

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

Neuraalse raku adhesioonimolekuli NCAM1 osalus alkoholisõltuvuse tekkes

Bakalaureusetöö

12 EAP

Mirjam Kask

Juhendajad PhD Mari-Anne Philips

PhD Signe Värvi

TARTU 2023

INFOLEHT

Neuraalse raku adhesioonimolekuli NCAM1 osalus alkoholisõltuvuse tekkes

Neuraalne raku adhesioonimolekul 1 (NCAM1) on närvisüsteemis rakkudevaheliste interaktsioonide vahendaja, tagades närvisüsteemi normaalse arengu ja neuroplastilisuse. Ülegenoomsed assotsiatsiooniuuringud on tuvastanud seose NCAM1 ja alkoholi tarvitamise vahel. Alkoholisõltuvuse teket mõjutavad nii keskkond, sotsiaalsed tegurid kui ka geneetika. On täheldatud, et alkoholisõltlastel on raskuseid käitumise reguleerimisega, planeerimisega, õppimisega ja muude kognitiivsete funktsioonidega, mida kontrollib peaaug dorsolateraalne prefrontaalne korteks. Bakalaureusetöö eesmärgiks on kaardistada sõltuvus- ja riskikäitumisega oluliselt seostuvad polümorfismid *NCAM1* geeni lookuses ning uurida, kas ja kuidas NCAM1 ekspressiooni tasemed alkoholisõltlaste ja kontrollgrupi dorsolateraalsetes prefrontaalsetes korteksis erinevad.

Märksõnad: neuraalne raku adhesioonimolekul 1, alkoholisõltuvus, dorsolateraalne prefrontaalne korteks

CERCS kood: B640 Neuroloogia, neuropsühholoogia, neurofüsioloogia

The role of the neural cell adhesion molecule NCAM1 in developing alcohol use disorder

Neural cell adhesion molecule 1 (NCAM1) is a mediator of intercellular interactions, ensuring normal development and plasticity of the nervous system. Genome-wide association studies have shown a linkage between NCAM1 and alcohol use. The development of alcohol use disorder is influenced by environment, social factors and genetics. It has been shown that individuals with alcohol use disorder have difficulties in behavior regulation, planning, learning and other cognitive functions, which are controlled by the dorsolateral prefrontal cortex of the brain. The aim of this thesis is to map polymorphisms in the *NCAM1* gene associated with addiction and risk-taking behavior, and find whether and how the levels of NCAM1 expression differ between individuals with alcohol use disorder and control group in the dorsolateral prefrontal cortex.

Keywords: neural cell adhesion molecule 1, alcohol use disorder, dorsolateral prefrontal cortex

CERCS code: B640 Neurology, neuropsychology, neurophysiology

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID.....	5
SISSEJUHATUS.....	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1. Alkoholisõltuvus.....	7
1.2. Suurajukoor.....	7
1.2.1. Dorsolateraalne prefrontaalne korteks.....	8
1.3 Alkoholisõltuvus ja muutused ajus.....	9
1.4. Neuroplastilisus.....	10
1.5. Raku adhesioonimolekulid.....	11
1.5.1. NCAM1.....	11
1.5.1.1. Avastamine ja ekspressioon.....	11
1.5.1.2. Struktuur ja isovormid.....	12
1.5.1.3. Lisaeksonid.....	13
1.5.1.4. Lahustuvad vormid.....	13
1.5.1.5. Posttranslatsioonilised modifikatsioonid.....	14
1.5.1.6. Funktsioon.....	15
1.5.1.7. Homofiilne ja heterofiilne seondumine.....	16
1.5.1.8. NCAM1 ja sõltuvust tekitavad ained.....	16
2. EKSPERIMENTAALOSA.....	18
2.1. Töö eesmärgid.....	18
2.2. Materjal ja meetodika.....	18
2.2.1. Geenikaardi koostamine.....	18
2.2.2. Inimese ajukude.....	19
2.2.3. RNA eraldamine.....	19
2.2.4. cDNA süntees.....	20
2.2.5. qPCR.....	20
2.3. Tulemused.....	22
2.4. Arutelu.....	24
KOKKUVÕTE.....	28
RESÜMEE.....	29

KIRJANDUSE LOETELU.....	30
KASUTATUD VEEBIAADRESSID.....	46
LISAD.....	47
LISA 1.....	47
LIHTLITSENTS.....	49

KASUTATUD LÜHENDID

ADAM – disintegriini ja metalloproteinaas, *a disintegrin and metalloproteinase*

CAM – raku adhesioonimolekul, *cell adhesion molecule*

DLPFC – dorsolateraalne prefrontaalne korteks, *dorsolateral prefrontal cortex*

FGFR – fibroblasti kasvufaktori retseptor, *fibroblast growth factor receptor*

Fn3 – fibronektiin tüüp 3, *fibronectin type 3*

GDNF – gliia neurotroofne faktor, *glial cell line-derived neurotrophic factor*

GFR α – gliia neurotroofse faktori retseptor alfa, *glial cell line-derived neurotrophic factor alpha*

GPI – glükosüül-fosfatidüülinositol, *glycosylphosphatidylinositol*

GWAS – ülegenoomsed assotsiatsiooniuuringud, *genome-wide association studies*

IgSF CAMid – immunoglobuliini superperekonna adhesioonimolekulid, *immunoglobulin-like cell adhesion molecules*

MSD1 – *muscle-specific domain 1*

NCAM1 – neuraalne raku adhesioonimolekul 1, *neural adhesion molecule 1*

PFC – prefrontaalne korteks, *prefrontal cortex*

PSA – polüsiaalhape, *polysialic acid*

PSA-NCAM1 – polüsialüülitud neuraalne raku adhesioonimolekul 1, *polysialylated neural cell adhesion molecule 1*

SNP – ühenukleotiidne polümorfism, *single nucleotide polymorphism*

VASE – *variable alternatively spliced exon*

VTA – ventraalne tegmentaalne ala, *ventral tegmental area*

WHO - Maaailma Terviseorganisatsioon, *World Health Organisation*

SISSEJUHATUS

Alkoholisõltuvus on häire, mida iseloomustab pidev vajadus tarvitada alkoholi. Alkoholisõltlastel on täheldatud raskuseid teadliku käitumise reguleerimisega, planeerimisega, õppimisega ja muude kognitiivsete funktsioonidega, mida kontrollib peaaegu dorsolateraalne prefrontaalne korteks. Mitmed uuringud on täheldanud, et alkoholisõltlastel on aju teistsuguse struktuuri ja funktsionaalsusega kui mittedõltlastel.

Närvisüsteemi õige struktuuri ja funktsiooni tagamisel on olulised rakkude adhesioonimolekulid (CAMid). Neuraalne raku adhesioonimolekul 1 (NCAM1) on närvisüsteemis ekspresseeruv glükoproteiin, mis reguleerib rakkude migratsiooni, neuritide pikenemist ja sünaptilist plastilisust, vahendades rakkudevahelisi interaktsioone. NCAM1 kodeeritakse geenilt *NCAM1*. Alternatiivse splaissimise tulemusena esineb NCAM1 kolme peamise isovormina: NCAM1-120, NCAM1-140 ja NCAM1-180. Isovormid erinevad rakumembraanile kinnitumise ja tsütoplasmaatiliste domeenide poolest. NCAM1-l on roll närvisüsteemi korrektse arengu ja plastilisuse tagamisel. Geneetiliste assotsiatsiooniuuringutega on leitud seos NCAM1 ja alkoholi tarvitamise vahel.

Käesolev bakalaureusetöö keskendub neuralse NCAM1 osalusele alkoholi liigses tarbimises. Töö eesmärkideks oli kaardistada sõltuvus- ja riskikäitumisega oluliselt seostuvad ühenukleotiidsed polümorfismid *NCAM1* geeni lookuses ja uurida alkoholismi mõju NCAM1 geeniekspressioonile *post mortem* peaaegu dorsolateraalsetes prefrontaalsetes koores. Töös uuriti, kas ja kuidas NCAM1 mRNA ekspressioonitasemed alkoholisõltlaste ja kontrollgrupi dorsolateraalsetes prefrontaalsetes korteksis erinevad.

Bakalaureusetöö koostati Tartu Ülikooli meditsiiniteaduste valdkonna bio- ja siirdemeditsiini instituudi füsioloogia osakonnas.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Alkoholisõltuvus

2016. aastal põhjustas alkoholi tarbimine ülemaailmselt 3 miljonit surma, mis moodustas kõikidest surmadest 5,3% (Maailma Terviseorganisatsioon [WHO], 2018). Regulaarne ja liigne alkoholi tarbimine võib viia alkoholisõltuvuse tekkimiseni (Becker, 2008). Alkoholisõltuvus ehk alkoholism (*alcohol use disorder*) on häire, mida iseloomustab korduv või kestev alkoholi tarbimine. Alkoholisõltlastel esineb pidev vajadus ja iha tarvitada alkoholi, mis ei kao ka negatiivsete tagajärgede tekkimise korral, näiteks halvenenud füüsiline ja vaimne tervis (WHO, 2022). Kontroll alkoholi tarvitamise üle langeb ja joomine muutub võrreldes muude tegevustega aina olulisemaks (Miller, 2016; WHO, 2022). Alkoholisõltuvusele omased sümptomid on joomissund, suurenenud alkoholitaluvus, võõrutusnähud alkoholi tarvitamise vähendamisel või lõpetamisel ja joomise jätkamine võõrutusnähtude leevendamiseks. Diagnoos pannakse sümptomite ilmnemisel 12 kuu jooksul või pideval alkoholi tarbimisel vähemalt ühe kuu jooksul (WHO, 2022).

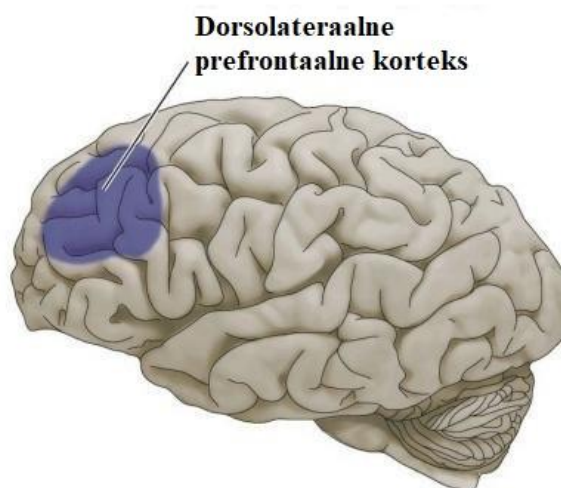
Alkoholi liigne tarbimine võib põhjustada erinevaid terviseprobleeme. Alkohol kahjustab närvisüsteemi (Oscar-Berman *et al.*, 1997), südame- ja veresoonkonda (Piano, 2017), seedeelundkonda (Bishehsari *et al.*, 2017), soodustab nakkushaiguste levikut (Parry *et al.*, 2009; Rehm *et al.*, 2010) ja vähi teket (Anderson *et al.*, 2023) ning on seotud erinevate psüühikahäiretega (Rehm, 2011). Lisaks tervisehäiretele põhjustab alkoholi tarbimine sotsiaalseid ja majanduslike probleeme (Rehm, 2011; WHO, 2018). Seega kujutab alkoholi tarbimine tõsist probleemi kogu ühiskonnale.

1.2. Suurajukoor

Suurajukoor jaguneb neljaks: otsmiku-, oimu-, kiiru- ja kuklasagaraks (Javed *et al.*, 2022). Suurajukoore otsmikusagaras paikneb eesajukoor ehk prefrontaalne korteks (PFC) (Morecraft ja Yeterian, 2002). PFC on ühenduses teiste suurajukoore, sealhulgas motoorsete ja sensorsete osadega (D'Esposito *et al.*, 2000), ning subkortikaalsete osadega (Barbas ja Zikopoulos, 2010). PFC jagatakse lateraalseks ja ventromediaalseks (Hathaway ja Newton, 2022). PFCil on oluline roll teadlikes ehk kognitiivsetes protsessides: käitumise reguleerimisel ja kontrollimisel mingi eesmärgi saavutamiseks, otsuste tegemisel, tähelepanus ja töömälu (Miller ja Cohen, 2001; Friedman ja Robbins, 2022).

1.2.1. Dorsolateraalne prefrontaalne korteks

Dorsolateraalne prefrontaalne korteks (DLPFC, *dorsolateral prefrontal cortex*) on prefrontaalse korteksi üks alamregioonidest, mis asub inimesel keskmises frontaalkäärus, Brodmanni aladel 9 ja 46 (Brodman, 1909; Hoshi, 2006). DLPFC on seotud täidesaatvate funktsioonidega: käitumise kontrollimise (Friedman ja Robbins, 2022), otsuste langetamise (Krawczyk, 2002), probleemide lahendamise (Ruocco *et al.*, 2014) ja töömäluga (Courtney *et al.*, 1998).



Joonis 1. Dorsolateraalne prefrontaalne korteks inimese peaaigus (Nelson, 2016, modifitseeritud)

DLPFC reguleerib käitumist teatud eesmärgi saavutamiseks, juhtides otsuste tegemist selle põhjal, millised võivad olla võimalikud tagajärjed, ning olemasoleva informatsiooni põhjal valib valikute seast kõige asjakohasema (Yamagata *et al.*, 2012; Hutcherson ja Tusche, 2022). Eesmärgi täitmiseks reguleerib DLPFC kognitiivseid protsesse, näiteks tähelepanu koondamist, planeerimist, impulsiivsuse kontrolli all hoidmist ja töömälu (Jones ja Graff-Radford, 2021; Friedman ja Miyake, 2017). Sõltuvuses oleval inimesel on häiritud võime oma käitumist kontrollida ja olla paindlik oma otsustes (Everitt *et al.*, 2008). Käitumise muutumise põhjuseks võib olla kahjustunud DLPFC.

Üks DLPFCi olulistest funktsioonidest on seotud töömäluga, mis tegeleb informatsiooni töötlemise ja talletamisega lühiajaliselt (Miller *et al.*, 1960; Goldman-Rakic, 1995; Curtis ja D'Esposito, 2003). DLPFC töötleb akuutselt olulist informatsiooni, mida saab kasutada käitumise reguleerimises, õppimises, mõistmises ja muudes kognitiivsetes protsessides (Baddeley, 2003; Cowan, 2014). On täheldatud, et füüsiline kahjustus DLPFCs põhjustab puudujääke verbaalse ja ruumilise informatsiooni töötlemisel (Barbey *et al.*, 2013).

Arvatakse, et DLPFC panustab pikaajalise mälu tekkesse, modifitseerides tõenäoliselt oleva teabe vahelisi seoseid (Blumenfeld ja Ranganath, 2006).

