

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

MEDITSIINITEADUSTE VALDKOND

BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT

Maria Piirsalu

**Lsamp geeni/valgu roll täiskasvanud hiire hipokampaalses
neurogeneesis**

Magistritöö (30 EAP)

Juhendajad: PhD Kersti Lilleväli

PhD Tambet Tõnissoo

Tartu 2016

Lsamp geeni/valgu roll täiskasvanud hiire hipokampaalses neurogeneesis

Limbilise süsteemiga seotud membraanvalku kodeeriva geeni (*Lsamp*) polümorfisme seostatakse ärevus- ning psühhiaatriliste häiretega. Varasemad katselooma ja in vitro uuringud viitavad seostele LSAMP valgu ja närvisüsteemi plastilisuse vahel. Plastilisusele viitab kõrgenenud *Lsamp* ekspressiooni tase rikastatud keskkonnas elavate hiirte hipokampuses. Lisaks sellele on *Lsamp* osutunud paljude vähitüüpide puhul tuumor-supressorgeeniks.

Käesolevas magistritöös uuriti LSAMP valgu võimalikku osalust hipokampaalses neurogeneesis. Katse tulemused näitavad, et rikastatud keskkonnas elavatel *Lsamp*-puudulikkusega hiirtel on hammaskäärus rohkem uusi neuroneid kui nende metsiktüüpi pesakonnakaaslastel.

Märksõnad: *Lsamp*, neurogenees, hipokampus, rikastatud keskkond

CERCS eriala: B470 Füsioloogia

The role of Lsamp gene/protein in adult mouse hippocampal neurogenesis

Polymorphisms in Limbic system associated membrane protein (*Lsamp*) has been associated with neuropsychiatric disorders. Recent publications have shown that *Lsamp* is involved in synaptogenesis in the hippocampal neurons, indicating its role in plasticity. Furthermore, environmental enrichment enhances the expression level of *Lsamp* in the hippocampus. In addition, *Lsamp* has been identified as tumor-suppressor in several types of cancer.

Here we studied the putative role of LSAMP protein in hippocampal neurogenesis. Our results show that *Lsamp*-deficient mice living in enriched environment have induced generation of the new neurons in the *dentate gyrus* compared to wt mice.

Keywords: *Lsamp*, neurogenesis, hippocampus, environmental enrichment

CERCS code: B470 Physiology

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS.....	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	8
1.1 Neurogenees sünnieelsel perioodil	8
1.2 Neurogenees täiskasvanu ajus.....	9
1.2.1 Hipokampuse ehitus	9
1.2.2 Hipokampuses toimuv neurogenees	11
1.2.3 Külgvatsakese seinas toimuv neurogenees	13
1.3 Adhesioonimolekulide osalus neurogeneesis	14
1.3.1 IgLON valguperekond	15
1.3.2 <i>Lsamp</i> geeni ja valgu üldine iseloomustus.....	15
1.3.3 <i>Lsamp</i> -puudulikkusega hiired	18
1.4 Rikastatud keskkonna mõju näriliste neuraalsele arengule	18
2. EKSPERIMENTAALNE OSA.....	20
2.1 Töö eesmärk	20
2.2 Materjal ja meetodika.....	20
2.2.1 Katseloomad ja nende majutus.....	20
2.2.2 BrdU lahuste valmistamine ja süstimine	21
2.2.3 Perfuseerimine ja ajude eraldamine.....	22
2.2.4 Külmlõikude valmistamine ja BrdU detekteerimine	22
2.2.5 Immunohistokeemia	23
2.2.6 Mikroskoopia ja rakkude lugemine	24
2.2.7 Andmeanalüüs.....	24
2.3 Tulemused.....	25
2.3.1 <i>Wt</i> ja <i>Lsamp</i> -puudulikkusega hiirte neurogeneesi baastase.....	25
2.3.2 Rikastatud keskkonna mõju <i>wt</i> ja <i>Lsamp</i> -puudulikkusega hiirte neurogeneesile...	26
2.3.3 Neuroblastide paiknemine ja tihedus <i>wt</i> ja <i>Lsamp</i> <i>-/-</i> hiirte hipokampuses	28
2.3.4 Standard- ja rikastatud keskkonnas elavate hiirte kehakaal.....	29
2.4 Arutelu.....	30

KOKKUVÕTE.....	32
SUMMARY.....	33
TÄNUAVALDUSED	35
KIRJANDUSE LOETELU.....	36
Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks	43

KASUTATUD LÜHENDID

- BDNF - tserebraalne neurotroofne faktor (*brain-derived neurotrophic factor*)
- BrdU – bromodesoksüüridiin (*bromodeoxyuridine*)
- CA – *cornu ammonis*
- CAM - raku adhesioonimolekul (*cell adhesion molecule*)
- DAB - 3,3'-diaminobensidiin
- DCX – doublecortin
- DG – hammaskäär (*dentate gyrus*)
- EC – entorinaalkoor (*entorhinal cortex*)
- GPI – glükosüülfosfatidüül inositol (*glycosylphosphatidylinositol*)
- GZ – sõmerrakkude kiht (*granular zone*)
- IgSF – immunoglobuliini superperekkond (*immunoglobulin superfamily*)
- KNS – kesknärvisüsteem
- LGE – lateraalne ganglionikõrgendik (*lateral ganglionic eminence*)
- Lsamp* – hiire limbilise süsteemiga seotud membraanvalku kodeeriv geen
- LSAMP – limbilise süsteemiga seotud membraanvalk (*limbic-system associated membrane protein*)
- LTP – sünapsi pikaajaline potentseerimine (*long-term potentiation*)
- LV - külgmise vatsake (*lateral ventricle*)
- MF – sammalkiud (*mossy fiber*)
- MGE – mediaalne ganglionikõrgendik (*medial ganglionic eminence*)
- Negr1 - neuronaalne kasvuregulaator 1 (*neuronal growth regulator 1*)
- NGF – närvikasvufaktor (*nerve growth factor*)
- NLS-LacZ-Neo - tuumalokalisatsiooni signaali/ β -galaktosidaasi/neomütsiini liitgeen
- NTM - neurotrimiin
- OPCML – opioide siduv raku adhesioonimolekul (*opoid-binding protein/cell adhesion molecule-like*)
- pHH3 – fosfo-histoon H3 (*phospho-histone H3*)
- RMS – rostraalne migratsioonivoog (*rostral migratory stream*)
- SEM – standardviga (*standard error of the mean*)
- SGZ – subgranulaartsoon (*subgranular zone*)
- SVZ – subventrikulaartsoon (*subventricular zone*)
- TA-rakud – üleminekurakud (*transient amplifying cells*)
- wt – C57BL/6 ja 129S6/SvEvTac geneetilise taustaga hiireliin (*wild type*)

SISSEJUHATUS

Neurogenees on protsess, kus närvisüsteemi tüvirakkudest toodetakse juurde uusi närvirakke. Primaarne neurogenees vastutab kasvava aju neuronitega varustamise eest ning toimub suures osas sünnieelsel perioodil. Aastakümneid püsis arvamus, mille kohaselt kesknärvisüsteemis toodetakse neuroneid prenataalsel perioodil ning uusi närvirakke hilisema elu jooksul juurde ei teki. 1960ndatel aastatel läbiviidud uuringud näitasid esmakordselt, et täiskasvanud imetaja ajus tekivad uued neuronid ning alles kolm aastakümnet hiljem, täpsemate uurimismeetodite välja töötamisel kummutati dogma, mille kohaselt imetajate neurogenees toimub vaid sünnieelse arengu käigus. Täiskasvanud imetaja kesknärvisüsteemis (KNS) toimub neurogenees külgvatsakest katvas subventrikulaartsoonis (SVZ) ja hipokampuse hammaskäärus subgranulaartsoonis (SGZ) (Kempermann ja Cage, 2000).

Täiskasvanu neurogenees hipokampuses tagab neuraalse plastilisuse ning aitab kohaneda pidevalt muutuv keskkonnas (Freund jt, 2013). Keskkonna mitmekesisus (rikastatud keskkond) võimendab hiirel hipokampuses toimuvat neurogeneesi (van Praag jt, 2000). Uute neuronite juurdekasv peale ajukahjustust on oluliseks füsioloogiliseks eelduseks taastumisprotsessidele (Raymont ja Grafman, 2006). Neurogeneesi molekulaarsete mehhanismide mõistmine aitab leida uusi ja efektiivsemaid ravivõimalusi aju patoloogiatele.

Adhesioon on närvisüsteemis oluline rakkude omavahelisel interakteerumisel ja rakuvälise keskkonnaga suhtlemisel, mille kaudu säilitatakse närvikoe terviklikkus ja funktsioon. Üheks oluliseks adhesioonimolekulide perekonnaks närvisüsteemis on immunoglobuliinide superperekond, kuhu kuulub IgLON valguperekond. IgLON perekonna adhesioonimolekulid on olulised just eelkõige närvisüsteemis. Näiteks osaleb IgLON perekonda kuuluv LSAMP valg aksonite kasvu suunamises ning indutseerib hipokampuses neuronite vahelist sünapsite moodustumist, viidates LSAMP valg seosele närvisüsteemi plastilisusega (Hashimoto jt, 2009). Lisaks on näidatud, et *Lsmp* valg puudumine viib sünaptilise ülekande muutustele ja kahjustab närvisüsteemi plastilisust täiskasvanud hiire hipokampuses (Qiu jt, 2010). Tartu Ülikooli Füsioloogia instituudis on varem näidatud, et *Lsmp* geeni ekspressiooni tase hipokampuses tõuseb oluliselt hiirtel, kes elavad rikastatud keskkonnas (Heinla jt, 2015).

