zhukareva V, Levitt P (1995). The limbic system-associated membrane protein (LAMP) selectively mediates interactions with specific central neuron populations. *Development*, 121: 1161–1172.

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.

The neural restrictive silencer element can act as both a repressor and enhancer of L1 cell adhesion molecule gene expression during postnatal development (1998). *Proc Natl Acad Sci USA*, 95(6): 3233-3238.

Wang L, Hauser ER, Shah SH, Seo D, Sivashanmugam P, Exum ST, Gregory SG, Granger CB, Haines JL, Jones CJ, Crossman D, Haynes C, Kraus WE, Freedman NJ, Pericak-Vance MA, Goldschmidt-Clermont PJ, Vance JM (2008). Polymorphisms of the Tumor Suppressor Gene LSAMP are Associated with Left Main Coronary Artery Disease. *Annals of Human Genetics*, 72(4): 443–453.

Wang L, Hauser ER, Shah SH, Seo D, Sivashanmugam P, Exum ST, Gregory SG, Granger CB, Haines JL, Jones CJ, Crossman D, Haynes C, Kraus WE, Freedman NJ, Pericak-Vance MA, Goldschmidt-Clermont PJ, Vance JM (2008). Polymorphisms of the tumor suppressor gene LSAMP are associated with left main coronary artery disease. *Ann Hum Genet*, 72(4): 443-453.

Ye M, Parente F, Li X, Perryman MB, Zelante L, Wynshaw-Boris A, Chen J, Grossfeld P (2014). Gene-targeted deletion of OPCML and Neurotriminin mice does not yield congenital heart defects. *Am J Med Genet Part A*, 164: 966–974.

Yen CC, Chen WM, Chen TH, Chen WY, Chen PC, Chiou HJ, Hung GY, Wu HT, Wei CJ, Shiau CY, Wu YC, Chao TC, Tzeng CH, Chen PM, Lin CH, Chen YJ, Fletcher JA (2009). Identification of chromosomal aberrations associated with disease progression and a novel 3q13.31 deletion involving LSAMP gene in osteosarcoma. *International J of Oncology* 35: 775-788.

## KASUTATUD VEEBIAADRESSID

link 1:

[http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000142549;r=19:51815102-51833608;t=ENST00000270642](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000142549;r=19:51815102-51833608;t=ENST00000270642)

link 2: <http://phylomedb.org/?seqid=ENSG00000142549#>

link 3:

[http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/Compara\\_Tree?collapse=none;db=core;g=ENSG00000142549;r=19:51815102-51833608;t=ENST00000270642](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Compara_Tree?collapse=none;db=core;g=ENSG00000142549;r=19:51815102-51833608;t=ENST00000270642)

link 4:

[http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/Expression?db=core;g=ENSG00000185565;r=3:115521235-117716095](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Expression?db=core;g=ENSG00000185565;r=3:115521235-117716095)

link 5:

[http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000183715;r=11:130536341-135006516](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000183715;r=11:130536341-135006516)

link 6:

[http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000185565;r=3:114423806-118813525](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000185565;r=3:114423806-118813525)

link 7:

[http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000172260;r=1:71418226-73191815](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000172260;r=1:71418226-73191815)

link 8:

[http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000142549;r=19:51815102-51833608;t=ENST00000270642](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000142549;r=19:51815102-51833608;t=ENST00000270642)

link 9:

[http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/Splice?db=core;g=ENSG00000176697;r=11:27676440-27743605](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Splice?db=core;g=ENSG00000176697;r=11:27676440-27743605)

## LISAD

### LISA 1

**Tabel 3. IgLON adhesioonimolekulide valgujärjestuste protsentuaalne kattuvus.** IgLON1 ehk OBCAM (338 ah), IgLON2 ehk neurotrimin (344 ah), IgLON3 ehk LSAMP (338 ah; lühem isovorm), IgLON4 ehk kilon (354 ah) ja IgLON5 (336 ah) (08.04.2014 seisuga).

<b>I IgLON</b>	<b>Ensembli tuvastus</b>	<b>II IgLON</b>	<b>Ensembli tuvastus</b>	<b>sarnasus %</b>
IgLON 1	ENSP00000434750	IgLON 2	ENSP00000363923	71.98
IgLON 1	ENSP00000434750	IgLON 3	ENSP00000419000	55.94
IgLON 1	ENSP00000434750	IgLON 4	ENSP00000350364	48.97
IgLON 1	ENSP00000434750	IgLON 5	ENSP00000270642	51.98
IgLON 2	ENSP00000363923	IgLON 1	ENSP00000434750	73.31
IgLON 2	ENSP00000363923	IgLON 3	ENSP00000419000	55.81
IgLON 2	ENSP00000363923	IgLON 4	ENSP00000350364	50.48
IgLON 2	ENSP00000363923	IgLON 5	ENSP00000270642	51.58
IgLON 3	ENSP00000419000	IgLON 1	ENSP00000434750	55.94
IgLON 3	ENSP00000419000	IgLON 2	ENSP00000363923	53.58
IgLON 3	ENSP00000419000	IgLON 4	ENSP00000350364	56.80
IgLON 3	ENSP00000419000	IgLON 5	ENSP00000270642	50.52
IgLON 4	ENSP00000350364	IgLON 1	ENSP00000434750	50.78
IgLON 4	ENSP00000350364	IgLON 2	ENSP00000363923	50.79
IgLON 4	ENSP00000350364	IgLON 3	ENSP00000419000	57.61
IgLON 4	ENSP00000350364	IgLON 5	ENSP00000270642	47.06
IgLON 5	ENSP00000270642	IgLON 1	ENSP00000434750	54.26
IgLON 5	ENSP00000270642	IgLON 2	ENSP00000363923	53.38
IgLON 5	ENSP00000270642	IgLON 3	ENSP00000419000	51.72
IgLON 5	ENSP00000270642	IgLON 4	ENSP00000350364	45.67

## LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Taavi Vanaveski

(sünnikuupäev: 29.10.1988)

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

### **Lsmp geeni ekspressioon inimese ajus,**

mille juhendajad on PhD Mari-Anne Philips ja PhD 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 kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

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

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

Tartus, 20.05.2014