1.3 Alkoholisõltuvus ja muutused ajus

Alkoholisõltuvus kujuneb keskkonna, sotsiaalsete ja geneetiliste tegurite koosmõjul (Edenber ja Foroud, 2013). Alkoholisõltlastel toimuvad ajus mitmed neurobioloogilised muutused (Sullivan ja Pfefferbaum, 2005; Heilig ja Koob, 2007). Alkoholi tarbimine võib põhjustada muutusi geeniekspressiooni tasemetes, mis võib viia alkoholisõltuvuse tekkimiseni (Ponomarev *et al.*, 2012). Esialgu on alkoholi tarvitamine eesmärgipärane käitumine, mida kontrollivad ajus kognitiivsete funktsioonide eest vastutavad piirkonnad, sealhulgas prefrontaalne korteks. Korduval alkoholi tarvitamisel muutub käitumine harjumuspäraseks ja automaatseks ning käitumist hakkavad aina rohkem mõjutama tasuga seotud stiimuleid töötlevad alad ajus (Berridge, 2012; Fein ja Cardenas, 2015). Nõrgeneb käitumise kontrolli eest vastutavate ajuosade mõju (Fein ja Cardenas, 2015). Sellised muutused võivad juhtida inimese sõltuvuskäitumiseni (Volkow *et al.*, 2013).

Korduv alkoholi tarbimine võib põhjustada häireid dopaminergilistes juhteteedes (Di Chiara, 1997), näiteks on alkoholisõltuvust seostatud muutustega mesokortikolimbilises süsteemis, mis reguleerib käitumist ning töötleb rahuldust ja mõnutunnet tekitavaid stiimuleid. Mesokortikolimbiline süsteem koosneb kahest dopaminergilisest rajast ajus, mesolimbilisest ja mesokortikaalsest, mis saavad alguse ventraalsest tegmentaalsest alast (VTA). Mesolimbilises rajas transporditakse dopamiini VTAst ventraalsesse juttkehasse, mis hõlmab naalduvat tuuma ja olfaktorset kõbrukest. Mesokortikaalses rajas transporditakse dopamiini VTAst prefrontaalsesse korteksisse (Reynolds ja Flores, 2021). On näidatud, et alkoholisõltlastel on dopamiini tase madalam ventraalses juttkehas (Buchholz *et al.*, 2004; Volkow *et al.*, 2007) ja prefrontaalses korteksis (Narendran *et al.*, 2014).

Mesolimbiline rada tegeleb tasuga seotud informatsiooni töötlemisega: ihalduse, mõnutunde ja motivatsiooniga (Alcaro *et al.*, 2007; Soares-Cunha *et al.*, 2016). On täheldatud, et ventraalses juttkehas on dopamiini retseptori D₂ tase alkoholisõltlastel madalam kui tervetel inimestel (Heinz *et al.*, 2004; Salinas *et al.*, 2021). Madalamat retseptori taset seostatakse vajadusega alkoholi tarvitada, mis võib põhjustada alkoholi tarvitamise poole tagasipöördumist ehk tagasilangust (Heinz *et al.*, 2004).

Mesokortikaalne rada vastutab ajus täidesaatvate funktsioonide üle. Prefrontaalne korteks reguleerib eesmärgipärasest ja teadlikku käitumist (Fein ja Cardenas, 2015). Häired prefrontaalses korteksis võivad põhjustada raskusi kognitiivsete ülesannete lahendamisel (Li *et al.*, 2009; Beylergil *et al.*, 2017). On täheldatud, et tasuga seotud informatsiooni töötlevad aju piirkonnad on alkoholisõltlastel puudulikus ühenduses prefrontaalse korteksigi; parem ühendus aitaks kontrollida käitumist ja takistaks tervisele kahjulikke tegevusi, näiteks liigset alkoholi tarbimist (Fein ja Cardenas, 2015). Häiritud ühendus DLPFCi ja ventraalse juttkeha vahel võib suurendada vajadust alkoholi järele ning otsuste tegemisel ei suudeta hästi käitumise tagajärjesid arvesse võtta, mis on alkoholisõltlastele tüüpiline käitumishäire (Park *et al.*, 2010).

Alkoholisõltlaste ajus on kirjeldatud mitmeid struktuurseid muutuseid (Rosenbloom *et al.*, 1995). Alkoholisõltlastel on näidatud muutuseid hallaine (Fein *et al.*, 2002) ja valgeaine ruumalal (Kril *et al.*, 1997) ning väiksemat neuronite ja gliiarakkude tihedust prefrontaalses korteksis (Miguel-Hidalgo *et al.*, 2002; Miguel-Hidalgo *et al.*, 2006). Uuringud on seostanud alkoholisõltuvust anomaaliatega DLPFCs. On täheldatud, et alkoholisõltlastel on väiksema ruumalaga (Makris *et al.*, 2008) või madalama aktiivsusega DLPFC (Li *et al.*, 2009; Sorkhou *et al.*, 2022). Vähenenud DLPFC talitus alkoholisõltlaste ajus korreleerub häiretega enesekontrollis ja õppimisvõimes kognitiivsete ülesannete lahendamisel (Sorkhou *et al.*, 2022).

1.4. Neuroplastilisus

Närvisüsteemile on iseloomulik võime muutuvale keskkonnale reageerida ja kohaneda. Neuroplastilisuseks nimetatakse närvisüsteemi struktuurseid ümberkorraldusi ja muutusi funktsioonis, mis toimuvad vastusena sise- või väliskeskkonnast tulevatele signaalidele. (Zilles, 1992). Närvisüsteem on plastiline terve elu jooksul, aga kõige rohkem närvisüsteemi embrüonaalse arengu ajajärgul, lapse- ja noorukieas. Vananedes hakkab plastilisus järk-järgult vähenema, kuid sellele vaatamata täiskasvanutel see fenomen ei kao (Holtmaat ja Svoboda, 2009). Neuronvõrgustik muutub keskkonnastiimulite tõttu, näiteks uued kogemused, vigastused, stress või haigused (Kuhn *et al.*, 2001; Kleim ja Jones, 2008; Kolb *et al.*, 2013). Sünaptiline plastilisus ehk sünapside teke ja kadumine, sünapsi tugevuse muutus ja neurogenees on protsessid, tänu millele on närvisüsteem plastiline (Fu ja Zuo, 2011; Bonfanti ja Seki, 2021).

1.5. Raku adhesioonimolekulid

Närvisüsteemi funktsioneerimiseks ja korrektse struktuuri tagamiseks on hädavajalik rakkudevaheline kommunikatsioon ja adhesioon. Raku adhesioonimolekulid (CAMid) on raku pinnal olevad glükoproteiinid, mis vahendavad keemilisi ja mehaanilisi signaale rakk-rakk ning rakk-maatriks vahelistes ühendustes. (Kiryushko *et al.*, 2007)

CAMid jagunevad nelja eri klassi: integriinid, kadheriinid, selektiinid ja immunoglobuliini superperekonna adhesioonimolekulid (IgSF CAMid) (Shapiro *et al.*, 2007; Harlapur ja Shimbo, 2013). IgSF CAM on suurim CAMide alagrupp, kuhu kuuluvate valkude ühine tunnus on vähemalt ühe immunoglobuliini domeeni olemasolu (Wai Wong *et al.*, 2012; Yap *et al.*, 2014). IgSF CAMide vahendatud kaltsiumsõltumatu seondumine toimub kas homofiilselt, kui seondumine toimub sama geeni pealt ekspresseeritud molekulide vahel, või heterofiilselt, kui seondumine toimub erinevate molekulide vahel (Kiryushko *et al.*, 2007). IgSF CAMid osalevad närvisüsteemi signaaliradades, reguleerides närvisüsteemi arengut ja plastilisust (Leshchyn'ska ja Sytnyk, 2016).

1.5.1. NCAM1

1.5.1.1. Avastamine ja ekspressioon

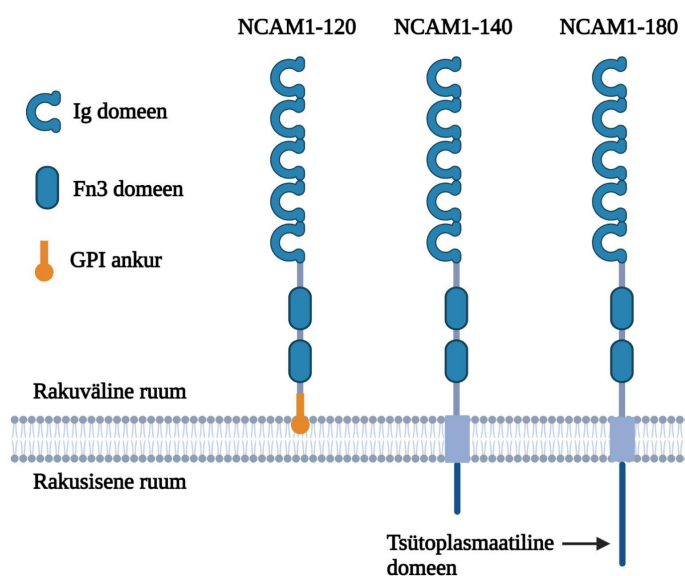
Neuraalne raku adhesioonimolekul 1 (NCAM1) on IgSF CAMide hulka kuuluv glükoproteiin (Halaby ja Mornon, 1998). Esimesena iseloomustasid NCAM1-te roti ajus Jørgensen ja Bock 1974. aastal sünaptilise membraani glükoproteiinina D2 (Jørgensen ja Bock, 1974). Samuti eraldasid NCAM1 molekuli kana embrüo reetina ja ajurakkudest 1977. aastal Thiery ja Brackenbury, kes kirjeldasid seda kui raku adhesioonimolekuli (Thiery *et al.*, 1977).

NCAM1-te ekspresseeritakse peamiselt kesk- ja perifeerses närvisüsteemis (Varoqueaux ja Brose, 2002), aga ka teistes kudedes, näiteks südames (Burroughs *et al.*, 1991), lihastes (Moore *et al.*, 1987; Nederveen *et al.*, 2019) ja endokriinsüsteemis (Langley *et al.*, 1989; Gaidar *et al.*, 1998). NCAM1-l on oluline roll närvisüsteemi arenguprotsessides ja plastilisuse tagamises, reguleerides rakkude diferentseerumise mustrit, neuriitide kasvamist ja sünaptilist plastilisust (Muller *et al.*, 1996; Maness *et al.*, 2007; Hansen *et al.*, 2008).

1.5.1.2. Struktuur ja isovormid

NCAM1-te kodeeritakse geenilt NCAM1, mis asub hiirel 9. kromosoomis (D'Eustachio *et al.*, 1985) ja inimesel 11. kromosoomis (Nguyen *et al.*, 1986). NCAM1 transkript koosneb 26 eksonist (Colwell *et al.*, 1992). *NCAM1* geeni esmase transkripti pealt toimub alternatiivne splaissimine, mille tulemusena tekib mitmeid isoforme. Roti südamest on leitud 27 erinevat NCAM1 isovormi, mis erinevad eksonite 7-8 ja 12-13 ühendustes ning 3' otsas toimunud alternatiivse splaissimise poolest (Reyes *et al.*, 1991).

Eristatakse kolme peamist isovormi NCAM1-120, NCAM1-140 ja NCAM1-180, mille ligikaudsed molekulmassid on vastavalt 120, 140 ja 180 kilodaltonit (kDa) (Edelman ja Chuong, 1982; Ditlevsen *et al.*, 2008). NCAM1 kõigi kolme isovormi rakuväline osa koosneb viiest immunoglobuliini-sarnasest (Ig) domeenist ja kahest fibronektiin tüüp 3 (Fn3) domeenist (Cunningham *et al.*, 1987; Carafoli *et al.*, 2008). Ig domeene kodeerivad eksonid 1-10 ja Fn3 domeene eksonid 11-14 (Hinsby *et al.*, 2004). Kolm isovormi erinevad transmembraansete ja tsütoplasmaatiliste domeenide poolest. NCAM1-120 sisaldab lisaks eksonit 15. Isovormil puudub tsütoplasmaatiline domeen ja kinnitub rakumembraanile glükosüül-fosfatidüülinositol (GPI) ankruga (Lyons *et al.*, 1992; Tan *et al.*, 2017). NCAM1-140 ja NCAM1-180 on transmembraansed molekulid, mis erinevad tsütoplasmaatilise domeeni pikkuse poolest. Alternatiivse splaissimise tulemusena on NCAM1-180 isovormi tsütoplasmaatiline domeen pikem kui isovormil NCAM1-140. NCAM1-180 transmembraanne ja tsütoplasmaatiline osa kodeeritakse eksonitelt 16-19, NCAM1-140 eksonitelt 16, 17 ja 19, puudub 18. ekson (Hinsby *et al.*, 2004).



Joonis 2. NCAM1 kolme peamise isovormi struktuur (Joonis tehtud Fujimoto *et al.* (2001) joonise alusel programmiga BioRender)

Närvisüsteemis ekspresseerivad NCAM1-120 isovormi peamiselt gliiarakud, NCAM1-140 ekspresseeritakse nii neuronites kui ka gliiarakkudes ja NCAM1-180 ekspresseeritakse peamiselt neuronites (Korshunova ja Mosevitsky, 2010). NCAM1-te sünteesitakse peamiselt embrüonaalses arengus ja pärast sündi. Vananedes hakkab biosünteesi tase järk-järgult langema (Kolkova, 2010).

1.5.1.3. Lisaeksonid

Alternatiivse splaissimise tulemusena võivad NCAM1 rakuvälist ala kodeerivas osas lisaks asuda lühikesed regioonid. 30 aluspaari pikkune lisaekson VASE (*variable alternatively spliced exon*) lisatakse alternatiivse splaissingu käigus NCAM1 Ig4 domeeni kodeeriva ala seitsmenda ja kaheksanda eksoni ühenduse vahele (Small ja Akeson, 1990). VASE vähendab neuriitide kasvamist ja sellest tulenevalt aju plastilisust (Lahrtz *et al.*, 1997). Esimese ja teise Fn3 domeenide 12. ja 13. eksoni vahel võib asuda MSD1 (*muscle-specific domain 1*) kompleks, mis koosneb kolmest eraldi eksonist MSD1a, MSDb ja MSDc, vastavalt 15, 48 ja 42 aminohapet pikad. MSD1-te ekspresseerivad diferentseerunud müotuubulid (Dickson *et al.*, 1987; Thompson *et al.*, 1989). AAG on kolme nukleotiidi pikkune ekson, mis asub sarnaselt MSD1 kompleksile esimese ja teise Fn3 domeeni ühenduses (Santoni *et al.*, 1989; Barthels *et al.*, 1992).

1.5.1.4. Lahustuvad vormid

Lisaks membraanseostelistele vormidele leidub NCAM1-te erinevate lahustuvate vormidena. Inimesel on leitud lahustuvaid NCAM1 vorme ajuvedelikust, seerumist ja looteveest, närilistel ajukoest, ajuvedelikust, vereplasmast, ning kanadel võrkkesta rakkudest (Secher, 2010; Mao *et al.*, 2012). Kogu NCAM1 kogusest moodustab lahustuv NCAM1 1-2% (Dalseg *et al.*, 1989).

Sekreteeritavad NCAM1 vormid saavad tekkida membraani küljes oleva NCAM1 ensümaatilisel lõikamisel. Transmembraanseid isovorme NCAM1-140 ja NCAM1-180 lõikavad disintegriini ja metalloproteinaasid (ADAM) (Kalus *et al.*, 2006; Hinkle *et al.*, 2006). NCAM1-120 isovormi GPI ankrut lõikab fosfatidüülinositol-spetsiifiline fosfolipaas C (He *et al.*, 1986). Lisaks on leitud täies pikkuses NCAM1 lahustuva vormina, kui see on

rakumembraanist eraldunud väiksemate fragmentide küljes, olles sekreteeritud rakuvälisesse ruumi (Olsen *et al.*, 1993). Samuti tekib lahustuv NCAM1 vorm alternatiivse splaissimise käigus, kui eksonite 12 ja 13 vahele lisatakse SEC ekson, mille tõttu tekib stoppkoodon ja tekib 115 kDa pikkune sekreteeritav NCAM1 (Secher, 2010).