Käesolev magistritöö kirjanduslik osa annab ülevaate neurogeneesist, *Lsmp* geenist ja valgust ning rikastatud keskkonna mõjust näriliste neuraalsele arengule. Eksperimentaalses osas analüüsitakse *Lsmp* geeni osalust neurogeneesis.

Antud töös läbi viidud eksperimentaalne osa teostati Tartu Ülikooli Meditsiiniteaduste valdkonna Bio- ja siirdemeditsiini instituudi füsioloogia osakonnas.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Neurogenees sünnieelsel perioodil

Selgroogsete närvisüsteem saab alguse selgmisest ektodermist, millest kujuneb neuraalplaat. Neurulatsiooni käigus voltub neuraalplaat neuraalvaoks ning hiljem sulgub neuraaloruks (Gilbert, S.F., 2014).

Neuraalorust areneb kogu kesknärvisüsteem (KNS) – anterioorsest osast areneb peaaegu ning posterioorne osa annab aluse seljaajule. Neuraaloru anterioorne osa laieneb ning tekivad ajupõiekesed. Esialgu eristub kolm primaarset ajupõiekest: eesajupõis, keskajupõis ja tagaajupõis (rombaju). Primaarsetest ajupõiekestest kujunevad välja viis sekundaarset ajupõiekest – eesaju jaguneb otsajuks ja vaheajuks, keskajupõiest kujuneb keskaju ning rombajust moodustuvad tagaaju ja piklikaju (Squire, 2008; Kaufman, 1994).

Neuraaloru on algselt ühekihiline neuroepiteel, kus rakud aktiivselt jagunevad (hilisem ventrikulaartsoon). Ventrikulaartsoonist välja migreeruvatest rakkudest tekivad kõik ajustruktuurid. Vahe-etapina võib märkida sekundaarseid jagunemistsoone – subventrikulaarkihti (SVZ) eesaju külgevatsakese seinas ning välimine granulaarrakkude kiht arenevas väikeajus (Hatten, 1999).

Esmalt toimub neuroepiteeli rakkude sümmeetriline jagunemine, mille eesmärgiks on suurendada neuraalsete eellasrakkude populatsiooni. Seejärel tekivad neuroepiteeli rakkudest radiaalglia rakud, mis on vajalikud arenevate neuronite migratsioonil (Bultje, 2009). Radiaalglia on bipolaarse morfoloogiaga, kus üks jätke on ühenduses neuraaloru sisemise osa ventrikulaartsooniga ning teine jätke ulatub neuraalorust välja pehmekesta (*pia mater*), moodustades migreeruvatele neuronitele juhtetee (Kriegstein ja Götz, 2003). Radiaalset migratsiooni kasutavad glutamaat-ergilised projektsiooni neuronid. Radiaalglia rakud jagunevad enamasti asümmeetriliselt: uuenevad ise ning annavad aluse kas neuronitele, intermediaalsetele eellasrakkudele või basaalsetele radiaalglia rakkudele. Intermediaalsetest eellasrakkudest ning basaalsetest radiaalglia rakkudest moodustuvad omakorda neuronid (Franco ja Müller, 2013). Hiirtel on neurogeneesi kõrgpunkt E13-E18 arengupäeval (Bultje, 2009).

Neuronid võivad õigetele kohtadele migreerumisel kasutada ka tangentsiaalset migratsiooni, mis toimub paralleelselt ventrikulaartsooniga. Tangentsiaalset migratsiooni kasutavad GABA-ergilised interneuronid, mis alustavad migratsiooni mediaalsest ja lateraalsest

ganglionikõrgendikust (*medial ganglionic eminence*, MGE ja *lateral ganglionic eminence*, LGE) ning suunduvad neokorteksisse, haistesibulasse või juttkehasse (Marin ja Rubenstein, 2001). Neuronid võivad migratsiooni käigus migratsioonitüüpi vahetada radiaalsest tangentsiaalseks ja vastupidi (Ang jt, 2003).

Samaaegselt migreerumisega oma lõplikku lokaliseerumiskohta peavad neuronid suunama oma aksonid õige märklauani. Rakk saadab välja kasvukoonuse, mis juhhib kasvavat aksonit vajalikus suunas ning kokkupuutel sobiva märklaudrakuga tekib sünaptiline ühendus (Marin jt, 2010).

1.2 Neurogenes täiskasvanu aju

Normaalsete tingimuste juures toimub aktiivne neurogenes täiskasvanud näriliste aju kahes eesaju piirkonnas – hipokampuse hammaskäärus, subgranulaartsoonis (SGZ) ja külgmiste vatsakeste külgeinas (LV) asuvas subventrikulaartsoonis (SVZ). Peale patoloogilist stimulatsiooni, nagu ajuinsult, võib neurogenes toimuda ka muidu mitteneurogeensetes regioonides (Gould, 2007).

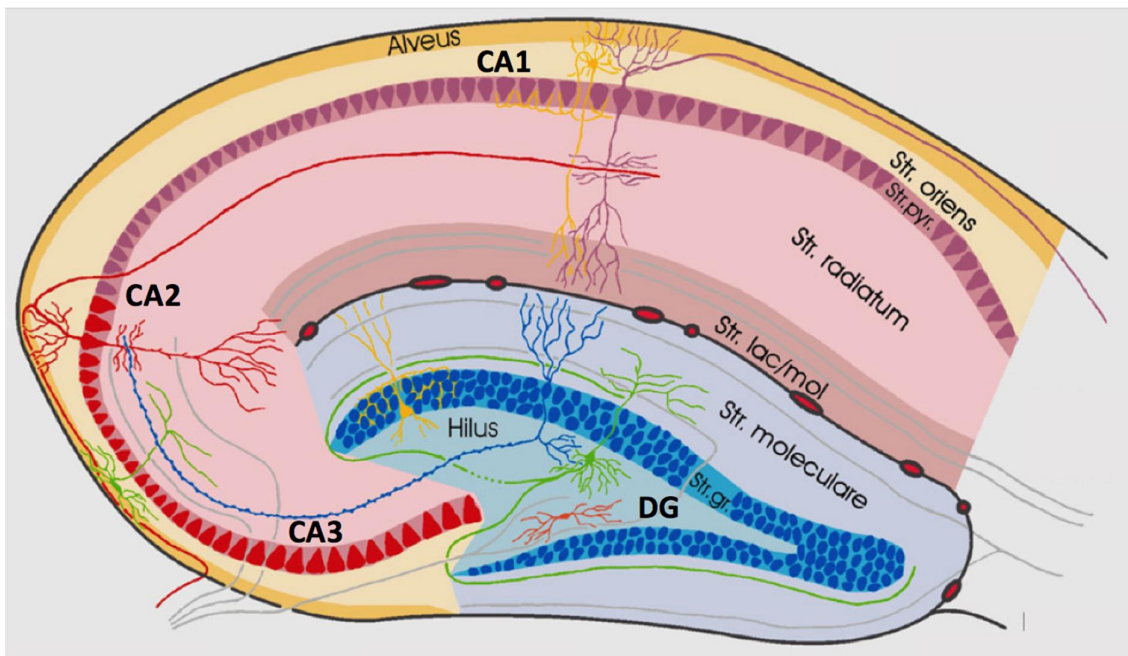
1.2.1 Hipokampuse ehitus

Hipokampus on limbilisse süsteemi kuuluv paariline struktuur, mille funktsioon on seotud emotsioonide, ruumitaju ja informatsiooni talletamisega lühiajalisest mälust pikaajalisse mällu. Hipokampus koosneb *cornu ammonis* (CA) piirkonnast ja hammaskäärust (*dentate gyrus* DG). CA piirkond jaguneb neljaks väljaks: hammaskääru poolne CA3 väli, millele järgneb kitsas CA2 väli ning selle kõrval paikneb CA1 väli. Eristatakse ka CA4 regiooni, milleks on hammaskääru koosseisu kuuluv hiilus (Joonis 1) (Allen brain atlas).

CA väljad koosnevad mitmest erinevast kihist, mis sisemisest kihist välimiseni jaotuvad: *stratum moleculare*, *stratum lacunosum* (või *lacunosum-moleculare*), *stratum radiatum*, *stratum lucidum*, *stratum pyramidale* ehk püramidaalrakkude kiht, *stratum oriens* ja kõige ülemine kiht on külgevatsakese seinaga külgnev *alveus*. Püramidaalrakkude kiht (*stratum pyramidale*) sisaldab püramidaalrakkude rakukehasid. *Stratum oriens* sisaldab püramidaalrakkude basaalseid dendriite ning inhibitoorseid ja erutavaid neuroneid. *Stratum moleculare* sisaldab püramidaalrakkude apikaalseid dendriite. Hammaskääru sõmerrakkude

aksonid ehk sammalkiud (*mossy fiber*, MF) moodustavad sünapseid CA3 püramidaalrakkudega *stratum lucidum* kihis. *Stratum lacunosum-moleculare* sisaldab Schafferi kollateraalseid juhteteid, kus aksonid algavad CA3 neuronitelt ja lõppevad CA1 dendriitidel ja entorinaalkoorest hipokampusesse saabuvald perforantse raja aksoneid (*perforant path fibers*). *Stratum radiatum* koosneb interneuronitest, septumi ja komissuraalsetest närvikiududest ning Schafferi kollateraalistest aksonitest. *Alveus* sisaldab püramidaalkihi neuronite aksoneid, mis väljuvad hipokampuselt ning liiguvad võlvi suunas.