On näidatud, et lahustuv NCAM1 edendab neuriitide kasvamist (Secher, 2010). Kui takistati NCAM1 ensümaatilist lõikamist kas metalloproteaasi inhibiitoriga või metalloproteaasi ADAM17 inhibeerimisega hippokampuse neuronites, siis neuriitide kasvamine vähenes (Hübschmann *et al.*, 2005; Hinkle *et al.*, 2006). Arvatakse, et lahustuv NCAM1 vormis on homofiilne seondumine takistatud, mille tulemusena rakkudevaheline adhesioon väheneb (Secher, 2010).

1.5.1.5. Posttranslatsioonilised modifikatsioonid

NCAM1 glükosüülimine vahendab NCAM1 rakuväliseid interaktsioone. NCAM1-l asub kuus võimalikku N-glükosüülimissaiti, üks Ig3 domeenis, kaks Ig4 ja kolm Ig5 domeenis (Alback *et al.*, 2004). Samuti on näidatud, et skeletilihaste müotubulites toimub NCAM1 O-glükosüülimine MSD1 regioonis, kus on palju seriini ja treoniini (Dickson *et al.*, 1987; Walsh *et al.*, 1989).

NCAM1 esineb posttranslatsioonilise modifikatsiooni tulemusena unikaalse polüsialüülitud vormina. NCAM1 Ig5 domeeni kahte võimalikku glükosüülimissaiti lisatakse α -2,8-polüsiaalhappe (PSA) (Finne *et al.*, 1983; Liedtke *et al.*, 2001; Von Der Ohe *et al.*, 2002). Polüsialüülitud NCAM1-te (PSA-NCAM1) ekspresseeritakse närvisüsteemis varajasest embrüonaalsest arengust täiskasvanueani (Quartu *et al.*, 2008). PSA on lineaarne negatiivselt laetud homopolümeer, mis koosneb α -2,8-sidemetega seotud siaalhappejääkidest (Finne *et al.*, 1983). Ülekannet katalüüsivad kaks Golgi kompleksi küljes olevat polüsialüültransferaasi ST8sia2 ja ST8sia4 (Seidenfaden *et al.*, 2000). ST8sia2 viib polüsialüülimist läbi peamiselt embrüonaalsel ja sünnijärgsel arenguetapil ning ST8sia4 täiskasvanud ajus (Hildebrandt *et al.*, 1998). Polüsülieerimine nõrgestab NCAM1 adhesioonijõudu rakkude vahel (Bonfanti, 2006; Bonfanti ja Seki, 2021).

1.5.1.6. Funktsioon

NCAM1 on oluline nii närvisüsteemi arengu käigus kui ka täiskasvanud aju neuroplastilisuse tagamisel. NCAM1 reguleerib rakkude omavahelist adhesiooni ja vahendab signaale, mille kaudu mõjutab neuronite proliferatsiooni, migratsiooni, diferentseerumist, neuriitide kasvamist ja ümberkujundust ning sünapsi toimimist (Kiryushko *et al.*, 2007; Westphal *et al.*, 2010). Rakutasandil osaleb NCAM1 erinevates signaaliradades: töötab signaalide vastuvõtjana, käivitab rakusiseseid signaalikaskaade (Ditlevsen *et al.*, 2008) ja mõjutab tsütoskeleti struktuuri (Büttner *et al.*, 2003).

Embrüonaalses arenguetapis on valdav osa NCAM1-st polüsialüülitud vormis. PSA-NCAM1 ekspressioon on kõige kõrgem hilises embrüonaalses arengus ja pärast sündi (Bonfanti, 2006), kui reguleerib rakumigratsiooni, sünaptogeneesi ja neuriitide kasvamist (Gascon *et al.*, 2007; Bonfati ja Seki, 2021). Vananedes hakkab ekspressiooni tase vähenema (Sunshine *et al.*, 1987; Ní Dhúill *et al.*, 1999). Täiskasvanutes leidub PSA-NCAM1-te neurogeneesiga seotud aju piirkondades (Kaur *et al.*, 2008). On näidatud, et täiskasvanute aju ekspresseerub PSA-NCAM1 näiteks prefrontaalses korteksis, entorinaalses korteksis, amügdalas, haistmissibulas, subventrikulaarses tsoonis, hipokampuses ja hüpotaalamuses (Seki ja Arai, 1993; Senkov *et al.*, 2012; Murray *et al.*, 2016) Seetõttu on PSA-NCAM1-te kasutatud neuroplastilisuse markerina täiskasvanute närvisüsteemis (Saini *et al.*, 2020).

NCAM1 polüsialüülimine nõrgestab NCAM1 adhesiooni tugevust, läbi mille reguleerib närvisüsteemis neuroplastilisust: rakkude migratsiooni, neuriitide kasvu ja sünaptilist plastilisust (Muller *et al.*, 1994; Maness ja Schachner, 2007). On täheldatud, et polüsialüülimine kontrollib ja koordineerib NCAM1 interaktsioone aju arenemise ajal. Kui hiirtes inaktiveeriti polüsialüültransferaaside St8sia2 ja St8sia4 geenid, siis lisaks häiretele, mis sarnanesid *Ncam1*-puudulikes hiirtes tekkinutele, täheldati tõsiseid muutusi fenotüübis: defektid ajus, sünnijärgne kasvu pidurdumine ning enneaegne surm. Kui aga St8sia2 ja St8sia4 puudulikes hiirtes oli täiendavalt kustutatud *Ncam1*, siis tõsiseid lisahäireid ei tekkinud (Weinhold *et al.*, 2005).

Kui PSA-NCAM1 tase vanusega alaneb, siis täiskasvanueas eksoni VASE ekspressioon tõuseb. VASE ekson vähendab aju plastilisust, takistades neuriitide kasvamist. Sellised muutused NCAM1 molekuliga tagavad täiskasvanu närvisüsteemi parema stabiilsuse. (Doherty *et al.*, 1992; Hinsby *et al.*, 2004)

1.5.1.7. Homofiilne ja heterofiilne seondumine

NCAM1 interakteerub kas homofiilselt, kui NCAM1 seondub NCAM1-ga (Hall *et al.*, 1990; Rao *et al.*, 1992), või heterofiilselt, kui seondumine toimub teiste molekulide (Kadmon *et al.*, 1990; Kiselyov *et al.*, 2005) või ekstratsellulaarse maatriksiga (Probstmeier ja Schachner, 1989). Homofiilsel cis-seandumisel interakteeruvad sama raku peal olevad NCAM1-d omavahel, trans-seandumine toimub eri rakkude NCAM1-de vahel (Kiselyov *et al.*, 2005). NCAM1 homofiilne ja heterofiilne seandumine vahendab rakkudevahelist adhesiooni ning käivitab mitmeid rakusisesed signaaliradu. On leitud, et signaalikaskaadide aktiveerumise tagajärjel toimub neuriitide pikenemine (Sandig *et al.*, 1994; Povlsen *et al.*, 2008).

NCAM1 heterofiilne seandumine saab toimuda teiste CAMidega. Adhesioonimolekul L1 on NCAM1 kaasretseptor. Mõlemad adhesioonimolekulid interakteeruvad β 1-integriinidega, aktiveerides signaaliradu neuronaalseks migratsiooniks ja neuriitide kasvamiseks (Kadmon *et al.*, 1990; Schmid ja Maness, 2008). Heterofiilne seandumine saab toimuda ka ekstratsellulaarse maatriksi komponentidega, näiteks kollageeni, laminiini ja fibronektiiniga. Samuti interakteerub NCAM1 kasvufaktorite ja nende retseptoritega (Hinsby *et al.*, 2004), näiteks gliia neurotroofse faktoriga (GDNF), selle retseptoriga GFR α ja fibroblasti kasvufaktori retseptoriga (FGFR). NCAM1 seandumine FGFRiga põhjustab aksoni kasvamist (Williams *et al.*, 1994; Doherty ja Walsh, 1996). NCAM1 ja FGFR vahelist interaktiooni reguleerib neurotransmitter adenosinotriifosfaat (ATP). ATP seondub samasse NCAM1 seandumissaiti kui FGFR ja takistab kahe molekuli vahelist interaktiooni (Kiselyov *et al.*, 1993; Skladchikova *et al.*, 1999). NCAM1 ja GDNF vahelise seandumise tagajärjel käivitub kaskaad, mille tagajärjel toimub aksonite pikenemine ja Schwanni rakkude migratsioon (Paratcha *et al.*, 2003).

1.5.1.8. NCAM1 ja sõltuvust tekitavad ained

Sõltuvust iseloomustab teatud aine tarbimine, mis süveneb korduval kasutamisel (Sussman ja Sussman, 2011). Psühhoaktiivsete ainete, sealhulgas alkoholi pikaajalise tarvitamise tagajärjel toimuvad muutused aju struktuuris ja funktsioonis (Most *et al.*, 2014). Geneetiliste assotsiatsiooniuuringud (GWAS) on leidnud seoseid teatud geenide ja sõltuvust tekitavate tarvitamise vahel. Sõltuvust tekitavate ainete tarvitamisega seotud geenid osalevad neurogeneesi ja närvisüsteemi arenguga seotud geeniradades (Saunders *et al.*, 2022). Sellised geenid võivad tekitada eelsoodumust uimastite tarbimise tekkeks ja mängida rolli närvisüsteemi struktuuri ümberkorraldustes. Näiteks on leitud seos *NCAM1* geeni ning

alkoholi tarvitamise ja suitsetamise vahel (Zhong *et al.*, 2015; Saunders *et al.*, 2022). Alkoholisõltuvuse riski on seostatud polümorfismidega *NCAM1* geenis (Yang *et al.*, 2007).

Kirjanduses leidub seega viiteid, et *NCAM1* geen on seotud alkoholi ja teiste sõltuvusttekitavate ainete tarbimisega. Siiski puudub hea ülevaade, millised polümorfismid *NCAM1* geenis seostuvad sõltuvusttekitavate ainete tarbimisega ning millises geeni piirkonnas need polümorfismid asuvad, seetõttu oli käesoleva töö eesmärgiks sõltuvuskäitumisega oluliselt seostuvad polümorfismid *NCAM1* geeni lookuses (11q23.2) kaardistada. Selle kohta, et *NCAM1* ekspressioon võiks olla alkoholisõltlaste ajus muutunud, on infot vähe. Hade *et al.* (2021) leidsid geenikiipi kasutades, et alkoholisõltlastel on taalamuses oluliselt üleekspresseeritud *NCAM1* mRNA tase. Seetõttu uuriti käesolevas töös võrdlevalt alkoholisõltlaste ja kontrollgrupi isikute dorsolateraalses prefrontaalses korteksis *NCAM1* mRNA isovormide *NCAM1-120*, *NCAM1-140* ja *NCAM1-180* ekspressioonitaset qPCR meetodil.

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Bakalaureusetöö keskendus neuraalse adhesioonimolekuli NCAM1 osalusele alkoholi liigeses tarbimises. Töö eesmärgid olid järgmised:

- 1) kaardistada inimese *NCAM1* geeni lookuses (11q23.2) suuremates ($n > 30\ 000$) ülegenoomsetes geeniuuringutes (GWAS) tuvastatud *NCAM1* geenis asuvad ühenukleotiidsed polümorfismid (SNP-d), mis on oluliselt seotud ($p < 9 \times 10^{-7}$) sõltuvust tekitavate ainete tarbimise ja/või riskikäitumisega.
- 2) uurida, kas ja kuidas NCAM1-120, NCAM1-140, NCAM1-180 isovormide ja totaalse NCAM1 mRNA ekspressiooni tasemed erinevad alkoholisõltlaste ja tervete inimeste dorsolateraalses prefrontaalses kooses.

2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1. Geenikaardi koostamine

Selleks, et kaardistada inimese *NCAM1* geeni lookuses (11q23.2) sõltuvust tekitavate ainete tarbimise ja riskikäitumisega seotud SNP-d, kasutati NHGRI-EBI ülegenoomsete assotsiatsiooniuuringute (GWAS) kataloogi. Kaasati uuringud, milles katseisikute arv on üle 30 000, ning andmed, mille p-väärtus on väiksem kui 9×10^{-7} . Samast uuringust kaasati mitu polümorfismi juhul, kui need asusid üksteisest enam kui 25 000 aluspaari kaugusel. Sõltuvus- ja riskikäitumised jagati viide kategooriasse: 1) alkoholi tarbimine (fenotüüp: „nädala jooksul tarbitud alkoholi ühikute kogus” (“*drinks per week*”)); 2) kanepi tarbimine (fenotüüp: „kanepi tarbimine” (“*cannabis use*”)); 3) opioidide tarbimine (fenotüüp: „opioidide kasutamise häire” (“*opioid use disorder*”)); 4) riskikäitumine (alafenotüübid: „riskeeriv käitumine” (“*risk-taking behavior*”), „seksuaalpartnerite arv” (“*number of sexual partners*”)); 5) suitsetamine (alafenotüübid: „vanus suitsetamise alustamisel” (“*smoking initiation*”), „suitsetatud aastate arv” (“*lifetime smoking*”), „suitsetamise staatus - kas isik on kunagi suitsetanud” (“*smoking status - ever vs never smokers*”)).

Kogutud andmed kanti esmalt tabelisse (Lisa 1). Seejärel kasutati tabelit joonise loomise aluseks programmeerimiskeele R versioon 4.2.2 (R Core Team, 2022) ja tarkvaraprogrammi RStudio versioon 2022.12.0+353 (pakett ggplot; Posit team, 2022) abil. Genoomsed

koordinaadid GRCh38 alusel seoti x-teljega. Sõltuvus- ja riskikäitumisega seotud fenotüüpide p-väärtused teisendati kümnendlogaritmideks ning seoti y-teljega. Iga seose taga oleva uuringu katseisikute arv seoti punkti (geom_point) suurusega, ning viis erinevat sõltuvus- ja riskikäitumisega seotud fenotüüpi esitati erinevate värvidega. Joonist täiendati programmiga BioRender.

2.2.2. Inimese ajukude

Bakalaureusetöös kasutati alkoholisõltlaste (n=14) ja kontrollgrupi (n=16) dorsolateraalset prefrontaalset korteksi *post mortem* koeproove. Alkoholisõltlaste keskmine vanus oli $53,1 \pm 7,7$ (keskväärtus \pm standardhälve), kontrollgrupi keskmine vanus oli $51,8 \pm 15,8$. Alkoholisõltlaste grupp oli määratud isikud, kellele oli eelnevalt diagnoositud alkoholi tarvitamisega seotud haigusi ja esines alkoholisõltlastele iseloomulik organkahjustus (alkoholiga seotud maksahaigus, kardiomiopaatia, pankreatiit). Kontrollgrupis olevatel isikutel ei olnud eelnevalt diagnoositud alkoholi tarvitamisega seotud haigusi ega ei esinenud alkoholi tarvitamisega kaasnevat organkahjustust. Koeproovid saadi Tartu Ülikooli patoloogilise anatoomia ja kohtuarstiteaduste osakonnast ja Eesti Kohtuekspertiisi Instituudist. Töö inimese ajukoega oli kooskõlastatud Tartu Ülikooli inimuuringute eetika komiteega (taotlus nr 223/T-4).