Hammaskäär on samuti kihilise ehitusega, mis sisemisest kihist välimiseni jaotuvad: polümorfne kiht ehk hiilus, *stratum granulosum* ehk sõmerrakkude kiht ja *stratum moleculare*. *Stratum granulosum* sisaldab sõmerrakkude (*granule cells*) rakukehasid. *Stratum moleculare* sisaldab sõmerrakkude proksimaalseid dendriite, mis sünapseeruvad septumi, vastaspoolkera hammaskääru ja entorinaalkoore perforantse raja aksonitega. Sõmerrakkude tihedad aksonite kimbud ehk sammalkiud innerveerivad CA3 regiooni püramidaalrakkusid. Hiiluses paiknevad interneuronid ja sammalrakud (*mossy cells*). Lisaks eristatakse ka kitsast subgranulaartsooni (SGZ) *Stratum granulosum*'i ja hiiluse vahel, mis on üheks neurogeneesi toimumiskohaks täiskasvanu ajus (Joonis 1) (Philippe Taupin, 2007).



Joonis 1. Hipokampuse CA piirkondade ja DG kihiline ehitus (Pildi allikas:

<http://anatomie.vetmed.uni-leipzig.de/external/hippocampus/index.html>)

Hipokampuse erinevate neuronite vahel moodustuvad mitmed erinevad närviringid. Üheks neist on trisünaptiline rada, mis koosneb kolmest suurest rakkude grupis: hammaskääru sõmerrakud, CA3 püramidaalneuronid ja CA1 püramidaalrakud. Põhiosa hipokampuse aferentsest sisendist pärineb entorinaalkoorest (*entorhinal cortex*, EC). EC teise kihi neuronite aksonid saadavad info mööda perforantset rada hammaskääru ja CA3-e. Hammaskäärust liigub info mööda sammalkiudusid CA3 regiooni püramidaalrakkudele. CA3 püramidaalneuronid edastavad info läbi Scafferi kollateraalide CA1 regiooni püramidaalneuronitele. Hipokampusest väljuvad aksonid suunduvad tagasi EC viienda kihi neuronitele või võlvi kaudu septumisse, mediaalsesse ajukoorde ja talamusse. Selline närviring on seotud pikaajalise sünaptilise ülekande potentseerimisega (*long term potentiation*, LTP), mis on seotud õppimise ja mälu tekkimisega (Zhang ja Jin, 2012).

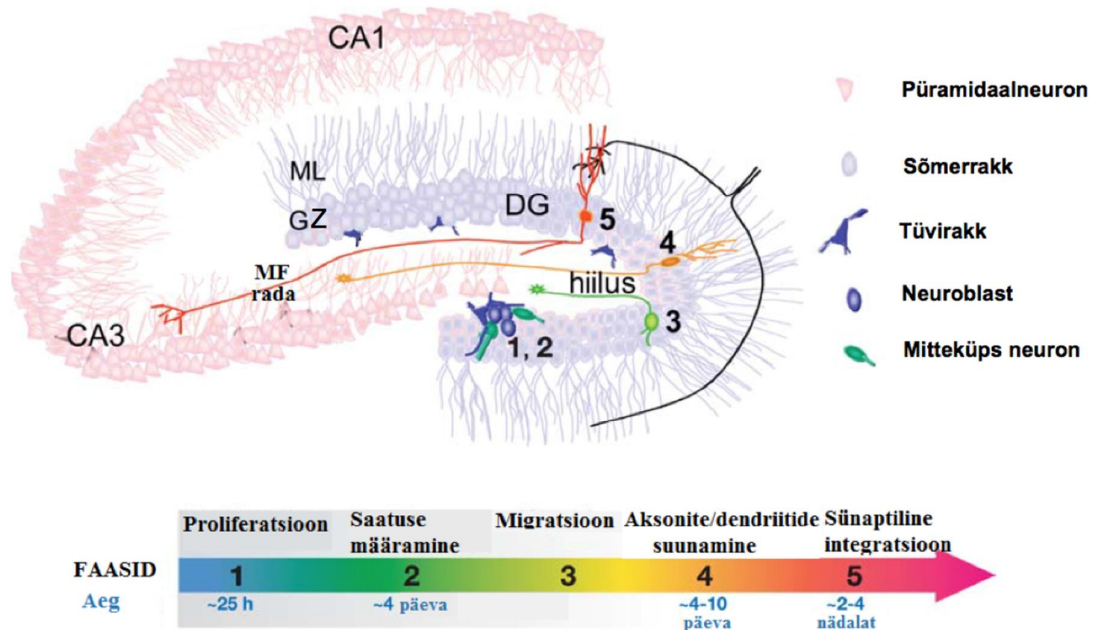
1.2.2 Hipokampuses toimuv neurogenees

Hipokampuse hammaskäärus toodetakse uusi rakke hiiluse ja sõmerrakkude kihi vahelisel alal – subgranulaartsoonis (SGZ). Rakkude jagunemine toimub klastrites, mis moodustuvad veresoonte ümber. Seal piirkonnas võib leida mitmes erinevas arengufaasis rakke (Joonis 2). SGZ-s on primaarseteks neuronite eellasteks radiaalglia-laadsed rakud, mille pikad apikaalsed jätked sisenevad sõmerrakkude kihti. Lisaks võib näha SGZ-s mitmeid erinevat tüüpi vahepealseid neuronite ja gliia eellasrakke ning erinevates diferentseerumise staadiumites olevaid neuroneid (Seri jt, 2001).

Eellasrakud jagunevad asümmeetriliselt, mille tagajärjel moodustub üks uus tüvirakk ning üks diferentseerumisele määratud kiirelt prolifereruv üleminekurakk (*transient amplifying cell*, TA-rakk). TA-rakke leidub SGZ-s kõige rohkem ning need rakud esindavad neuraalsete eellasrakkude arengus ülemineku faasi. TA-rakud kaotavad radiaalgliaale omased tunnused ning omavad rohkem neuronitele omaseid tunnuseid. Näiteks ekspresseerivad TA-rakud alguses gliiale ja tüvirakkudele omaseid markereid, mis lõpuks kaovad ning hakatakse ekspresseerima sõmerrakkudele spetsiifilisi markereid (Seri jt, 2004). Ebaküpsete neuronite spetsiifilised markerid on nestin, doublecortin (DCX) ja polüsialüleeritud neuraalne raku adhesioonimolekul (PSA-NCAM) ning täiskasvanud neuronite markeriteks on kalretiniin, kalbindiin ja NeuN.

TA-rakkudest moodustuvad neuroblastid on postmitootilised mitteküpsed sõmerrakud, mis migreeruvad radiaalselt sõmerrakkude kihiti (*stratum granulosum*) ning suunavad oma

aksonid läbi hiiluse CA3 välja suunas, moodustades sünaptilisi ühendusi CA3 kihi püramidaalneuronitega, samas dendriidid suunduvad molekulaarse kihi (*stratum moleculare*) suunas, kus nad moodustavad sünaptilisi ühendusi entorinaalkoore aksonitega (Joonis 2). Uued sõmerrakud on glutamaat-ergilised projektsiooni neuronid (Hastings jt, 2002; Jessberger ja Kempermann, 2003).



Joonis 2. Uute sõmerrakkude tootmine neutraalsetest tüvirakkudest hipokampuse hammaskääru subgranulaartsoonis. Hipokampaalne neurogenes jaguneb viide arengulisse faasi. Esimene faas on proliferatsioon: tüvirakkude (sinised) rakukehad paiknevad hammaskääru subgranulaartsoonis. Neil on radiaalsed jätked, mis lähevad läbi sõmerrakkude kihi ja lühikesed tangentsiaalsed jätked, mis paikuvad sõmerrakkude kihi ja hiiluse piiril. Tüvirakkudest tekivad TA-üleminekurakud (*transient amplifying cells*, helesinised). Teine faas on spetsifikatsioon: TA-rakud arenevad mitteküpseteks neuroniteks (rohelistel). Kolmandaks faasiks on migratsioon: mitteküpsed neuronid (helerohelised) migreeruvad sõmerrakkude kihti (*Stratum granulosum*). Neljas faas on aksonite ja dendriitide suunamine: mitteküpsed neuronid (oranžid) saadavad oma aksonid mööda sammalkiudude rada CA3 püramidaalneuronite kihi suunas ja dendriidid vastupidises suunas molekulaarse kihi poole. Viies faas on sünaptiline integratsioon: uued sõmerrakud (punased) võtavad infot vastu entorinaalkoorelt ja saadavad infot CA3 ja hiiluse piirkondadesse. DG, hammaskäär (*dentate gyrus*); ML, molekulaarkiht; GZ, sõmerrakkude kiht (Ming ja Song, 2005, pilt adapteeritud).

Uute neuronite integratsioon hipokampuse närviringidesse on seotud õppimisvõimega ning informatsiooni salvestamisega lühiajalisest mälest pikaajalisse mälest. Õppimise ja mälest aluseks hipokampuses on sünapsi pikaajaline potentseerimine (LTP), mis on uute neuronite

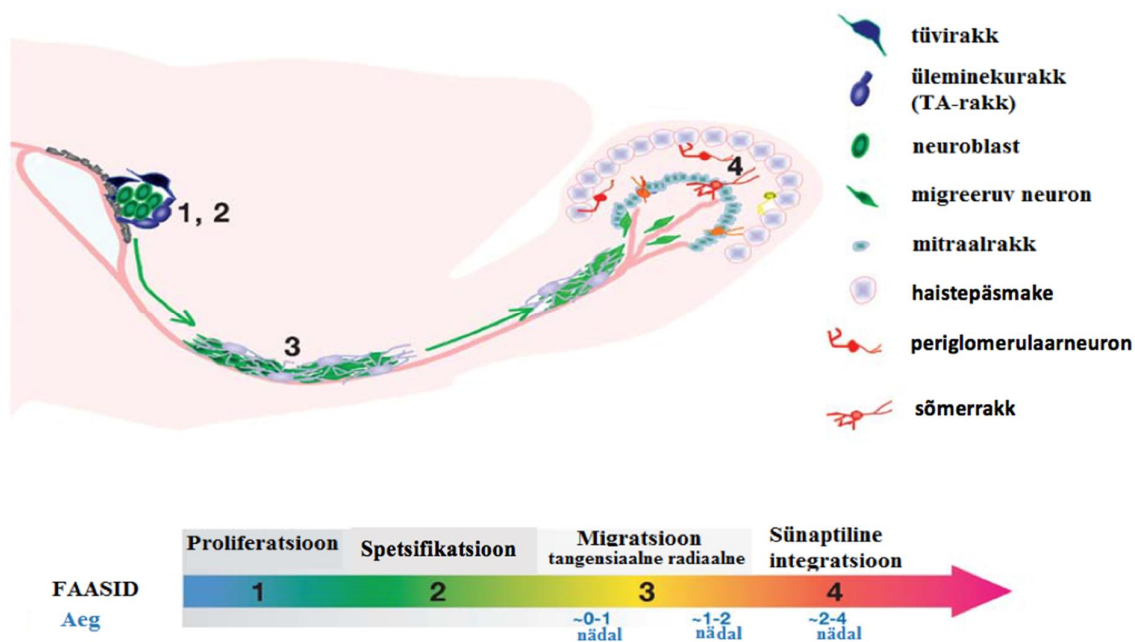
puhul madalama induktsiooni lävega ja kõrgema amplituudiga kui vanemates neuronites. Ehk uutel sõmerrakkudel on võimendunud sünaptiline plastilisus. See efekt on tuvastatav kuni 1-1,5 kuu vanustel neuronitel (Ge jt, 2007).

1.2.3 Külgvatsakese seinas toimuv neurogenees

Külgmiste vatsakeste külgeinas asuv subventrikulaartsoon (SVZ) on teine piirkond täiskasvanu ajus, kus pidevalt toodetakse uusi neuroneid. Sarnaselt hipokampuse SGZ-le, on ka SVZ-is tüvirakkudeks radiaalgliia-laadsed rakud (Doetsch jt, 1999). Lisaks leidub SVZ-s ka TA-üleminekurakke (*transient amplifying cells*), neuroblaste ja vatsakest voorderavaid endodermiaarakke. Sarnaselt hipokampaalsele neurogeneesile on SVZ-s toimuva neurogeneesi esimeseks etapiks radiaalgliia-laadsete rakkude jagunemine, mille käigus toodetakse TA-rakke. TA-rakud omakorda diferentseeruvad mitteküpseteks neuroniteks ehk neuroblastideks. Rakkude spetsifikatsiooni etapis on olulise tähtsusega endodermiaarakud, mis toodavad gliogeneesi inhibiitoreid (Doetsch jt, 1997; Ming ja Song, 2005).

Näriliste ajus migreeruvad neuroblastid SVZ-st haistesibulasse, kus nad diferentseeruvad haistesibula interneuroniteks (Joonis 3). Rändavad neuroblastid on üksteisega kontaktis, moodustades ketilaadseid struktuure, mis liitudes moodustavad rostraalse migratsioonivoo (*rostral migratory stream*, RMS) (Lois ja Alvarez-Buylla, 1994). Migreeruvaid neuroblastide kette ümbritseb gliiatunnel, mis on moodustunud astrotsüüdidite rakukehadest ja dendriitidest (Rousselot jt, 1995; Pancea ja Luskin, 2003). Haistesibula südamikku jõudes irduvad neuroblastid RMS-st ja migreeruvad radiaalselt haistepäsmakeste suunas, kus nad diferentseeruvad sõmer- või periglomerulaarrakkudeks (Lledo jt, 2006). Sellistel interneuronitel puuduvad aksonid ning vabastavad neurotransmittereid dendriitide kaudu, mis moodustavad sünapseid mitraalrakkude dendriitidega (Shepherd jt, 2004). Inimesel RMS puudub ning külgevatsakese seinas moodustuvad neuroblastid rändavad striatumisse (Ernst jt, 2014).

Uute neuronite lisandumine haistesibulasse on vajalik vanade neuronite asendamiseks ja neuraalse närvivõrgustiku säilitamiseks. Samuti on oluline olfaktoorse mälu kujunemisel (Lazarini ja Lledo, 2011).



Joonis 3. Subventrikulaartsooni tüvirakkudest uute interneuronite tootmine haistesibulas. Neurogenes SVZ/haistesibul süsteemis läbib nelja arengulist etappi. Esimene etapp on proliferatsioon, kus külgmiste vatsakeste subventrikulaartsooni tüvirakkudest moodustuvad TA-rakud ehk ülemineku rakud (TA – *transient amplifying cells*). Teiseks etapiks on rakkude saatuse määramine, kus TA-rakud diferentseeruvad ebaküpsedeks neuroniteks. Kolmas etapp on migratsioon. Migratsiooni käigus rändavad ebaküpsed neuronid mööda rostraalset migratsioonivoogu haistesibulasse. Migreeruvad neuronid on ümbritsetud astrotsüütidega. Jõudes haistesibulasse migreeruvad uued neuronid radiaalselt välimistesse rakukihtidesse. Neljandaks etapiks on sünaptiline integratsioon, mille käigus ebaküpsed neuronid diferentseeruvad kas sõmerrakkudeks või periglomerulaarneuroniteks (Ming ja Song, 2005, pilt adapteeritud).

1.3 Adhesioonimolekulide osalus neurogenesis

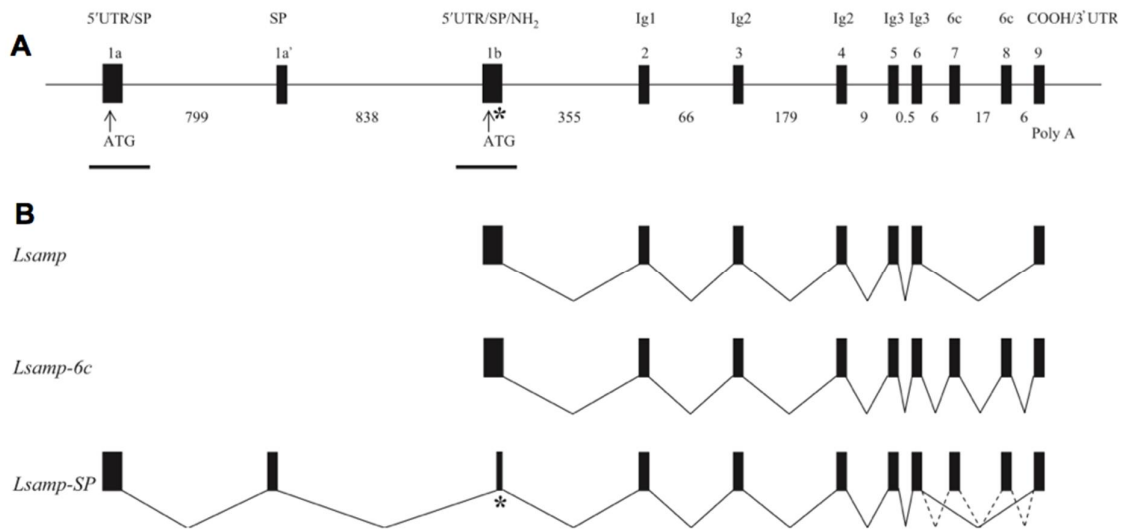
Neuronite pinnal paiknevad raku adhesioonimolekulid (*cell adhesion molecule, CAM*), mis vahendavad närvikoes rakkudevahelisi või rakkude ja ekstratsellulaarse maatriksi vahelist adhesiooni ehk seondumist. CAMid on olulised nii arenevas kui ka täiskasvanud ajus migratsiooni, neuriitide väljakasvu ja aksonite suunamise läbiviimiseks. Lisaks on CAMid olulised täiskasvanud ajus sünaptilise plastilisuse regulatsioonil ja kahjustunud aksonite regeneratsioonil. Närvisüsteemis olulised raku adhesioonimolekulide perekonnad võib jagada kolme gruppi: kadheriinid, integriinid ja immuunoglobuliinide superperekond (IgSF CAMid) (Grumet, 1991).