2.2.3. RNA eraldamine

-80 °C juures hoitud dorsolateraalset prefrontaalset korteksi koetükid sulatati jääs. Koeproovidele lisati 100 µl TRIzol® reagenti (Invitrogen) ja homogeniseeriti mehaaniliselt homogenisaatoritega (Eppendorf). Seejärel lisati 900 µl TRIzol® reagenti ja inkubeeriti 5 minutit toatemperatuuril. Proovidele lisati 200 µl kloroformi (Thermo Fisher Scientific), raputati tuube 15 sekundit ja inkubeeriti 2 minutit toatemperatuuril. Proovid tsentrifuugiti 15 minutit 4 °C juures 12 000 rpm (Fresco™ 17 Microcentrifuge, Thermo Fisher Scientific, rootor 75003424). Eraldus RNAd sisaldav vesifaas, mis pipeteeriti uude tuubi ja lisati 500 µl isopropanooli (Naxo). Proove inkubeeriti 10 minutit toatemperatuuril ja tsentrifuugiti 10 minutit 4 °C juures 12 000 rpm. Seejärel eemaldati supernatant ja sademele lisati 1 ml jääkülma 75% etanooli pelletilt soolade mahapesemiseks. Fuugiti 5 minutit 4 °C juures 7500 rpm ja eemaldati supernatant. Sademele lisati 50 µl vett ja suspendeeriti.

Proovide RNA kontsentratsioon mõõdeti spektrofotomeetriga NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific). Kalibreerimine tehti 1 µl veega ja RNA kontsentratsiooni mõõtmiseks võeti

1 µl proovi. RNA kontsentratsioon lahjendati vajadusel veega. Proovide kontsentratsioonid olid $606,3 \pm 117,4$ ng/µl. RNA proovid säilitati -80 °C juures.

2.2.4. cDNA süntees

cDNA sünteesiks kasutati FireScript RT cDNA Synthesis Mix komplekti (Solis BioDyne). Tuubis segati 10 µl eelnevalt eraldatud RNAd, 6,5 µl vett, 2 µl 10x RT Reaction Premix with oligo (dT) and random primer reagenti (Solis BioDyne) ja 1,5 µl FireScript® Enzyme mix'i (Solis BioDyne). Kui RNA kontsentratsioon oli madalam kui 500 ng/µl, siis kasutati 16,5 µl RNAd ja 2 µl 10x RT Reaction Premix with oligo (dT) and random primer reagenti (Solis BioDyne) ja 1,5 µl FireScript® Enzyme mix'i (Solis BioDyne). Reaktsiooni lõppmaht ühe proovi kohta oli 20 µl. Reaktsioonisegu inkubeeriti 5 minutit toatemperatuuril, seejärel hoiti termoblokil 50 °C juures 30 minutit cDNA sünteesi toimumiseks ja reaktsioon inaktiveeriti 85 °C juures 5 minutit. cDNA lahjendati veega 2,5 korda ja säilitati -20 °C juures.

2.2.5. qPCR

Kvantitatiivse polümeraasi ahelreaktsiooni (qPCR) reaktsioonisegu tegemiseks segati 7,5 µl eelnevalt sünteesitud cDNAd, 44 µl 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix'i (Solis BioDyne) ja 143,5 µl vett, mis tõsteti 38 µl kaupa viide tuubi laiali. Igasse tuubi lisati 4 µl praimerisegu. Praimerisegu valmistamiseks segati kokku 5 µl 100 µM praimer *forward* ahelat, 5 µl 100 µM *reverse* ahelat ja 90 µl vett. Töös kasutatud NCAM1 isovormide ja β-aktiini praimerite järjestused on toodud tabelis 1. NCAM1-totaalne praimer seondub kõikide isovormide ühisosale 3. ja 4. eksonile.

Tabel 1. Kasutatud praimerite nimetused ja järjestused

Praimeri nimetus	<i>Forward</i> 5'-3' järjestus	<i>Reverse</i> 5'-3' järjestus	Viide
NCAM1-120	5'-CATGTCACCACTC ACAGATACTTTTG-3'	5'-CTCTGTAATCTAG CATGATGGTTTTT-3'	Jaako <i>et al.</i> , 2016
NCAM1-140	5'-AACGAGACCACG CCACTGA-3'	5'-CGTTTCTGTCTCCT GGCACTCT-3'	

NCAM1-180	5'-GACTTTAAAATGG ACGAAGGGAAC-3'	5'-CCCAGGGCTGCAA AAACA-3'	
NCAM1-totaalne	5'-GAGATCAGCGTTG GAGAGTCC-3'	5'-GGAGAACCAGGA GATGTCTTTATCTT-3'	
ACTB	5'-CTGGGAGTGGGTG GAGGC-3'	5'-TCAACTGGTCTCA AGTCAGTG-3'	Varul <i>et al.</i> , 2021

Ühe koeproovi kohta saadi viis reaktsioonisegu vastava praimeriseguga. 384-kaevu plaadile tõsteti 10 µl igat reaktsioonisegu neljas korduses. qPCRi plaat kiletati ja tsentrifugiti toatemperatuuril 1 minut 2000 rpm (Centrifuge 5810R, Eppendorf, rootor A-4-62). qPCR teostati masinaga QuantStudio 12K Flex (Thermo Fisher Scientific) ja tarkvaraga QuantStudio 12K Flex Software (Thermo Fisher Scientific). qPCRi programm on toodud tabelis 2.

Tabel 2. qPCR programm

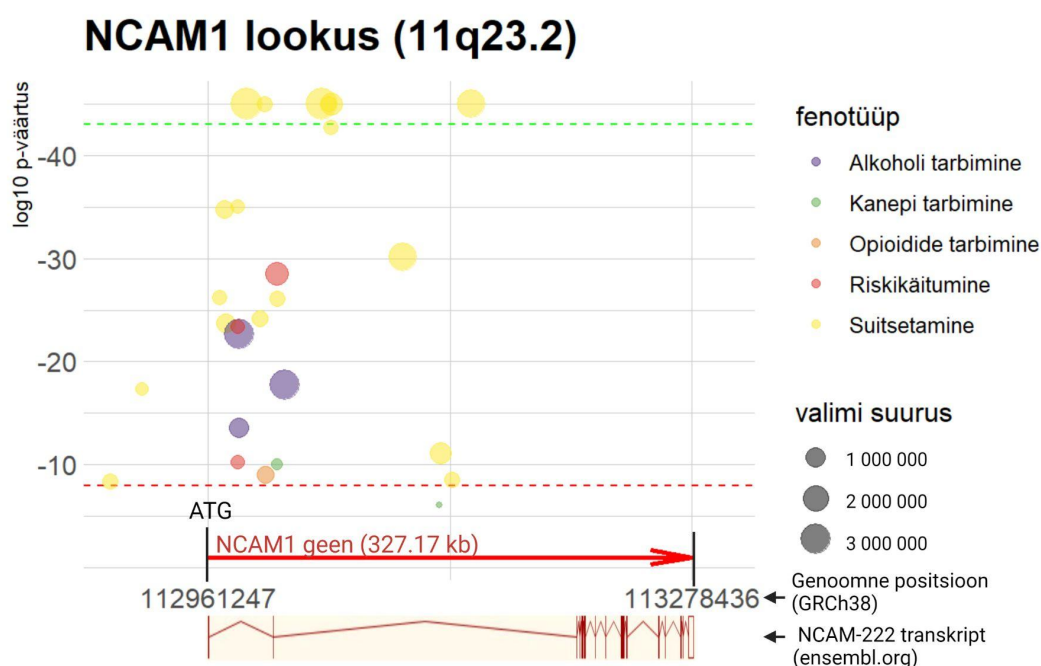
Programmi etapp	Temperatuur	Aeg	Tsüklite arv
Esmane denaturatsioon	95 °C	10 min	1
Denaturatsioon	95 °C	15 sek	40
Praimerite seondumine ja DNA ahela süntees	60 °C	1 min	
Sulamiskõver	95 °C	15 sek	1
	60 °C	1 min	
	95 °C	15 sek	

QuantStudio 12K Flex tarkvaras kontrolliti reaktsiooni kvaliteeti ja määrati manuaalselt läviväärtus. Andmed eksporditi Microsoft Exceli programmi (Microsoft Office Professional, 2016), kus need analüüsiti. Arvutati proovide lävitsüklite (Ct) keskmised. Töös kasutati relatiivset kvantifikatsiooni, kus *NCAM1* geeniekspressiooni taset mõõdeti koduhoidjageeni ACTB suhtes. Analüüsiks viidi tulemused $2^{-\Delta Ct}$ kujule (Livak ja Schmittgen, 2001). Tulemuste

analüüs ja graafikud tehti programmeerimiskeele R ja tarkvaraprogrammi RStudio versioon abil. Jaotuste võrdlemiseks kasutati Mann-Whitney U testi.

NCAM1 mRNA ekspressioonitasemete hälbijate olemasolu kontrollimiseks kasutati Grubbs'i testi ($\alpha=0,05$), mis eeldab andmete normaaljaotust. Kuna ekspressioonitasemete tulemuste jaotus $2^{-\Delta Ct}$ kujul oli ebasümmeetriline, siis normaaljaotuse saamiseks viidi ekspressioonitaseme mõõtmise tulemused logaritmilisele kujule. Hälbijate tuvastamiseks kasutati GraphPad Software kalkulaatorit. NCAM1-120 isovormi ekspressiooni tasemetes leiti üks hälbija alkoholisõltlaste grupis, mis eemaldati ($p < 0,05$). Teiste isovormide puhul ebanormaalset hälbimist ei olnud.

2.3. Tulemused



Joonis 3. Sõltuvust tekitavate ainete tarbimise ja riskikäitumisega seotud ühenukleotiidsed polümorfismid (SNP-d) inimese NCAM1 geeni lookuses (11q23.2). Iga seost märgib joonisel üks ringikujuline punkt (*geom point*). Genoomsed koordinaadid GRCh38 alusel seoti ggplot koodis x-teljega ning sõltuvus- ja riskikäitumisega seotud fenotüüpide p-väärtused seoti y-teljega. Iga seose taga oleva uuringu katseisikute arv seoti punkti (*geom point*) suurusega. Punane horisontaalne katkendjoon tähistab ülegenoomset olulisuse piiri $p=1 \times 10^{-8}$; roheline horisontaalne katkendjoon tähistab olulisuse piiri $p=1 \times 10^{-43}$, sellest ülespoole jäävate seoste statistiline olulisus on eriti suur, $p < 1 \times 10^{-43}$. Punane nool tähistab NCAM1 geeni asukohta. Punase noole all tootud skemaatiline NCAM1 transkripti skeem pärineb andmebaasist Ensembl ning tähistab transkripti NCAM1-222 (transkript ENST00000615285.4), mis on kõige enim eksoneid (21) sisaldav transkript Ensembl

andmebaasis. Joonis on loodud kasutades tarkvaraprogrammi RStudio (pakett ggplot) ning täiendatud kasutades jooniste loomise programmi BioRender.

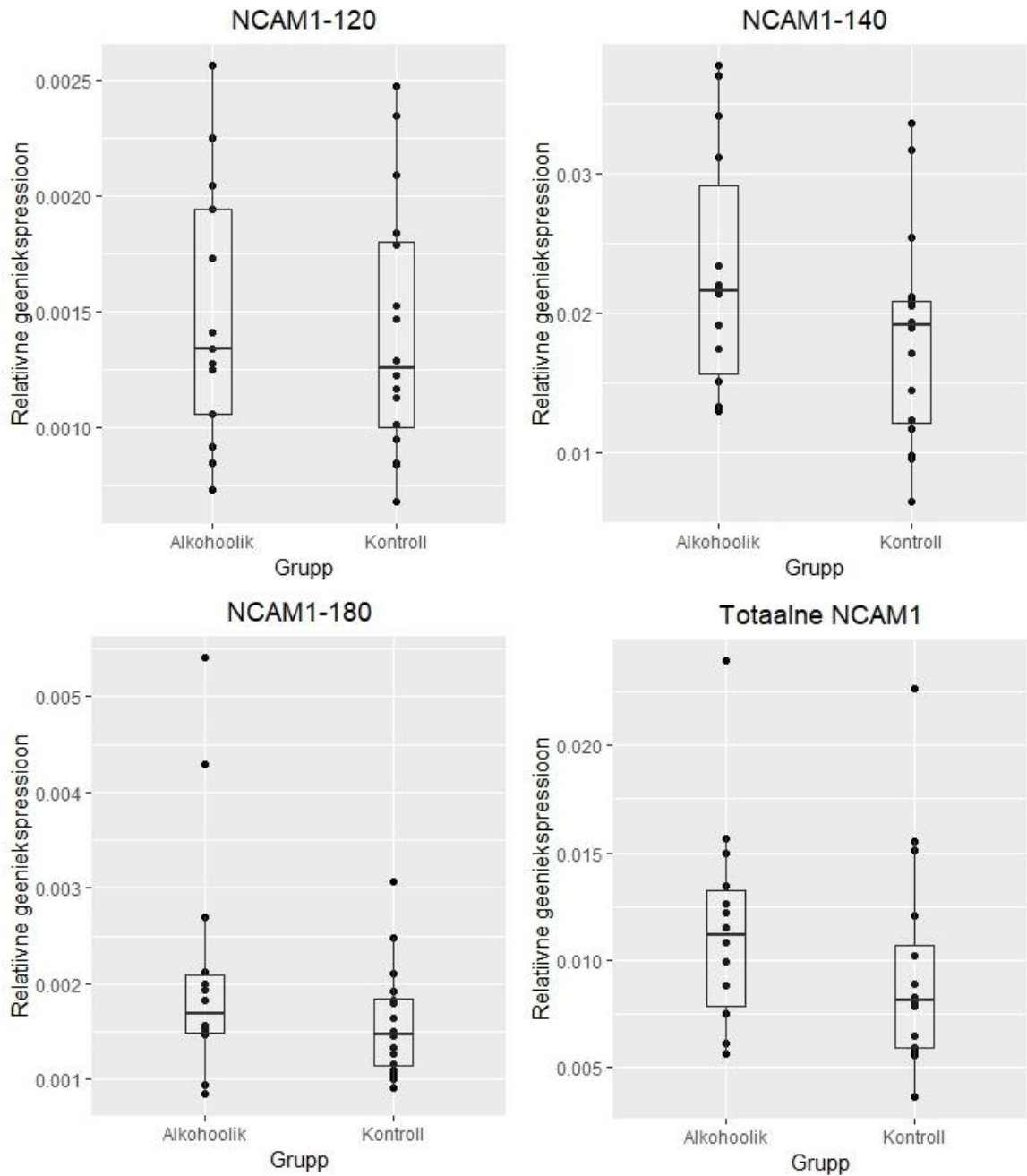
Loodud *NCAM1* geenikaardilt on näha, et enamik *NCAM1* polümorfisme, mis seostuvad oluliselt sõltuvus- ja riskikäitumisega, asuvad *NCAM1* geeni alaosas, intronites 1 ja 2. Käesolevas töös kasutatud praimerid totaalse *NCAM1* transkripti amplifitseerimiseks on disainitud *NCAM1*-222 (ENST00000615285.4) transkripti 3. ning 4. eksonitele, mis asuvad olulistest seostest allavoolu. Ülejäänud isovormide praimerid on disainitud 4. eksonist allavoolu, sest geeni 3'-osas toimub alternatiivne splaissimine, mille tagajärjel tekivad *NCAM1* peamised isovormid (120 kDa, 140 kDa ja 180 kDa).