1.3.1 IgLON valguperekond

IgLONid kuuluvad immunoglobuliinide superperekonda, mis koosneb viiest liikmest: limbilise süsteemiga seotud membraanvalk (*limbic system associated membrane protein*, *Lsamp*), neurotrimiin (NTM), opioide siduv raku adhesioonimolekul (*opoid-binding protein/cell adhesion molecule-like*, OPCML), neuronaalne kasvuregulaator (*neuronal growth regulator 1*, *Negr1*) ja IgLON5. Antud valgud moodustavad omavahel homo- või heterodimeere, mida nimetatakse digloniteks ning reguleerivad närvijätkete väljakasvu ja sünaptoogeneesi (Hashimoto jt, 2009; Yamada jt, 2007; Akeel jt, 2011). Lisaks on neid valke kodeerivad geenid tuumorsupressoriteks osades mitteneuraalsetes kudedes (Akeel jt, 2011).

1.3.2 *Lsamp* geeni ja LSAMP valgu üldine iseloomustus

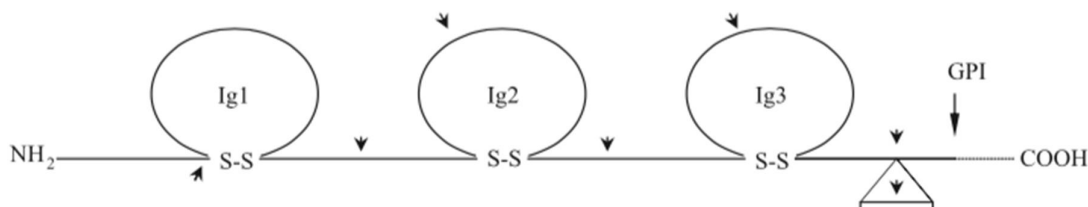
Lsamp geen asub inimestel 3. kromosoomi pikemas õlas, hiire homoloog asub vastavalt 16. kromosoomis (Pimenta jt, 1998). *Lsamp* geenile on iseloomulik kaks esimest eksonit, 1a ja 1b, millel on erinevad promootorid ning kodeerivad alternatiivseid signaalpeptiide (Joonis 4A). *Lsamp* geen kodeerib kolme isovormi, mis tekivad alternatiivse splaissimise kaudu (Joonis 4B). Kaks isovormi tekivad alternatiivsete promootorite kasutamise tulemusena. Lisaks võib alternatiivse splaissimise tulemusena C-terminaalsesse otsa, kolmanda immuunoglobuliini domeeni ja GPI ankru seondumiskoha vahele lisanduda 23-aminohappeline insert (Joonis 5). Alternatiivsete eksonite kasutamine võib olla oluline evolutsiooniline mehhanism, mis kindlustab geeni paindliku transkriptsioonilise regulatsiooni täiskasvanud ja arenevas organismis. Närlise geenis jääb eksonite 1a ja 1b vahele ka ekson 1a' (Joonis 4A), mis inimesel evolutsioonis mutatsiooniliste sündmuste tagajärjel on kaduma läinud. Eksonid 1a ja 1a' kodeerivad alternatiivset 5'UTR signaalpeptiidi (Pimenta ja Levitt, 2004). *Lsamp* geeni kahel promootoril on erinevates kudedes erinev aktiivsus. 1a promootorilt algatatud transkriptsiooni aktiivsus avaldub limbilistes struktuurides, mille funktsiooniks on emotsioonid ja motivatsioon. 1b transkriptide ekspressioon on spetsiifilisem sensorsete juhteteede puhul, milleks on kuulmise ja nägemisega seotud ning somatosensoorne piirkond (Philips jt, 2014). Samuti on näidatud madalat *Lsamp* 1b transkripti ekspressiooni mõnedes mitteneuraalsetes kudedes (neerus, südames, kopsus, testises) (Maria Piirsalu bakalaureusetöö, 2014).



Joonis 4. (A) Joonisel on näidatud *Lsamp* geeni struktuur. Esimene ekson (1a) ja alternatiivne esimene ekson (1b) ning nende vahel olev ekson 1a'. Neile järgnevad immunoglobuliini domeene kodeerivad eksonid (2, 3, 4, 5 ja 6). Eksonid 7 ja 8 alluvad alternatiivsele splaissingule, mille tulemusena lisandub või puudub 69-nukleotiidine insert. Viimane ekson (9) sisaldab 3'UTR ja C-terminaalset osa kodeerivat järjestust. **(B)** Joonisel on välja toodud erinevad *Lsamp* isovormid. Esimene ja teine isovorm on 1b transkriptid, teine isovorm (*Lsamp-6c*) sisaldab 69-nukleotiidilist lisajärjestust, millest saadakse 23-aminohappeline insertioon ning viimane isovorm (*Lsamp-SP*) on 1a transkript (Pimenta ja Levitt, 2004).

Algselt kirjeldati *Lsamp*'i kui spetsiifiliselt limbilise süsteemiga seotud membraanvalku. Limbiliseks süsteemiks nimetatakse ajustruktuuride kogumit kesknärvisüsteemis, mis on seotud emotsioonide, motivatsiooni, õppimise ja mälu protsesside regulatsiooniga ning mille olulisemad komponendid on peririnaalkoor, vöökäär (*cingulate cortex*), mandelkeha, hipokampus ja striatum (MacLean, 1990). LSAMP valku on kirjeldatud nii neuronite rakukehal kui ka dendriitidel (Levitt, 1984; Horton ja Levitt, 1988; Pimenta jt, 1996; Reinoso jt, 1996). Vaatamata oma nimele on LSAMP ekspresseeritud ka mitte limbilise süsteemiga seotud piirkondades, keskaju ja tagaaju piirkondades, küll aga on nendes regioonides ekspressioon madalam (Philips, 2014). LSAMP valk on inimese ja roti vahel evolutsiooniliselt konserveerunud, omades 99% ulatuses homoloogiat ning erinedes vaid nelja aminohappe poolest, mis ei muuda valgu tertsiaarstruktuuri (Pimenta jt, 1996). Seega võib oletada, et LSAMP valk struktuuri ja funktsionaalsete omaduste poolest tugevalt fülogeneetiliselt konserveerunud.

LSAMP on tugevalt glükosüleeritud valk, mida iseloomustab kolm immunoglobuliini domeeni ning N- ja C-terminaalsed signaalpeptiidid, mis ilmselt vahendavad valgu seondumist rakumembraanile (Pimenta jt, 1996). C-terminaalne signaalpeptiid sisaldab glükosüülfosfatidüül inositol (GPI) ankru kinnitumiskohta, mis on vajalik valgu seondumiseks neuroni membraaniga (Pimenta ja Levitt, 2004) (Joonis 5).



Joonis 5. LSAMP valgu struktuur. Immunoglobuliini domeenid on kujutatud globulaarsete struktuuridena. Noolega on näidatud GPI ankru seondumiskoht. Kolmanda immunoglobuliini domeeni ja GPI ankru seondumiskoha vahele jääb 23 aminohappelise insertiooni koht, mis lisatakse alternatiivse splaissingu käigus. Lühikeste nooltega on välja toodud splaissimise saidid ehk kokku liidetud eksonite piirid (Pimenta ja Levitt, 2004).

LSAMP valk on seotud aksonite suunamise ja neuriitide väljakasvuga (Pimenta jt, 1995). On näidatud, et LSAMP võib soodustada või inhibeerida neuriitide väljakasvu olenevalt interaktsioonidest teiste IgLON perekonna valkudega. Näiteks LSAMP-neurotrimiin heterofiilne interaktsioon inhibeerib dorsaaljuure ganglioni neuriitide väljakasvu (Gil jt, 2002). Samas LSAMP- LSAMP homofiilne interaktsioon indutseerib hipokampuse neuriitide väljakasvu (Zhukareva ja Levitt, 1995). Varajases embrüogeneesis on LSAMP valk ekspresseerunud aksonite pinnal ja kasvukoonusel ning on seega oluline ajustruktuuride arengul (Horton ja Levitt, 1988). Täiskasvanud organismis ekspressioon aksonitel puudub ent esineb postsünaptiliselt rakukehal ja dendriitidel (Cote jt, 1995).

Inimestel on seostatud *LSAMP* geeni polümorfisme mitmete psühhiaatriliste häiretega, nagu paanikahäire, enesetapud, depressioon ja skisofreenia (Koido jt, 2006; Must jt, 2008; Koido jt 2012; Koido jt, 2014). Lisaks on *LSAMP* alla reguleeritud heledarakulise neerurakulise kartsinoomi, müeloidse leukeemia ja osteosarkoomi puhul, mis viitab võimalikule tuumor-supressor rollile (Chen jt, 2003; Kühn jt, 2012; Kresse jt, 2009). Samuti on leitud, et *LSAMP* osaleb ateroskleroosiliste muutuste kujunemisel (Wang jt, 2008).