Bakalaureusetöö teiseks eesmärgiks oli võrrelda *NCAM1* mRNA ekspressiooni tasemeid alkoholisõltlaste ja kontrollgrupi dorsolateraalses prefrontaalses korteksis. Ekspressioonitasemete graafikud on kujutatud joonisel 4. *NCAM1*-120 isovormi mRNA ekspressioon ei erinenud statistiliselt oluliselt alkoholisõltlaste ($n=13$, $m=0,00182$, $SD=0,00137$) ja kontrollgrupi vahel ($n=16$, $m=0,00142$, $SD=0,00055$); $W=112$, $p=0,7461$.

NCAM1-140 isovormi mRNA ekspressioon ei erinenud statistiliselt oluliselt alkoholisõltlaste ($n=14$, $m=0,02288$, $SD=0,0088$) ja kontrollgrupi vahel ($n=16$, $m=0,01829$, $SD=0,00763$); $W=150$, $p=0,1201$. P-väärtus oli *NCAM1*-140 isovormi puhul kõige väiksem.

NCAM1-180 isovormi mRNA ekspressioon ei erinenud statistiliselt oluliselt alkoholisõltlaste ($n=14$, $m=0,00195$, $SD=0,00115$) ja kontrollgrupi vahel ($n=16$, $m=0,0016$, $SD=0,00059$); $W=141$, $p=0,24$.

Totaalse *NCAM1* ekspressioon ei erinenud statistiliselt oluliselt alkoholisõltlaste ($n=14$, $m=0,01134$, $SD=0,0049$) ja kontrollgrupi vahel ($n=16$, $m=0,00937$, $SD=0,00486$); $W=143$, $p=0,2082$.



Joonis 4. Isovormide NCAM1-120, NCAM1-140, NCAM1-180 ja totaalse NCAM1 relatiivne geeniekspressioon dorsolateraalse prefrontaalse korteksis alkoholisõltlaste grupis ja kontrollgrupis

2.4. Arutelu

Bakalaureusetöö keskendus neuraalse adhesioonimolekuli NCAM1 osalusele alkoholi liiges tarbimises. Esmalt kaardistati *NCAM1* geeni lookuses (11q23.2) suuremates (n suurem kui 30 000) ülegenoomsetes geenuuringutes (GWAS) tuvastatud *NCAM1* geenis asuvad SNP-d, mis on oluliselt seostunud sõltuvust tekitavate ainete tarbimisega ja riskikäitumisega.

Alkoholisõltuvuse tekke riski on seostatud paljude geenidega, mis keskkonna koosmõjul võivad põhjustada sõltuvuse teket (Mayfield *et al.*, 2008; Edenber ja Foroud, 2013). Varasemad ülegenoomsed assotsiatsiooniuuringud on identifitseerinud geenid ja signaalirajad, mis on seotud alkoholi tarbimisega.

NCAMI genoomse lookuse skeemilt (joonis 3) selgub, et nii alkoholi tarbimise kui ka riskikäitumisega seotud SNP-id asuvad samas piirkonnas. Võib arvata, et *NCAMI* geeni poolt kodeeritav neuraalne adhesioonimolekul 1 reguleerib selliseid juhteteid ajus, mis on seotud üldisema soodumusega erinevatele sõltuvus- ja riskikäitumistele. Geenikaardilt on näha, et *NCAMI* geenis asuvad sõltuvuse ja riskikäitumisega seotud SNP-d geeni algusosas, enamasti esimeses intronis ning jäävad valdavalt geeni piirkonda, mis kodeerib Ig domeene, mille vahendusel toimuvad NCAM1 homofiilsed ja heterofiilsed interaktsioonid. Samas ei muuda ükski nendest polümorfismidest NCAM1 valgulist järjestust ning assotsiatsioonid sõltuvuse- ja riskikäitumise fenotüüpidega võivad olla seotud ka geeni algusosas paiknevate geeni aktiivsust määravate regulaatorpiirkondadega.

Eelnevalt on arvatud, et impulsiivsus ja riskikäitumine on seotud sõltuvust tekitavate ainete tarvitamisega. Impulsiivsus on sõltuvuse põhjustaja, kuid tekib ka sõltuvust tekitavate ainete tarvitamise tagajärjel (Moeller ja Dougherty, 2002). Näiteks on alkoholi tarvitamist ja alkoholisõltuvust seostatud kiireloomulisuse, sensatsiooni otsimise, spontaansuse ja kaalutusvõimega (Shin *et al.*, 2012). Seega võiks järgnevalt uurida NCAM1 ekspressiooni impulsiivsusega ja sõltuvusega seotud aju osades, näiteks ventraalses juttkehas ja amügdalas (Kozak *et al.*, 2019).

Käesolevas töös uuriti, kas ja kuidas mõjutab alkoholisõltuvus NCAM1 mRNA ekspressiooni taset dorsolateraalses prefrontaalses kooses. *NCAMI* geenilt kodeeritakse kolm peamist isovormi: NCAM1-120, NCAM1-140 ja NCAM1-180, mis omavahel erinevad rakumembraanile kinnitumise viisi ja tsütoplasmaatilise domeeni poolest. Ekspressioonitaseme mõõtmiseks kasutati relatiivset kvantifitseerimist, eeldades, et koduhoidjageeni ACTB ekspressioon dorsolateraalse prefrontaalse korteksi koeproovides on läbivalt samal tasemel. Relatiivsetes ekspressioonitasemetes statistilist olulisust ei leitud.

Varasemate uuringute põhjal ei ole üheselt selge, kas NCAM1 tase alkoholi mõjul ajus muutub. Hade *et al.* (2021) leidsid, et alkoholisõltlastel on taalamuses oluliselt

üleekspressioneeritud nii NCAM1 kui ka mitmete teiste CAMide mRNA tase. Samuti on näidatud *in vitro* tingimustes, et alkohol tõstab varases embrüonaalses arengus NCAM1 ekspressiooni taset (Miller ja Luo, 2006). Kuna NCAM1 on oluline närvisüsteemi plastilisuse ja struktuuri tagamisel, siis NCAM1 ekspressiooni taseme muutused võivad põhjustada muutusi rakkudevahelistes interaktsioonides. Muutuseid rakk-rakk interaktsioonides on täheldatud fetaalse alkoholisündroomiga isikutel (Licheri ja Brigman, 2021). Sünnieelne kokkupuude etanooliga takistab korrektset närvisüsteemi arengut, põhjustades vigast neurogeneesi, rakkude migratsiooni ja sünapseid, mis omakorda põhjustavad muutuseid aju struktuuris, sealhulgas neokorteksis (Miller, 1992).

Käesolevas bakalaureusetöös leiti, et NCAM1 mRNA tase alkoholisõltlaste ja kontrollgrupi frontaalkoores oluliselt ei erine. Samuti on leitud, et NCAM1 mRNA ekspressioonitase ei erinenud alkoholi tarvitanud rottide ja kontrollgrupi vahel. Seevastu tõstis alkoholi tarbimine vastsündinud rottides PSA-NCAM1 taset ja polüsialüülimise taseme alanemine lükkus edasi (Miñana *et al.*, 2000). Tulemus viitab sellele, et alkohol võib muuta NCAM1 posttranslatsioonilisi protsesse. Bakalaureusetöö tulemuste põhjal võib järeldada, et alkoholisõltlaste erinevused aju struktuuris ja funktsioonis ei tarvitse mõjutada NCAM1 mRNA ekspressiooni. Küll aga võib alkoholisõltlastel olla muutunud valkude ekspressioonitasemed. Miñana *et al.* (2000) uuringust selgus, et NCAM1-140 ja NCAM1-180 isovormide tasemed olid madalamad alkoholiga kokku puutunud vastsündinud rottides.

NCAM1-140 isovormi relatiivne ekspressiooni tase viitab tendentsile, et alkoholisõltlastel võib isovormi ekspressiooni tase olla kõrgem kui kontrollgrupis. Edaspidises töös võiks valimit suurendada, mis suurendaks võimalust statistilist olulisuse märkamiseks. Ekspressioonitasemete mõõtmise tulemusi võisid mõjutada ka *post mortem* ajukudede kasutamine, sest isikute vahel võisid varieeruda koeproovide pH, ajukoe maht ja kaal, surmaviis ja muud haigused.

Kuna alkoholi tarbimisega seotud SNP-id asuvad geeni alguses, siis võivad need tõenäoliselt kattuda regulaator-järjestustega ja muuta nende funktsiooni, mis omakorda võib mõjutada NCAM1 ekspressiooni. Seetõttu on *NCAM1* geeni ekspressioonitasemete uurimine põhjendatud. Edaspidi võiks uurida NCAM1 ekspressioonitasemeid alkoholisõltlastel muudes aju piirkondades, mida seostatakse sõltuvuse ja impulsiivsusega.

Järeldused:

- 1) *NCAMI* genoomse lookuse jooniselt on näha, et nii alkoholi ja teiste sõltuvusttekitavate ainete tarbimisega kui ka riskikäitumisega seotud SNP-id asuvad *NCAMI* geeni samas piirkonnas. Kõige suurem osa olulistest seostest langeb esimesse intronisse, kõik olulised seosed on geeni 5'-osas. On tõenäoline, et seosed sõltuvus- ja riskikäitumisega on seotud *NCAMI* geeni ekspressiooni määrava regulaaroralaga geeni algusosas.
- 2) käesolevas töös ei leitud olulisi erinevusi *NCAMI* geeni totaalses või isovormide (120 kDa, 140 kDa, 180 kDa) spetsiifilises ekspressioonis alkoholisõltlaste dorsolateraalses prefrontaalses korteksis võrrelduna kontrollisikutega. Kuna sõltuvuskäitumine seostub sama piirkonnaga, mis riskikäitumine, tuleks edaspidi uurida *NCAM1* geeniekspressiooni muutuseid sõltuvuse ja impulsiivsusega seotud ajupiirkondades nagu naalduv tuum ja amügdala.

KOKKUVÕTE

Alkoholisõltuvuse teket ja kulgu mõjutavad nii keskkond, sotsiaalsed tegurid kui ka geneetika. Alkoholi liigtarvitamine põhjustab närvisüsteemis laialdasi molekulaarseid muutuseid, mis võivad viia alkoholisõltuvuse tekkeni. Alkoholisõltlastel on täheldatud puudujääke kognitiivses võimekuses. Käitumise reguleerimist, otsuste tegemist, planeerimist ja muid kognitiivseid funktsioone reguleerib peajus dorsolateraalne prefrontaalne korteks.

Geneetiliste assotsiatsiooniuuringutega on leitud seoseid alkoholi tarvitamise ning neurogeneesis ja neuroplastilisuses osalevate geenide vahel. NCAM1 on närvisüsteemis rakkude vaheliste interaktsioonide vahendaja, olles oluline närvisüsteemi arengus ja neuroplastilisuses. Alternatiivse splicingi tulemusena eristatakse kolme peamist isovormi NCAM1-120, NCAM1-140 ja NCAM1-180.

Bakalaureusetöö eesmärgiks on kaardistada sõltuvuskäitumisega oluliselt seostuvad polümorfismid *NCAM1* geeni lookuses ning uurida, kas ja kuidas NCAM1 mRNA ekspressiooni tasemed alkoholisõltlaste ja kontrollgrupi dorsolateraalses prefrontaalses korteksis erinevad. *NCAM1* geenikaardilt selgub, et alkoholi tarbimisega ja riskikäitumisega seotud SNP-d asuvad geeni alaosas, mistõttu võivad need muuta regulaator-järjestuste funktsiooni, mis omakorda mõjutab NCAM1 geeniekspressiooni. Alkoholisõltlaste ja kontrollgrupi NCAM1 mRNA ekspressioonitasemetes statistiliselt olulist erinevust ei leitud. Edaspidises töös tuleks uurida NCAM1 ekspressiooni impulsiivsusega seotud aju osades, näiteks naalduvas tuumas ja amügdalas.

RESÜMEE

The role of the neural cell adhesion molecule NCAM1 in developing alcohol use disorder

Summary

Mirjam Kask

Alcohol use disorder develops as a result of a combination of environmental, social and genetic factors. Alcohol use disorder is a disorder characterized by continuous consumption of alcohol. Individuals with alcohol use disorder experience alcohol craving and impaired ability to control drinking. It has been shown that alcohol use disorder causes difficulties in behavior regulation, planning, learning and other cognitive functions, which are controlled by the dorsolateral prefrontal cortex of the brain. Intercellular communication and adhesion are essential for the structure and function of the nervous system. Neural cell adhesion molecule 1 (NCAM1) belongs to the immunoglobulin superfamily of cell adhesion molecules, and is primarily expressed in the nervous system. NCAM1 regulates cell adhesion and mediates signals that affect neuronal proliferation, migration, differentiation, neurite outgrowth and remodeling as well as synapse formation. Therefore, NCAM1 is important in neuroplasticity and brain development. Alternative splicing of the *NCAM1* gene produces three main isoforms NCAM1-120, NCAM1-140 and NCAM1-180.

Genome-wide association studies have shown a linkage between single nucleotide polymorphisms (SNPs) in *NCAM1* gene and alcohol use. One of the aims of this thesis is to map SNPs in the *NCAM1* gene associated with addiction and risk-taking behavior. SNPs associated with alcohol consumption and risk-taking behavior are located at the beginning of the *NCAM1* gene. Therefore, SNPs associated with alcohol consumption may change the function of regulatory sequences and consequently change the expression of NCAM1.

Another aim of the thesis is to show whether and how the levels of NCAM1 expression differ between individuals with alcohol use disorder and control group in the dorsolateral prefrontal cortex. The results show no significant difference between the levels of NCAM1 mRNA expression in individuals with alcohol use disorder and control group. This may implicate that differences in brain structure of individuals with alcohol use disorder do not affect mRNA expression. Henceforth, the expression of NCAM1 could be compared between individuals with alcohol use disorder and control group in other brain areas associated with alcohol consumption and impulsivity, for instance in nucleus accumbens and amygdala.

KIRJANDUSE LOETELU

- Albach, C., Damoc, E., Denzinger, T., Schachner, M., Przybylski, M., & Schmitz, B. (2004). Identification of N-glycosylation sites of the murine neural cell adhesion molecule NCAM by MALDI-TOF and MALDI-FTICR mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 378(4), 1129–1135.
- Alcaro, A., Huber, R., & Panksepp, J. (2007). Behavioral functions of the mesolimbic dopaminergic system: an affective neuroethological perspective. *Brain research reviews*, 56(2), 283–321.
- Anderson, B. O., Berdzuli, N., Ilbawi, A., ... Ferreira-Borges, C. (2023). Health and cancer risks associated with low levels of alcohol consumption. *The Lancet. Public health*, 8(1), e6–e7.
- Baddeley, A. (2003) Working memory: looking back and looking forward. *Nat Rev Neurosci* 4, 829–839.
- Barbas, H., & Zikopoulos, B. (2007). The prefrontal cortex and flexible behavior. *The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, 13(5), 532–545.
- Barbey, A. K., Koenigs, M., & Grafman, J. (2013). Dorsolateral prefrontal contributions to human working memory. *Cortex; a journal devoted to the study of the nervous system and behavior*, 49(5), 1195–1205.
- Barthels, D., Vopper, G., Boned, A., Cremer, H., & Wille, W. (1992). High Degree of NCAM Diversity Generated by Alternative RNA Splicing in Brain and Muscle. *The European journal of neuroscience*, 4(4), 327–337.
- Baselmans, B., Hammerschlag, A. R., Noordijk, S., Ip, H., van der Zee, M., de Geus, E., Abdellaoui, A., Treur, J. L., & van't Ent, D. (2021). The Genetic and Neural Substrates of Externalizing Behavior. *Biological psychiatry global open science*, 2(4), 389–399.
- Becker H. C. (2008). Alcohol dependence, withdrawal, and relapse. *Alcohol research & health: the journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*, 31(4), 348–361.
- Berridge K. C. (2012). From prediction error to incentive salience: mesolimbic computation of reward motivation. *The European journal of neuroscience*, 35(7), 1124–1143.
- Beylergil, S. B., Beck, A., Deserno, L., Lorenz, R. C., Rapp, M. A., Schlagenhaut, F., Heinz, A., & Obermayer, K. (2017). Dorsolateral prefrontal cortex contributes to the impaired behavioral adaptation in alcohol dependence. *NeuroImage. Clinical*, 15, 80–94.

- Bishehsari, F., Magno, E., Swanson, G., Desai, V., Voigt, R. M., Forsyth, C. B., & Keshavarzian, A. (2017). Alcohol and Gut-Derived Inflammation. *Alcohol research : current reviews*, 38(2), 163–171.
- Blumenfeld, R. S., & Ranganath, C. (2006). Dorsolateral prefrontal cortex promotes long-term memory formation through its role in working memory organization. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(3), 916–925.
- Bonfanti L. (2006). PSA-NCAM in mammalian structural plasticity and neurogenesis. *Progress in neurobiology*, 80(3), 129–164.
- Bonfanti, L., & Seki, T. (2021). The PSA-NCAM-Positive "Immature" Neurons: An Old Discovery Providing New Vistas on Brain Structural Plasticity. *Cells*, 10(10), 2542.
- Brazel, D. M., Jiang, Y., Hughey, J. M., ... Vrieze, S. (2019). Exome Chip Meta-analysis Fine Maps Causal Variants and Elucidates the Genetic Architecture of Rare Coding Variants in Smoking and Alcohol Use. *Biological psychiatry*, 85(11), 946–955.
- Brenneman, L. H., & Maness, P. F. (2010). NCAM in neuropsychiatric and neurodegenerative disorders. *Advances in experimental medicine and biology*, 663, 299–317.
- Brodmann, K. (1909). *Vergleichende Lokalisationslehre der Grosshirnrinde in ihren Prinzipien dargestellt auf Grund des Zellenbaues*. Barth.
- Burroughs, C. L., Watanabe, M., & Morse, D. E. (1991). Distribution of the neural cell adhesion molecule (NCAM) during heart development. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 23(12), 1411–1422.
- Büttner, B., Kannicht, C., Reutter, W., & Horstkorte, R. (2003). The neural cell adhesion molecule is associated with major components of the cytoskeleton. *Biochemical and biophysical research communications*, 310(3), 967–971.
- Cai, N., Revez, J. A., Adams, M. J., ... Flint, J. (2020). Minimal phenotyping yields genome-wide association signals of low specificity for major depression. *Nature genetics*, 52(4), 437–447.
- Carafoli, F., Saffell, J. L., & Hohenester, E. (2008). Structure of the tandem fibronectin type 3 domains of neural cell adhesion molecule. *Journal of molecular biology*, 377(2), 524–534.
- Chanraud, S., Pitel, A. L., Müller-Oehring, E. M., Pfefferbaum, A., & Sullivan, E. V. (2013). Remapping the brain to compensate for impairment in recovering alcoholics. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 23(1), 97–104.
- Colwell, G., Li, B., Forrest, D., & Brackenbury, R. (1992). Conserved regulatory elements in the promoter region of the N-CAM gene. *Genomics*, 14(4), 875–882.
- Courtney, S. M., Petit, L., Haxby, J. V., & Ungerleider, L. G. (1998). The role of prefrontal cortex in working memory: examining the contents of consciousness. *Philosophical*

- transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences, 353(1377), 1819–1828.
- Cowan, N. (2014). Working Memory Underpins Cognitive Development, Learning, and Education. *Educational psychology review*, 26(2), 197–223.
- Cunningham, B. A., Hemperly, J. J., Murray, B. A., Prediger, E. A., Brackenbury, R., & Edelman, G. M. (1987). Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. *Science New York, N.Y.*, 236(4803), 799–806.
- Curtis, C. E., & D'Esposito, M. (2003). Persistent activity in the prefrontal cortex during working memory. *Trends in cognitive sciences*, 7(9), 415–423.
- Dalseg, A. M., Linnemann, D., & Bock, E. (1989). Soluble neural cell adhesion molecule in brain, cerebrospinal fluid and plasma in the developing rat. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 7(2), 209–217.
- Deak, J. D., Zhou, H., Galimberti, M., ... Gelernter, J. (2022). Genome-wide association study in individuals of European and African ancestry and multi-trait analysis of opioid use disorder identifies 19 independent genome-wide significant risk loci. *Molecular psychiatry*, 27(10), 3970–3979.
- D'Esposito, M., Ballard, D., Zarahn, E., & Aguirre, G. K. (2000). The role of prefrontal cortex in sensory memory and motor preparation: an event-related fMRI study. *NeuroImage*, 11(5 Pt 1), 400–408.
- D'Eustachio, P., Owens, G. C., Edelman, G. M., & Cunningham, B. A. (1985). Chromosomal location of the gene encoding the neural cell adhesion molecule (N-CAM) in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(22), 7631–7635.
- Di Chiara G. (1997). Alcohol and dopamine. *Alcohol health and research world*, 21(2), 108–114.
- Dickson, G., Gower, H. J., Barton, C. H., Prentice, H. M., Elsom, V. L., Moore, S. E., Cox, R. D., Quinn, C., Putt, W., & Walsh, F. S. (1987). Human muscle neural cell adhesion molecule (N-CAM): identification of a muscle-specific sequence in the extracellular domain. *Cell*, 50(7), 1119–1130.
- Ditlevsen, D. K., Povlsen, G. K., Berezin, V., & Bock, E. (2008). NCAM-induced intracellular signaling revisited. *Journal of neuroscience research*, 86(4), 727–743.
- Ditlevsen, D. K., Povlsen, G. K., Berezin, V., & Bock, E. (2008). NCAM-induced intracellular signaling revisited. *Journal of neuroscience research*, 86(4), 727–743.

- Doherty, P., & Walsh, F. S. (1996). CAM-FGF receptor interactions: a model for axonal growth. *Molecular and cellular neurosciences*, 8(2-3), 99–111.
- Doherty, P., Moolenaar, C. E., Ashton, S. V., Michalides, R. J., & Walsh, F. S. (1992). The VASE exon downregulates the neurite growth-promoting activity of NCAM 140. *Nature*, 356(6372), 791–793.
- Edelman, G. M., & Chuong, C. M. (1982). Embryonic to adult conversion of neural cell adhesion molecules in normal and staggerer mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(22), 7036–7040.
- Edenberg, H. J., & Foroud, T. (2013). Genetics and alcoholism. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 10(8), 487–494.
- Erzurumluoglu, A. M., Liu, M., Jackson, V. E., ... Howson, J. M. M. (2020). Meta-analysis of up to 622,409 individuals identifies 40 novel smoking behaviour associated genetic loci. *Molecular psychiatry*, 25(10), 2392–2409.
- Everitt, B. J., Belin, D., Economidou, D., Pelloux, Y., Dalley, J. W., & Robbins, T. W. (2008). Review. Neural mechanisms underlying the vulnerability to develop compulsive drug-seeking habits and addiction. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 363(1507), 3125–3135.
- Fein, G., & Cardenas, V. A. (2015). Neuroplasticity in Human Alcoholism: Studies of Extended Abstinence with Potential Treatment Implications. *Alcohol research : current reviews*, 37(1), 125–141.
- Finne, J., Finne, U., Deagostini-Bazin, H., & Goridis, C. (1983). Occurrence of alpha 2-8 linked polysialosyl units in a neural cell adhesion molecule. *Biochemical and biophysical research communications*, 112(2), 482–487.
- Friedman, N. P., & Miyake, A. (2017). Unity and diversity of executive functions: Individual differences as a window on cognitive structure. *Cortex; a journal devoted to the study of the nervous system and behavior*, 86, 186–204.
- Friedman, N.P., Robbins, T.W. (2022). The role of prefrontal cortex in cognitive control and executive function. *Neuropsychopharmacol.* 47, 72–89.
- Fu, M., & Zuo, Y. (2011). Experience-dependent structural plasticity in the cortex. *Trends in neurosciences*, 34(4), 177–187.
- Fujimoto, I., Bruses, J. L., & Rutishauser, U. (2001). Regulation of cell adhesion by polysialic acid. Effects on cadherin, immunoglobulin cell adhesion molecule, and integrin function and independence from neural cell adhesion molecule binding or signaling activity. *The Journal of biological chemistry*, 276(34), 31745–31751.

- Gaidar, Y. A., Lepekhin, E. A., Sheichetova, G. A., & Witt, M. (1998). Distribution of N-cadherin and NCAM in neurons and endocrine cells of the human embryonic and fetal gastroenteropancreatic system. *Acta histochemica*, 100(1), 83–97.
- Gascon, E., Vutskits, L., & Kiss, J. Z. (2007). Polysialic acid-neural cell adhesion molecule in brain plasticity: from synapses to integration of new neurons. *Brain research reviews*, 56(1), 101–118.
- Goldman-Rakic, P. S. (1995). Cellular basis of working memory. *Neuron*, 14(3), 477–485.
- Hade, A. C., Philips, M. A., Reimann, E., Jagomäe, T., Eskla, K. L., Traks, T., Prans, E., Kõks, S., Vasar, E., & Väli, M. (2021). Chronic Alcohol Use Induces Molecular Genetic Changes in the Dorsomedial Thalamus of People with Alcohol-Related Disorders. *Brain sciences*, 11(4), 435.
- Halaby, D. M., & Mornon, J. P. (1998). The immunoglobulin superfamily: an insight on its tissular, species, and functional diversity. *Journal of molecular evolution*, 46(4), 389–400.
- Hall, A. K., Nelson, R., & Rutishauser, U. (1990). Binding properties of detergent-solubilized NCAM. *The Journal of cell biology*, 110(3), 817–824.
- Hansen, S.M., Berezin, V. & Bock, E. (2008). Signaling mechanisms of neurite outgrowth induced by the cell adhesion molecules NCAM and N-Cadherin. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 3809–3821.
- Harlapur, M., Shimbo, D. (2013). Adhesion Molecules. In: Gellman, M.D., Turner, J.R. (eds) *Encyclopedia of Behavioral Medicine*. Springer, New York, NY.
- Hathaway, W. R., Newton, B. W. (2022). Neuroanatomy, Prefrontal Cortex. In *StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing*.
- He, H. T., Barbet, J., Chaix, J. C., & Goridis, C. (1986). Phosphatidylinositol is involved in the membrane attachment of NCAM-120, the smallest component of the neural cell adhesion molecule. *The EMBO journal*, 5(10), 2489–2494.
- Heilig, M., & Koob, G. F. (2007). A key role for corticotropin-releasing factor in alcohol dependence. *Trends in neurosciences*, 30(8), 399–406.
- Heinz, A., Siessmeier, T., Wrase, J., Hermann, D., ... Bartenstein, P. (2004). Correlation between dopamine D(2) receptors in the ventral striatum and central processing of alcohol cues and craving. *The American journal of psychiatry*, 161(10), 1783–1789.
- Hildebrandt, H., Becker, C., Müräu, M., Gerardy-Schahn, R., & Rahmann, H. (1998). Heterogeneous expression of the polysialyltransferases ST8Sia II and ST8Sia IV during postnatal rat brain development. *Journal of neurochemistry*, 71(6), 2339–2348.

- Hinkle, C. L., Diestel, S., Lieberman, J., & Maness, P. F. (2006). Metalloprotease-induced ectodomain shedding of neural cell adhesion molecule (NCAM). *Journal of neurobiology*, 66(12), 1378–1395.
- Hinsby, A. M., Berezin, V., & Bock, E. (2004). Molecular mechanisms of NCAM function. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 9, 2227–2244.
- Holtmaat, A., Svoboda, K. (2009). Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nat Rev Neurosci* 10, 647–658.
- Hoshi E. (2006). Functional specialization within the dorsolateral prefrontal cortex: a review of anatomical and physiological studies of non-human primates. *Neuroscience research*, 54(2), 73–84.
- Hutcherson, C. A., & Tusche, A. (2022). Evidence accumulation, not 'self-control', explains dorsolateral prefrontal activation during normative choice. *eLife*, 11, e65661.
- Hübschmann, M. V., Skladchikova, G., Bock, E., & Berezin, V. (2005). Neural cell adhesion molecule function is regulated by metalloproteinase-mediated ectodomain release. *Journal of neuroscience research*, 80(6), 826–837.
- Jaako, K., Waniek, A., Parik, K., ... Zharkovsky, A. (2016). Prolyl endopeptidase is involved in the degradation of neural cell adhesion molecules in vitro. *Journal of cell science*, 129(20), 3792–3802.
- Javed, K., Reddy, V., & Lui, F. (2022). Neuroanatomy, Cerebral Cortex. In StatPearls. StatPearls Publishing.
- Jones, D. T., & Graff-Radford, J. (2021). Executive Dysfunction and the Prefrontal Cortex. *Continuum (Minneapolis, Minn.)*, 27(6), 1586–1601.
- Jorgensen, O. S., & Bock, E. (1974). Brain specific synaptosomal membrane proteins demonstrated by crossed immunoelectrophoresis. *Journal of neurochemistry*, 23(4), 879–880.
- Kadmon, G., Kowitz, A., Altevogt, P., & Schachner, M. (1990). Functional cooperation between the neural adhesion molecules L1 and N-CAM is carbohydrate dependent. *The Journal of cell biology*, 110(1), 209–218.
- Kadmon, G., Kowitz, A., Altevogt, P., & Schachner, M. (1990). The neural cell adhesion molecule N-CAM enhances L1-dependent cell-cell interactions. *The Journal of cell biology*, 110(1), 193–208
- Kalus, I., Bormann, U., Mzoughi, M., Schachner, M., & Kleene, R. (2006). Proteolytic cleavage of the neural cell adhesion molecule by ADAM17/TACE is involved in neurite outgrowth. *Journal of neurochemistry*, 98(1), 78–88.