1.3.3 *Lsamp*-puudulikkusega hiired

Tartu Ülikoolis konstrueeritud *Lsamp*-puudulikkusega hiired on saadud *Lsamp* geeni 1b eksoni asendamisel β -galaktosidaasi/neomütsiini geenikassetiga (LacZ-Neo), mille tagajärjel on geenilt kodeeritud valk mittefunktsionaalne (Innos jt, 2011). Alternatiivselt on ka konstrueeritud *Lsamp*-puudulikkusega hiired 2 eksoni inaktivatsiooniga (Catania jt, 2008).

Kuigi LSAMP valk on ajus oluline aksonite suunamisel ja väljakasvul, siis huvitaval kombel pole *Lsamp* geeni puudulikkusega hiireliinidel täheldatud ilmseid kõrvalekaldeid aju organisatsioonis (Catania jt, 2008; Innos jt, 2011). Selle taga võivad olla teised IgLON perekonna valgud, mis võivad võtta LSAMP funktsiooni osaliselt enda peale.

Lsamp geeni puudulikkusega hiirtel esineb mitmeid kõrvalekaldeid sotsiaalses ja ärevusega seotud käitumuslikes parameetrites. Nad reageerivad negatiivsetele välismõjudele oluliselt vähem, olles vähem ärevad, suurema liikumisaktiivsusega, vähem agressiivsed ning neil puudub hierarhia – ei püga üksteisel vurrusid (Innos jt, 2011). Rikastatud keskkond võimendab *Lsamp*-puudulikkusega hiirtel teatud fenotüübilisi iseärasusi (nt vähenenud ärevus). Kui tavalistel metsiktüüpi hiirtel tekitab isolatsioonis kasvamine stressi, siis *Lsamp*-puudulikud hiired on isolatsioonist tingitud stressi suhtes vähem tundlikud (Innos jt, 2012). Samuti on leitud, et *Lsamp*-puudulikel hiirtel esinevad muutused serotoniinisüsteemis ning madalam dopamiini transporteri mRNA tase, mis seletab hiirte vähenenud ärevust ja agressiivsust (Innos jt, 2013). *Lsamp* geeni ekspressiooni on seostatud emotsioonide ja sotsiaalse käitumise regulatsiooniga (Philips jt, 2014).

1.4 Rikastatud keskkonna mõju näriliste neuraalsele arengule

Katseloomi peetakse tavaliselt laboratooriumis tehiskeskkonnas, mis on võrreldes loomuliku keskkonnaga oluliselt vaesem ning katseloomade keskkonna rikastamine annab loomadele võimaluse käituda loomupärasemalt ja suurendab nende heaolu. Rikastatud keskkonnas hoitakse katseloomi suuremates puurides, mis on mitmekesisema sisuga. Lisaks allapanule ja pesamaterjalile leidub puurides jooksurattaid, tunneleid ja muid lisaelemente, mis stimuleerivad ning edendavad näriliste neuraalset arengut. Kõige olulisem komponent rikastatud elukeskkonna puuris on jooksuratas. Vabatahtlik füüsiline aktiivsus jooksurattal soodustab hipokampuses eellasrakkude proliferatsiooni ja neurogeneesi (van Praag jt, 2000). Samas aga rikastatud keskkond ja füüsiline aktiivsus SVZ-s/haistesibulas toimuvat neurogeneesi ei mõjuta (Brown jt, 2003).

Rikastatud keskkond mõjutab nii hipokampuse hammaskäaru sõmerrakkude kui ka CA1 ja CA3 piirkondade püramidaalrakkude morfoloogiat. Võrreldes standardmajutuse kontrollloomadega on CA1 piirkonnas dendriitide ning hargnemiste arv kasvanud. Samuti on suurenenud sünapside hulk CA3 piirkonnas (Juraska jt, 1985; Rampon jt, 2000).

Rikastatud keskkonnas kasvanud katseloomadel on parem mälu ning nad tulevad paremini toime erinevate õppimisülesannetega. Keskkonna rikastamine tõstab neurotransmitterite ja kasvufaktorite, nagu närvikasvufaktori (NGF) ja tserebraalse neurotroofse faktori (BDNF) tasemeid, mis on olulise funktsiooniga õppimisel ja sünaptilise plastilisuse väljakujunemisel (Falkenberg jt, 1992; Pham jt, 1999; van Praag jt, 2000).

Lisaks on rikastatud keskkonnal ka terapeutiline mõju paljude aju patoloogiate korral nagu ajutraumad, insult, epilepsia, Huntingtoni tõbi ning omab ka positiivset mõju vananemisel esinevate mäluprobleemide korral (van Praag jt, 2000).

Kuna varasemalt on teada, et *Lsamp* ekspressioon tõuseb rikastatud keskkonnas spetsiifiliselt hipokampuses (Philips jt, 2014), oli antud magistritöös suuremaks eesmärgiks uurida, kas rikastatud keskkonnas kasvavatel *Lsamp*-puudulikkusega täiskasvanud hiirtel on muutusi hipokampaalses neurogeneesis.

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Töö eesmärk

Töö eesmärk oli välja selgitada kas *Lsamp* geen/valk omab rolli täiskasvanud hiire hipokampuse hammaskäaru neurogeneesis.

Detailsed eesmärgid:

1. Võrrelda wt ja *Lsamp* *-/-* hiirte neurogeneesi baastaset hipokampuse hammaskäarus
2. Võrrelda rikastatud keskkonna mõju neurogeneesile täiskasvanud wt ja *Lsamp* *-/-* hiirte hipokampuse hammaskäarus
3. Vaadelda neuroblastide paiknemist ja tihedust wt ja *Lsamp* *-/-* hiirte hipokampuses
4. Lisaks võrrelda wt ja *Lsamp* *-/-* hiirte kehakaalu erinevust rikastatud- ja standard keskkonnas

2.2 Materjal ja meetodika

2.2.1 Katseloomad ja nende majutus

Töös kasutati transgeenset hiireliini, kus hiire *Lsamp* geeni 1b ekson on asendatud tuumalokalisatsiooni signaali (*nuclear localisation signal*, NLS) ja β -galaktosidaasi/neomütsiini liitgeeniga (NLS-LacZ-Neo), mille tulemusena on geenilt kodeeritud valk mittefunktsionaalne (Innos jt, 2011). Katseid tehti täiskasvanud isaste homosügootsete *Lsamp*-puudulike (*Lsamp* *-/-*) hiirte ja nende metsiktüüpi pesakonnakaaslastega (*Lsamp* *+/+*). Töös kasutati C57BL/6 ja 129S6/SvEv segataustaga hiiri. Katseloomi hoiti kaheksakaupa polüpropüleenpuurides 12-tunnise valge/pime tsükliga ruumis (valge tsükkel algas kell 7.00). Toidugraanulid ja joogivesi olid loomadele vabalt kättesaadavad. Katsed viidi läbi Tartu Ülikooli Meditsiiniteaduste valdkonna Bio- ja siirdemeditsiini instituudis.

Katses kasutatud loomade arv oli 32: kaheksa *Lsamp* *+/+* ja kaheksa *Lsamp* *-/-* hiirt paigutati elama rikastatud elukeskkonna puuri ning kaheksa *Lsamp* *+/+* ja kaheksa *Lsamp* *-/-* hiirt paigutati elama standardmajutusse. Rikastatud elukeskkonna puuri mõõdud olid 59,5 cm x 38 cm x 20 cm, sisaldas allapanu heina, topelt kogust pesamaterjali, roostevabast terasest

jooksurattaid, maja ning tunnelit (Joonis 6). Standardmajutus koosnes 42,5 cm x 26,6 cm x 15,5 cm suurusest puurist ning sisaldas allapanu ja pesamaterjali. Kuna rikastatud keskkonnas kasvavad hiired kippusid tavalist hakkepuidust pesamaterjali jooksuratate vahele vedama, siis kasutasime pesamaterjalina vatti, et vältida jooksuratate kinni kiilumist. Kolmandast kuni kaheteistkümnenda elunädalani hiiri kaaluti, vahetati puuri sisu ning muudeti erinevate lisaelementide paiknemist.

Katse teostati Eesti Vabariigi Põllumajandusministeeriumi poolt välja antud loa alusel (number 39, välja antud 2005). Kõik loomkatsed viidi läbi litsentsi omava spetsialisti poolt.



Joonis 6. Illustreeriv pilt rikastatud keskkonna puurist jooksuratate, tunneli, majakese ja pesaehituseks mõeldud vatiga.

2.2.2 BrdU lahuste valmistamine ja süstimine

Hiirtele süstiti kolm korda päevas kahetunnise intervalliga 20 mg/ml 5-bromo-2-desoksüüridiini (BrdU-d) sisaldavat 0,9% NaCl lahust. Lahus valmistati vahetult enne süstimist ning parema lahustuvuse saavutamiseks lisati 2 ml lahuse kohta 10 µl 10 µM NaOH

lahust. Lahus soojendati 37°C-ni ning manustati katseloomadele intraperitoneaalselt 50 µl 10 grammi kehakaalu kohta (Maria Piirsalu bakalaureusetöö, 2014).