- Karlsson Linnér, R., Biroli, P., Kong, E., ... Beauchamp, J. P. (2019). Genome-wide association analyses of risk tolerance and risky behaviors in over 1 million individuals identify hundreds of loci and shared genetic influences. *Nature genetics*, 51(2), 245–257.
- Kaur, M., Sharma, S., & Kaur, G. (2008). Age-related impairments in neuronal plasticity markers and astrocytic GFAP and their reversal by late-onset short term dietary restriction. *Biogerontology*, 9(6), 441–454.
- Kichaev, G., Bhatia, G., Loh, P. R., Gazal, S., Burch, K., Freund, M. K., Schoech, A., Pasaniuc, B., & Price, A. L. (2019). Leveraging Polygenic Functional Enrichment to Improve GWAS Power. *American journal of human genetics*, 104(1), 65–75.
- Kiryushko, D., Bock, E., & Berezin, V. (2007). Pharmacology of cell adhesion molecules of the nervous system. *Current neuropharmacology*, 5(4), 253–267.
- Kiselyov, V. V., Skladchikova, G., Hinsby, A. M., Jensen, P. H., Kulahin, N., Soroka, V., Pedersen, N., Tsetlin, V., Poulsen, F. M., Berezin, V., & Bock, E. (2003). Structural basis for a direct interaction between FGFR1 and NCAM and evidence for a regulatory role of ATP. *Structure* (London, England: 1993), 11(6),
- Kiselyov, V. V., Soroka, V., Berezin, V., & Bock, E. (2005). Structural biology of NCAM homophilic binding and activation of FGFR. *Journal of neurochemistry*, 94(5), 1169–1179.
- Kleim, J. A., & Jones, T. A. (2008). Principles of experience-dependent neural plasticity: implications for rehabilitation after brain damage. *Journal of speech, language, and hearing research : JSLHR*, 51(1), S225–S239.
- Kolb, B., Mychasiuk, R., Muhammad, A., & Gibb, R. (2013). Brain plasticity in the developing brain. *Progress in brain research*, 207, 35–64.
- Kolkova, K. (2010). Biosynthesis of NCAM. *Advances in experimental medicine and biology*, 663, 213–225.
- Korshunova, I., & Mosevitsky, M. (2010). Role of the growth-associated protein GAP-43 in NCAM-mediated neurite outgrowth. *Advances in experimental medicine and biology*, 663, 169–182.
- Kozak, K., Lucatch, A. M., Lowe, D. J. E., Balodis, I. M., MacKillop, J., & George, T. P. (2019). The neurobiology of impulsivity and substance use disorders: implications for treatment. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1451(1), 71–91.
- Krawczyk, D. C. (2002). Contributions of the prefrontal cortex to the neural basis of human decision making. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 26(6), 631–664.
- Kril, J. J., Halliday, G. M., Svoboda, M. D., & Cartwright, H. (1997). The cerebral cortex is damaged in chronic alcoholics. *Neuroscience*, 79(4), 983–998.

- Kuhn, H. G., Palmer, T. D., & Fuchs, E. (2001). Adult neurogenesis: a compensatory mechanism for neuronal damage. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience*, 251(4), 152–158.
- Lahrtz, F., Horstkorte, R., Cremer, H., Schachner, M., & Montag, D. (1997). VASE-encoded peptide modifies NCAM- and L1-mediated neurite outgrowth. *Journal of neuroscience research*, 50(1), 62–68.
- Langley, O. K., Aletsee-Ufrecht, M. C., Grant, N. J., & Gratzl, M. (1989). Expression of the neural cell adhesion molecule NCAM in endocrine cells. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society*, 37(6), 781–791.
- Leshchyn'ska, I., & Sytnyk, V. (2016). Reciprocal Interactions between Cell Adhesion Molecules of the Immunoglobulin Superfamily and the Cytoskeleton in Neurons. *Frontiers in cell and developmental biology*, 4, 9.
- Li, C. S., Luo, X., Yan, P., Bergquist, K., & Sinha, R. (2009). Altered impulse control in alcohol dependence: neural measures of stop signal performance. *Alcoholism, clinical and experimental research*, 33(4), 740–750.
- Licheri, V., & Brigman, J. L. (2021). Altering Cell-Cell Interaction in Prenatal Alcohol Exposure Models: Insight on Cell-Adhesion Molecules During Brain Development. *Frontiers in molecular neuroscience*, 14, 753537.
- Liedtke, S., Geyer, H., Wuhrer, M., Geyer, R., Frank, G., Gerardy-Schahn, R., Zähringer, U., & Schachner, M. (2001). Characterization of N-glycans from mouse brain neural cell adhesion molecule. *Glycobiology*, 11(5), 373–384.
- Liu, M., Jiang, Y., Wedow, R., ... Vrieze, S. (2019). Association studies of up to 1.2 million individuals yield new insights into the genetic etiology of tobacco and alcohol use. *Nature genetics*, 51(2), 237–244.
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402–408.
- Lyons, G. E., Moore, R., Yahara, O., Buckingham, M. E., & Walsh, F. S. (1992). Expression of NCAM isoforms during skeletal myogenesis in the mouse embryo. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 194(2), 94–104.
- Makris, N., Oscar-Berman, M., Jaffin, S. K., Hodge, S. M., Kennedy, D. N., Caviness, V. S., Marinkovic, K., Breiter, H. C., Gasic, G. P., & Harris, G. J. (2008). Decreased volume of the brain reward system in alcoholism. *Biological psychiatry*, 64(3), 192–202.

- Maness, P., Schachner, M. (2007). Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration. *Nat Neurosci* 10, 19–26.
- Mao, X., Schwend, T., & Conrad, G. W. (2012). Expression and localization of neural cell adhesion molecule and polysialic acid during chick corneal development. *Investigative ophthalmology & visual science*, 53(3), 1234–1243.
- Mayfield, R. D., Harris, R. A., & Schuckit, M. A. (2008). Genetic factors influencing alcohol dependence. *British journal of pharmacology*, 154(2), 275–287.
- Miguel-Hidalgo, J. J., Overholser, J. C., Meltzer, H. Y., Stockmeier, C. A., & Rajkowska, G. (2006). Reduced glial and neuronal packing density in the orbitofrontal cortex in alcohol dependence and its relationship with suicide and duration of alcohol dependence. *Alcoholism, clinical and experimental research*, 30(11), 1845–1855.
- Miguel-Hidalgo, J. J., Wei, J., Andrew, M., Overholser, J. C., Jurjus, G., Stockmeier, C. A., & Rajkowska, G. (2002). Glia pathology in the prefrontal cortex in alcohol dependence with and without depressive symptoms. *Biological psychiatry*, 52(12), 1121–1133.
- Miller, E. K., & Cohen, J. D. (2001). An integrative theory of prefrontal cortex function. *Annual review of neuroscience*, 24, 167–202.
- Miller, G. A., Galanter, E., & Pribram, K. H. (1960). *Plans and the structure of behavior*. Holt, Rinehart and Winston, Inc.
- Miller, M. W., & Luo, J. (2002). Effects of ethanol and transforming growth factor beta (TGF beta) on neuronal proliferation and nCAM expression. *Alcoholism, clinical and experimental research*, 26(8), 1281–1285.
- Miller, W. R. (1995). Loss of Control Drinking In Alcoholics. *Alcohol health and research world*, 19(1), 36–37.
- Miñana, R., Climent, E., Baretino, D., Segui, J. M., Renau-Piqueras, J., & Guerri, C. (2000). Alcohol exposure alters the expression pattern of neural cell adhesion molecules during brain development. *Journal of neurochemistry*, 75(3), 954–964.
- Moeller, F. & Dougherty, Donald. (2002). Impulsivity and Substance Abuse: What Is the Connection?. *Addictive Disorders & Their Treatment*. 1. 3-10.
- Moore, S. E., Thompson, J., Kirkness, V., Dickson, J. G., & Walsh, F. S. (1987). Skeletal muscle neural cell adhesion molecule (N-CAM): changes in protein and mRNA species during myogenesis of muscle cell lines. *The Journal of cell biology*, 105(3), 1377–1386.
- Morecraft, R. J., & Yeterian, E. H. (2002). Prefrontal cortex. *Encyclopedia of the Human Brain*. Academic Press, 11-26.

- Most, D., Ferguson, L., & Harris, R. A. (2014). Molecular basis of alcoholism. *Handbook of clinical neurology*, 125, 89–111.
- Muller, D., Stoppini, L., Wang, C., & Kiss, J. Z. (1994). A role for polysialylated neural cell adhesion molecule in lesion-induced sprouting in hippocampal organotypic cultures. *Neuroscience*, 61(3), 441–445.
- Muller, D., Wang, C., Skibo, G., Toni, N., Cremer, H., Calaora, V., Rougon, G., & Kiss, J. Z. (1996). PSA-NCAM is required for activity-induced synaptic plasticity. *Neuron*, 17(3), 413–422.
- Murray, H. C., Low, V. F., Swanson, M. E., Dieriks, B. V., Turner, C., Faull, R. L., & Curtis, M. A. (2016). Distribution of PSA-NCAM in normal, Alzheimer's and Parkinson's disease human brain. *Neuroscience*, 330, 359–375.
- Narendran, R., Mason, N. S., Paris, J., Himes, M. L., Douaihy, A. B., & Frankle, W. G. (2014). Decreased prefrontal cortical dopamine transmission in alcoholism. *The American journal of psychiatry*, 171(8), 881–888.
- Nederveen, J. P., Fortino, S. A., Baker, J. M., Snijders, T., Joannisse, S., McGlory, C., McKay, B. R., Kumbhare, D., & Parise, G. (2019). Consistent expression pattern of myogenic regulatory factors in whole muscle and isolated human muscle satellite cells after eccentric contractions in humans. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 127(5), 1419–1426.
- Nelson, J. (2016). *The Development of a Human Operator Informatic Model (HOIM) incorporating the Effects of Non-Invasive Brain Stimulation on Information Processing while performing Multi-Attribute Task Battery (MATB)*.
- Nguyen, C., Mattei, M. G., Mattei, J. F., Santoni, M. J., Goridis, C., & Jordan, B. R. (1986). Localization of the human NCAM gene to band q23 of chromosome 11: the third gene coding for a cell interaction molecule mapped to the distal portion of the long arm of chromosome 11. *The Journal of cell biology*, 102(3), 711–715.
- Ní Dhúill, C. M., Fox, G. B., Pittock, S. J., O'Connell, A. W., Murphy, K. J., & Regan, C. M. (1999). Polysialylated neural cell adhesion molecule expression in the dentate gyrus of the human hippocampal formation from infancy to old age. *Journal of neuroscience research*, 55(1), 99–106.
- Olsen, M., Krog, L., Edvardsen, K., Skovgaard, L. T., & Bock, E. (1993). Intact transmembrane isoforms of the neural cell adhesion molecule are released from the plasma membrane. *The Biochemical journal*, 295 (Pt 3)(Pt 3), 833–840.

- Oscar-Berman, M., Shagrin, B., Evert, D. L., & Epstein, C. (1997). Impairments of brain and behavior: the neurological effects of alcohol. *Alcohol health and research world*, 21(1), 65–75.
- Paratcha, G., Ledda, F., & Ibáñez, C. F. (2003). The neural cell adhesion molecule NCAM is an alternative signaling receptor for GDNF family ligands. *Cell*, 113(7), 867–879.
- Park, S. Q., Kahnt, T., Beck, A., Cohen, M. X., Dolan, R. J., Wrase, J., & Heinz, A. (2010). Prefrontal cortex fails to learn from reward prediction errors in alcohol dependence. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(22), 7749–7753.
- Parry, C., Rehm, J., Poznyak, V., & Room, R. (2009). Alcohol and infectious diseases: an overlooked causal linkage?. *Addiction (Abingdon, England)*, 104(3), 331–332.
- Pasman, J. A., Demange, P. A., Guloksuz, S., ... Vink, J. M. (2022). Genetic Risk for Smoking: Disentangling Interplay Between Genes and Socioeconomic Status. *Behavior genetics*, 52(2), 92–107.
- Pasman, J. A., Verweij, K. J. H., Gerring, Z., ... Vink, J. M. (2018). GWAS of lifetime cannabis use reveals new risk loci, genetic overlap with psychiatric traits, and a causal influence of schizophrenia. *Nature neuroscience*, 21(9), 1161–1170.
- Piano M. R. (2017). Alcohol's Effects on the Cardiovascular System. *Alcohol research: current reviews*, 38(2), 219–241.
- Pillai-Nair, N., Panicker, A. K., Rodriguiz, R. M., Gilmore, K. L., Demyanenko, G. P., Huang, J. Z., Wetsel, W. C., & Maness, P. F. (2005). Neural cell adhesion molecule-secreting transgenic mice display abnormalities in GABAergic interneurons and alterations in behavior. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(18), 4659–4671.
- Ponomarev, I., Wang, S., Zhang, L., Harris, R. A., & Mayfield, R. D. (2012). Gene coexpression networks in human brain identify epigenetic modifications in alcohol dependence. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 32(5), 1884–1897.
- Povlsen, G. K., Berezin, V., & Bock, E. (2008). Neural cell adhesion molecule-180-mediated homophilic binding induces epidermal growth factor receptor (EGFR) down-regulation and uncouples the inhibitory function of EGFR in neurite outgrowth. *Journal of neurochemistry*, 104(3), 624–639.
- Probstmeier, R., Kühn, K., & Schachner, M. (1989). Binding properties of the neural cell adhesion molecule to different components of the extracellular matrix. *Journal of neurochemistry*, 53(6), 1794–1801.

Quartu, M., Serra, M.P., Boi, M., Ibba, V., Melis, T., & Del Fiacco, M. (2008). Polysialylated-neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM) in the human trigeminal ganglion and brainstem at prenatal and adult ages. *BMC Neurosci* 9, 108.

Rao, Y., Wu, X. F., Garipey, J., Rutishauser, U., & Siu, C. H. (1992). Identification of a peptide sequence involved in homophilic binding in the neural cell adhesion molecule NCAM. *The Journal of cell biology*, 118(4), 937–949.

Rehm J. (2011). The risks associated with alcohol use and alcoholism. *Alcohol research & health: the journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*, 34(2), 135–143.

Rehm, J., Baliunas, D., Borges, G. L., ...Taylor, B. (2010). The relation between different dimensions of alcohol consumption and burden of disease: an overview. *Addiction (Abingdon, England)*, 105(5), 817–843.

Reich, T., Edenberg, H. J., Goate, ... Begleiter, H. (1998). Genome-wide search for genes affecting the risk for alcohol dependence. *American journal of medical genetics*, 81(3), 207–215.

Reyes, A. A., Small, S. J., & Akeson, R. (1991). At least 27 alternatively spliced forms of the neural cell adhesion molecule mRNA are expressed during rat heart development. *Molecular and cellular biology*, 11(3), 1654–1661.

Reynolds, L. M., & Flores, C. (2021). Mesocorticolimbic Dopamine Pathways Across Adolescence: Diversity in Development. *Frontiers in neural circuits*, 15, 735625.

Rosenbloom, M. J., Pfefferbaum, A., & Sullivan, E. V. (1995). Structural Brain Alterations Associated With Alcoholism. *Alcohol health and research world*, 19(4), 266–272.

Ruocco, A. C., Rodrigo, A. H., Lam, J., Di Domenico, S. I., Graves, B., & Ayaz, H. (2014). A problem-solving task specialized for functional neuroimaging: validation of the Scarborough adaptation of the Tower of London (S-TOL) using near-infrared spectroscopy. *Frontiers in human neuroscience*, 8, 185.