2.2.3 Perfuseerimine ja ajude eraldamine

Üks ööpäev peale viimast BrdU lahuse manustamist teostati transkardiaalne perfusioon ning ajude eraldamine. Perfuseerimise eelselt viidi katseloomad sügavasse narkoosi, kasutades anesteetikumina 4% kloraalhüdraati (50 µl 10 grammi kehakaalu kohta). Anesteseeritud hiir perfuseeriti füsioloogilise lahusega (0,9% NaCl lahus, 50 ml) ning seejärel 4% paraformaldehüüdi (PFA, Sigma) lahusega 0,1M fosfaatpuhvrts (50 ml).

Dekapitatsiooni järgselt ajud dissekteeriti ning postfikseeriti 4% PFA fosfaatpuhvrts (PBS-s) 24 tunni jooksul +4°C juures. Järgnevalt ajud krüoprotekteeriti 24 tunni jooksul 20% sahharoos (AppliChem) 4% PFA/PBS lahuses +4°C juures ning külmutati -80°C juures, kus neid säilitati kuni külmlõikude tegemiseni (Maria Piirsalu bakalaureusetöö, 2014).

2.2.4 Külmlõikude valmistamine ja BrdU detekteerimine

Aju poolkerad lõigati hipokampuse ulatuses krüomikrotoomiga (Microm HM-560) -20°C juures 40 µm paksusteks koronaarlõikudeks. BrdU katse jaoks kasutati ujuvlõike.

Ajulõike pesti 15 minutit PBS-s, millele oli rakumembraanide permeabiliseerimiseks lisatud 0,25% Triton X-100 (Naxo, Eesti). Endogeense peroksüdaasi inhibeerimiseks töödeldi lõike 0,3% vesinikperoksiidi lahusega 15 min. Seejärel 3 X 5 min PBS/0,25% Triton X-100 lahuses, millele järgnes ajalõikude inkubeerimine 15 min puhverdatud trüpsiinilahuses (0,05% trüpsiin 0,1% CaCl₂ 0,05 M Tris-HCl, pH 7,6) ja taas pesti 3 X 5 min PBS/0,25% Triton X-100 lahusega. Seejärel inkubeeriti ajalõike 30 min 2M HCl lahuses 37°C juures ning pesti 3 X 5 min PBS/0,25% Triton X-100 lahusega. Ebaspetsiifiliste antikeha seondumiskohtade blokeerimiseks inkubeeriti ajalõike 5% hobuse normaalseerumi (Vector Laboratories Inc. USA) PBS/0,25% Triton X-100 lahuses 1h kestel. Sellele järgnes 24-tunnine inkubatsioon +4°C juures roti BrdU-vastase monoklonaalse antikehaga (1:300) (AbD Serotec) 2% hobuse seerumiga PBS/0,25% Triton X-100 lahuses. Seondumata primaarsete antikehade väljapesemiseks pesti lõike 3 X 10 minutit PBS/0,25% Triton X-100 lahuses.

Seejärel inkubeeriti 1h kestel biotinüleeritud sekundaarse antikehaga (roti IgG vastane eesli antikeha, Jackson ImmunoResearch; lahjenduses 1:500) 1% hobuse normaalseerumi/PBS/0,25% Triton X-100 lahuses. Järgnevalt inkubeeriti ajulõike avidiini-biotiini lahuses (ABC kit, Vector laboratories), kus reagentid lahjendati 0,1% Tween-20 sisaldava PBS-ga. Lõike hoiti ABC reagensis 30 min toatemperatuuril. BrdU-positiivsete rakkude visualiseerimiseks kasutati 3,3'-diaminobensidiini (DAB) (Vector Laboratories) ning lasti värvuda 5-10 min. DAB reaktsioon peatati kraaniveega. Seejärel tõsteti ajulõigud 0,5% želatiiniga kaetud alusklaasidele ning peale kuivamist sulundati Pertex'isse (Histolab) (Maria Piirsalu bakalaureusetöö, 2014).

2.2.5 Immunohistokeemia

Katses kasutati alusklaasidele kinnitatud ajulõike (Polysine Slides, Thermo Scientific), mida permeabiliseeriti 45 min 0,2% Triton X-100/PBS lahuses. Sekundaarsete antikehade ebaspetsiifilise seondumise blokeerimiseks kasutati 5% kitse normaalseerumi/10% hobuse normaalseerumi/1% veise seerumi albimiini (*bovin serum albumine*, BSA; Sigma Aldrich)/0,1% Triton X-100/PBS lahust, mida hoiti lõikudel 2 h. Seejärel inkubeeriti ajulõike primaarse antikeha/1% BSA/0,1% Triton X-100/PBS lahusega üleöö +4°C juures. Primaarsed antikehad ja vastavad lahjendused on välja toodud Tabelis 1. Seondumata antikehade eemaldamiseks pesti lõike 3 korda 1h jooksul PBS lahusega. Järgnesid töötused fluorofooriga konjugeeritud sekundaarsete antikehade 1% BSA/PBS lahuses (lahjendused märgitud Tabelis 1). Seondumata antikehade eemaldamiseks pesti ajulõike 3 korda 1h jooksul PBS's. DNA visualiseerimiseks kasutati DAPI (4,6-diamidino-2-fenüülindool, Sigma Aldrich) värvainet lahjendusega 1:1000 PBS's, mida hoiti lõikudel 15 min. Järgnevalt pesti lõike PBS'iga, sulundati kasutati Vectashield (Vector laboratories) sulundusvedelikku ning kaeti 0,17 mm kattedklaasiga (Deltalab).

Tabel 1. Prolifereeruvate ja ebaküpsete neuronite märgistamiseks kasutatud antikehad.

Antikeha	Lahjendus	Tüüp	Tootja
Guinea pig anti DCX	1:500	Primaarne	EMD-Millipore
Rat anti pHH3	1:1000	Primaarne	Sigma Aldrich
Donkey anti guinea pig (TRITC)	1:1000	Sekundaarne	Jackson ImmunoResearch

2.2.6 Mikroskoopia ja rakkude lugemine

Töödeldud ajulõikude dokumenteerimiseks kasutati FV1000 konfokaalmikroskoopi ning Olympus BX51 mikroskoopi, mis oli varustatud Olympus DP71 kaameraga. Pildistamiseks kasutati 10, 20 ja 60 kordse suurendusega objektiivi.

Kuna hammaskääru suurus varieerub olenevalt hipokampuse piirkonnast, võeti arvesse hipokampuse hammaskääru mõõtu. Hammaskääru suhtelise pikkuse mõõtmisel ja rakkude lugemisel kasutati ImageJ (versioon 1.49) vabavara programmi. Subgranulaartsooni keskmine rakkude arv saadi iga lõigu BrdU-positiivsete rakkude arvu ja hammaskääru suhtelise pikkuse jagamisel.

2.2.7 Andmeanalüüs

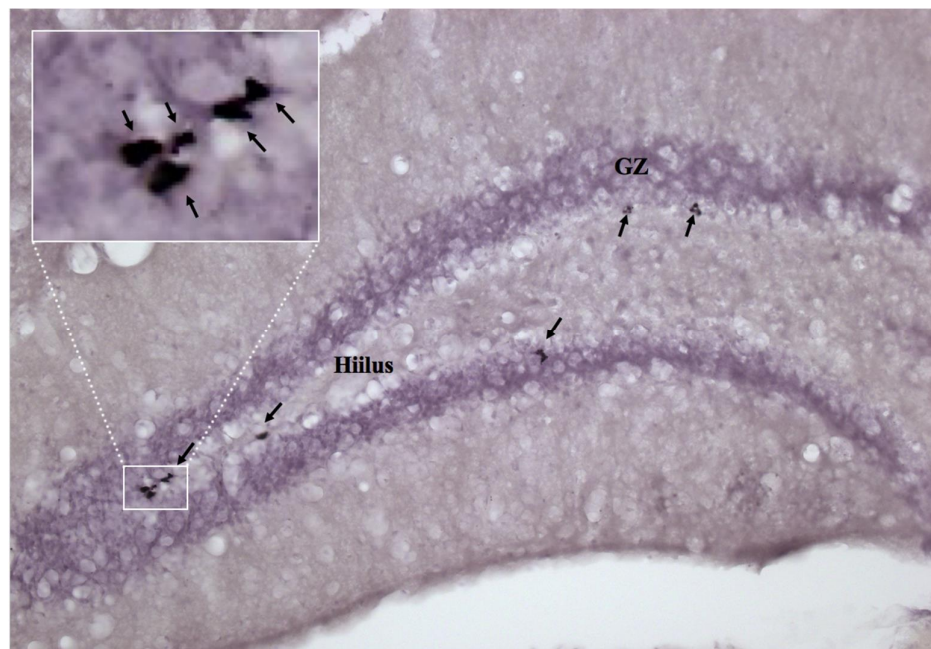
Tulemused on esitatud keskmise rakkude arvuna koos keskmise standardveaga (\pm SEM). Piltide töötlemiseks kasutati Adobe Photoshop CC pilditöötlusprogrammi. Graafikute koostamisel ja andmete analüüsi teostamisel kasutati tarkvarapaketti GraphPad Prism (6.0 versioon) ja Microsoft Excel 2015 programmi. Andmete statistiliseks analüüsiks kasutati Student t-testi. Tulemused loeti statistiliselt olulisteks, kui p-väärtus oli väiksem kui 0,05.