Saini, V., Kaur, T., Kalotra, S., & Kaur, G. (2020). The neuroplasticity marker PSA-NCAM: Insights into new therapeutic avenues for promoting neuroregeneration. *Pharmacological research*, 160, 105186.

Salinas, A. G., Mateo, Y., Carlson, V. C. C., Stinnett, G. S., Luo, G., Seasholtz, A. F., Grant, K. A., & Lovinger, D. M. (2021). Long-term alcohol consumption alters dorsal striatal dopamine release and regulation by D2 dopamine receptors in rhesus macaques. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 46(8), 1432–1441.

- Sandig, M., Rao, Y., & Siu, C. H. (1994). The homophilic binding site of the neural cell adhesion molecule NCAM is directly involved in promoting neurite outgrowth from cultured neural retinal cells. *The Journal of biological chemistry*, 269(20), 14841–14848.
- Santoni, M. J., Barthels, D., Vopper, G., Boned, A., Goridis, C., & Wille, W. (1989). Differential exon usage involving an unusual splicing mechanism generates at least eight types of NCAM cDNA in mouse brain. *The EMBO journal*, 8(2), 385–392.
- Saunders, G. R. B., Wang, X., Chen, F., ... Vrieze, S. (2022). Genetic diversity fuels gene discovery for tobacco and alcohol use. *Nature*, 612(7941), 720–724.
- Schmid, R. S., & Maness, P. F. (2008). L1 and NCAM adhesion molecules as signaling coreceptors in neuronal migration and process outgrowth. *Current opinion in neurobiology*, 18(3), 245–250.
- Schoeler, T., Speed, D., Porcu, E., Pirastu, N., Pingault, J. B., & Kutalik, Z. (2023). Participation bias in the UK Biobank distorts genetic associations and downstream analyses. *Nature human behaviour*, 10.1038/s41562-023-01579-9. Advance online publication.
- Secher, T. (2010). Soluble NCAM. In: Berezin, V. (eds) *Structure and Function of the Neural Cell Adhesion Molecule NCAM*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 663. Springer, New York, NY.
- Seidenfaden, R., Gerardy-Schahn, R., & Hildebrandt, H. (2000). Control of NCAM polysialylation by the differential expression of polysialyltransferases ST8SiaII and ST8SiaIV. *European journal of cell biology*, 79(10), 680–688.
- Seki, T., & Arai, Y. (1993). Distribution and possible roles of the highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) in the developing and adult central nervous system. *Neuroscience research*, 17(4), 265–290.
- Senkov, O., Tikhobrazova, O., & Dityatev, A. (2012). PSA-NCAM: synaptic functions mediated by its interactions with proteoglycans and glutamate receptors. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 44(4), 591–595.
- Shapiro, L., Love, J., & Colman, D. R. (2007). Adhesion molecules in the nervous system: structural insights into function and diversity. *Annual review of neuroscience*, 30, 451–474.
- Shin, S. H., Hong, H. G., & Jeon, S. M. (2012). Personality and alcohol use: the role of impulsivity. *Addictive behaviors*, 37(1), 102–107.
- Skladchikova, G., Ronn, L. C., Berezin, V., & Bock, E. (1999). Extracellular adenosine triphosphate affects neural cell adhesion molecule (NCAM)-mediated cell adhesion and neurite outgrowth. *Journal of neuroscience research*, 57(2), 207–218.

Small, S. J., & Akeson, R. (1990). Expression of the unique NCAM VASE exon is independently regulated in distinct tissues during development. *The Journal of cell biology*, 111(5 Pt 1), 2089–2096.

Soares-Cunha, C., Coimbra, B., David-Pereira, A., Borges, S., Pinto, L., Costa, P., Sousa, N., & Rodrigues, A. J. (2016). Activation of D2 dopamine receptor-expressing neurons in the nucleus accumbens increases motivation. *Nature communications*, 7, 11829.

Sorkhou, M., Stogios, N., Sayrafizadeh, N., Hahn, M. K., Agarwal, S. M., & George, T. P. (2022). Non-invasive neuromodulation of dorsolateral prefrontal cortex to reduce craving in alcohol use disorder: A meta-analysis. *Drug and alcohol dependence reports*, 4, 100076.

Stringer, S., Minică, C. C., Verweij, K. J., ... Vink, J. M. (2016). Genome-wide association study of lifetime cannabis use based on a large meta-analytic sample of 32 330 subjects from the International Cannabis Consortium. *Translational psychiatry*, 6(3), e769.

Sullivan, E.V., Pfefferbaum, A. (2005). Neurocircuitry in alcoholism: a substrate of disruption and repair. *Psychopharmacology* 180, 583–594.

Sunshine, J., Balak, K., Rutishauser, U., & Jacobson, M. (1987). Changes in neural cell adhesion molecule (NCAM) structure during vertebrate neural development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(16), 5986–5990.

Sussman, S., & Sussman, A. N. (2011). Considering the definition of addiction. *International journal of environmental research and public health*, 8(10), 4025–4038.

Zhong, X., Drgonova, J., Li, C. Y., & Uhl, G. R. (2015). Human cell adhesion molecules: annotated functional subtypes and overrepresentation of addiction-associated genes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1349(1), 83–95.

Zilles, K. (1992). Neuronal plasticity as an adaptive property of the central nervous system. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger: official organ of the Anatomische Gesellschaft*, 174(5), 383–391.

Tan, R. P. A., Leshchyn'ska, I., & Sytnyk, V. (2017). Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Immunoglobulin Superfamily Cell Adhesion Molecules and Their Role in Neuronal Development and Synapse Regulation. *Frontiers in molecular neuroscience*, 10, 378.

Thiery, J. P., Brackenbury, R., Rutishauser, U., & Edelman, G. M. (1977). Adhesion among neural cells of the chick embryo. II. Purification and characterization of a cell adhesion molecule from neural retina. *The Journal of biological chemistry*, 252(19), 6841–6845.

Thompson, J., Dickson, G., Moore, S. E., Gower, H. J., Putt, W., Kenimer, J. G., Barton, C. H., & Walsh, F. S. (1989). Alternative splicing of the neural cell adhesion molecule gene generates variant extracellular domain structure in skeletal muscle and brain. *Genes & development*, 3(3), 348–357.

- Wai Wong, C., Dye, D. E., & Coombe, D. R. (2012). The role of immunoglobulin superfamily cell adhesion molecules in cancer metastasis. *International journal of cell biology*, 2012, 340296.
- Walsh, F. S., Parekh, R. B., Moore, S. E., Dickson, G., Barton, C. H., Gower, H. J., Dwek, R. A., & Rademacher, T. W. (1989). Tissue specific O-linked glycosylation of the neural cell adhesion molecule (N-CAM). *Development (Cambridge, England)*, 105(4), 803–811.
- Varoqueaux, F. & Brose, N. (2002). Synaptogenesis. *Encyclopedia of the Human Brain*. Academic Press, 531-544,
- Varul, J., Eskla, K. L., Piirsalu, M., Innos, J., Philips, M. A., Visnapuu, T., Plaas, M., & Vasar, E. (2021). Dopamine System, NMDA Receptor and EGF Family Expressions in Brain Structures of B16 and 129Sv Strains Displaying Different Behavioral Adaptation. *Brain sciences*, 11(6), 725.
- Weinhold, B., Seidenfaden, R., Röckle, I., Mühlenhoff, M., Schertzinger, F., Conzelmann, S., Marth, J. D., Gerardy-Schahn, R., & Hildebrandt, H. (2005). Genetic ablation of polysialic acid causes severe neurodevelopmental defects rescued by deletion of the neural cell adhesion molecule. *The Journal of biological chemistry*, 280(52), 42971–42977.
- Westphal, D., Sytnyk, V., Schachner, M., & Leshchyn'ska, I. (2010). Clustering of the neural cell adhesion molecule (NCAM) at the neuronal cell surface induces caspase-8- and -3-dependent changes of the spectrin meshwork required for NCAM-mediated neurite outgrowth. *The Journal of biological chemistry*, 285(53), 42046–42057.
- Wielgat, P., & Braszko, J. J. (2012). Significance of the cell adhesion molecules and sialic acid in neurodegeneration. *Advances in medical sciences*, 57(1), 23–30.
- Williams, E. J., Furness, J., Walsh, F. S., & Doherty, P. (1994). Activation of the FGF receptor underlies neurite outgrowth stimulated by L1, N-CAM, and N-cadherin. *Neuron*, 13(3), 583–594.
- Volkow, N. D., Wang, G. J., Telang, F., Fowler, J. S., Logan, J., Jayne, M., Ma, Y., Pradhan, K., & Wong, C. (2007). Profound decreases in dopamine release in striatum in detoxified alcoholics: possible orbitofrontal involvement. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(46), 12700–12706.
- Volkow, N. D., Wang, G. J., Tomasi, D., & Baler, R. D. (2013). Unbalanced neuronal circuits in addiction. *Current opinion in neurobiology*, 23(4), 639–648.
- Von Der Ohe, M., Wheeler, S. F., Wuhler, M., Harvey, D. J., Liedtke, S., Mühlenhoff, M., Gerardy-Schahn, R., Geyer, H., Dwek, R. A., Geyer, R., Wing, D. R., & Schachner, M. (2002). Localization and characterization of polysialic acid-containing N-linked glycans from bovine NCAM. *Glycobiology*, 12(1), 47–63.

- Wootton, R. E., Richmond, R. C., Stuijzand, B. G., ... Munafò, M. R. (2020). Evidence for causal effects of lifetime smoking on risk for depression and schizophrenia: a Mendelian randomisation study. *Psychological medicine*, 50(14), 2435–2443.
- World Health Organization. (2018). *Global status report on alcohol and health 2018*. World Health Organization. Geneva: World Health Organization.
- Xu, K., Li, B., McGinnis, K. A., ... VA Million Veteran Program (2020). Genome-wide association study of smoking trajectory and meta-analysis of smoking status in 842,000 individuals. *Nature communications*, 11(1), 5302.
- Yamagata, T., Nakayama, Y., Tanji, J., & Hoshi, E. (2012). Distinct information representation and processing for goal-directed behavior in the dorsolateral and ventrolateral prefrontal cortex and the dorsal premotor cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 32(37), 12934–12949.
- Yang, B. Z., Kranzler, H. R., Zhao, H., Gruen, J. R., Luo, X., & Gelernter, J. (2007). Association of haplotypic variants in DRD2, ANKK1, TTC12 and NCAM1 to alcohol dependence in independent case control and family samples. *Human molecular genetics*, 16(23), 2844–2853.
- Yap, E. H., Rosche, T., Almo, S., & Fiser, A. (2014). Functional clustering of immunoglobulin superfamily proteins with protein-protein interaction information calibrated hidden Markov model sequence profiles. *Journal of molecular biology*, 426(4), 945–961.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

NHGRI-EBI ülegenoomsete assotsiatsiooniuringute (GWAS) kataloog. Vaadatud 24.04.2023. <https://www.ebi.ac.uk/gwas/>

World Health Organization. (2022). 6C40.2 Alcohol dependence. In International Classification of Diseases, Eleventh Revision (ICD-11). Vaadatud 28.03.2023. <https://icd.who.int/browse11/l-m/en#/http%3a%2f%2fid.who.int%2fid%2fentity%2f1580466>

198

LISAD

LISA 1. Tabel GWAS kataloogist kogutud andmetega. Sõltuvust tekitavate ainete tarbimise ja riskikäitumisega seotud SNP-d inimese *NCAM1* geeni lookuses (11q23.2).

SNP ID	Positsioon genoomis GRCh38	Fenotüüp	P-väärtus	Valimi suurus	Viide
rs1447463	112857617	Suitsetamine	2×10^{-12}	2669029	Saunders <i>et al.</i> , 2022
rs7115027	112896664	Suitsetamine	4×10^{-9}	518633	Karlsson Linnér <i>et al.</i> , 2019
rs7948789	112968810	Suitsetamine	6×10^{-27}	433216	Brazel <i>et al.</i> , 2019
rs1447481	112917749	Suitsetamine	5×10^{-18}	283749	Schoeler <i>et al.</i> , 2023
rs7110863	112972416	Suitsetamine	2×10^{-35}	842717	Xu <i>et al.</i> , 2020
rs2186709	112972894	Suitsetamine	2×10^{-24}	931815	Liu <i>et al.</i> , 2019
rs1940728	112981473	Alkoholi tarbimine	2×10^{-23}	2965643	Saunders <i>et al.</i> , 2022
rs2155290	112980346	Riskikäitumin e	4×10^{-24}	315894	Karlsson Linnér <i>et al.</i> , 2019
rs2155290	112980346	Riskikäitumin e	5×10^{-11}	370711	Karlsson Linnér <i>et al.</i> , 2019
rs1940729	112981470	Alkoholi tarbimine	1×10^{-20}	2965643	Saunders <i>et al.</i> , 2022
rs1940728	112981473	Alkoholi tarbimine	3×10^{-14}	1039210	Liu <i>et al.</i> , 2019
rs2155290	112980346	Suitsetamine	9×10^{-36}	336066	Cai <i>et al.</i> , 2020
rs1940720	112986480	Suitsetamine	5×10^{-164}	3382012	Saunders <i>et al.</i> , 2022
rs4144892	112995734	Suitsetamine	7×10^{-25}	622409	Erzurumluoglu <i>et al.</i> , 2020
rs10891487	112998332	Suitsetamine	1×10^{-46}	499738	Pasman <i>et al.</i> , 2022
rs1940701	112998682	Opioidide	1×10^{-9}	639063	Deak <i>et al.</i> , 2022

		tarvitamine			
rs9919670	113006582	Suitsetamine	8×10^{-27}	462690	Wootton <i>et al.</i> , 2020
rs9919557	113006686	Kanepi tarvitamine	1×10^{-10}	184765	Pasman <i>et al.</i> , 2018
rs9919558	113006687	Riskikäitumine	3×10^{-29}	1506537	Baselmans <i>et al.</i> , 2021
rs7943198	113011457	Alkoholi tarbimine	2×10^{-18}	2428851	Saunders <i>et al.</i> , 2022
rs7935745	113036082	Suitsetamine	9×10^{-180}	3382012	Saunders <i>et al.</i> , 2022
rs7938812	113040282	Suitsetamine	7×10^{-48}	518633	Karlsson Linnér <i>et al.</i> , 2019
rs2155646	113042089	Suitsetamine	2×10^{-43}	458000	Kichaev <i>et al.</i> , 2019
rs5794844	113089378	Suitsetamine	8×10^{-31}	2669029	Saunders <i>et al.</i> , 2022
rs4471463	113112873	Kanepi tarvitamine	9×10^{-7}	32330	Stringer <i>et al.</i> , 2016
rs78239456	113113769	Suitsetamine	9×10^{-12}	1232091	Liu <i>et al.</i> , 2019
rs61902492	113121199	Suitsetamine	3×10^{-9}	518633	Karlsson Linnér <i>et al.</i> , 2019
rs4937993	113133940	Suitsetamine	4×10^{-57}	2669029	Saunders <i>et al.</i> , 2022

LIHTLITSENTS

Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Mirjam Kask

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „Neuraalse raku adhesioonimolekuli NCAM1 osalus alkoholisõltuvuse tekkes”,

mille juhendajad on Mari-Anne Philips ja Signe Värvi,

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

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

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

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

Mirjam Kask

29.05.2023