2.3 Tulemused

2.3.1 Wt ja *Lsamp*-puudulikkusega hiirte neurogeneesi baastase

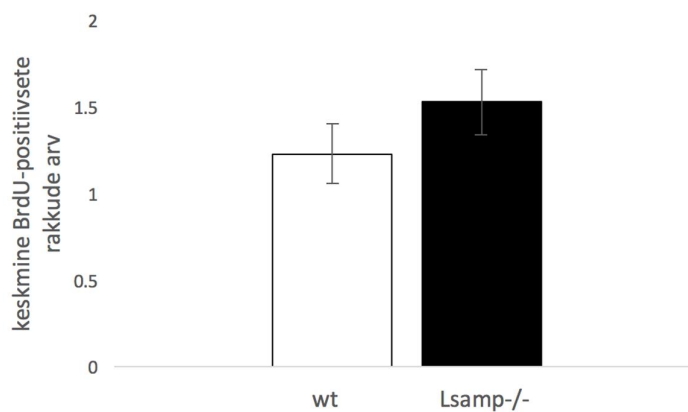
BrdU on tümidiini analoog, mis lülitub uute rakkude DNA ahelasse rakutsükli S-faasis ning võimaldab visualiseerida rakkude replikatsiooni. Et uurida kas leidub erinevus jagunevate rakkude arvus wt ja *Lsamp*-puudulikkusega täiskasvanud hiirte hipokampuse hammaskäärus, manustati 18. nädala vanustele hiirtele BrdU-d ja 24 tunni möödudes hiired hukati.

BrdU-d sisaldavad rakkude tuumad olid kõikidel gruppidel ebaregulaarse kujuga ning paiknesid sõmerrakkude kihi ja hiiluse vahelisel alal enamasti 2-3 rakuliste klastritena (Joonis 7). Osad BrdU-positiivsed rakud paiknesid ka hiiluses (Joonis 9C).



Joonis 7. Illustreeriv joonis BrdU-d sisaldavatest rakkudest wt hipokampuse hammaskäärus. Nooled näitavad BrdU-positiivseid rakke. GZ – granulaartsoon ehk sõmerrakkude kiht.

Standarmajutuses kasvanud *Lsamp*-puudulikkusega hiirtel oli hipokampuse hammaskäärus mõnevõrra rohkem BrdU-märgistatud rakke kui wt hiirtel, kuid antud erinevus ei osutunud statistiliselt oluliseks ($p = 0,28$) (Joonis 8).

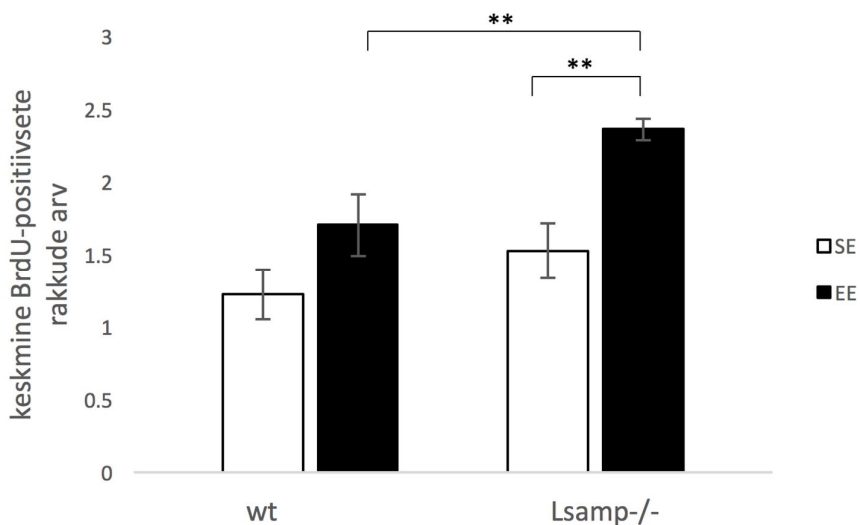


Joonis 8. Standardmajutuses kasvanud wt ja *Lsamp*-puudulikkusega hiirte neurogeneesi tase.

Statistiliselt olulist erinevust wt ja *Lsamp*-puudulikkusega hiirte hipokampaalse neurogeneesi baastasemete vahel ei esine. Rakkude arv on saadud BrdU-märgistatud rakkude arvu jagamisel hammaskääru suhtelise pikkusega ühe lõigu kohta. Valge tulp: wt; must tulp: *Lsamp*-puudulikkusega hiired.

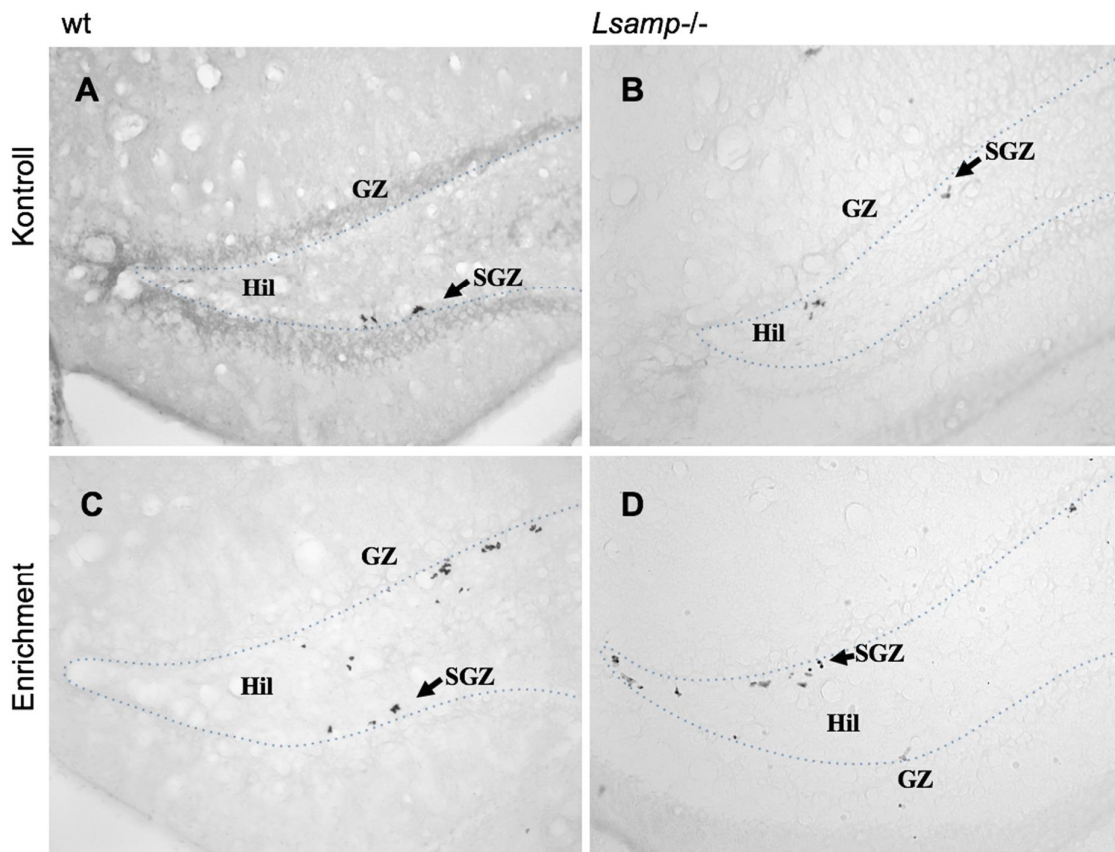
2.3.2 Rikastatud keskkonna mõju wt ja *Lsamp*-puudulikkusega hiirte neurogeneesile

Olulist erinevust standard- ja rikastatud keskkonnas kasvanud kontrollhiirte hipokampuses ei olnud ($p = 0,12$). Samades tingimustes kasvanud *Lsamp*-puudulikkusega hiirte vahel oli BrdU-märgistatud rakkude arv oluliselt erinev ($p < 0,01$). Samuti esines rikastatud keskkonnas kasvanud *Lsamp*-puudulikkusega hiirte hammaskäärus rohkem uusi rakke kui standardmajutuses kasvanud hiirtel (Joonis 10).



Joonis 10. Rikastatud keskkonnas (EE) ja standardmajutuses (SE) kasvanud wt ja *Lsamp*^{-/-} hiirte BrdU-märgistatud rakkude arv hipokampuse hammaskäärus. Rikastatud keskkonnas ja standardmajutuses kasvanud wt hiirte hipokampuse hammaskäärus ei esine statistiliselt olulist erinevust uute rakkude arvus. Rikastatud keskkonnas kasvanud *Lsamp*-puudulikkusega hiirtel on subgranulaartsoonis tunduvalt rohkem uusi neuroneid kui standardmajutuses kasvanud *Lsamp*-puudulikkusega hiirtel. Rikastatud keskkonnas kasvanud *Lsamp*-puudulikkusega hiirtel on oluliselt enam uusi rakke kui rikastatud keskkonnas kasvanud wt hiirtel. EE, *environmental enrichment* ehk rikastatud keskkond (mustad tulbad); SE, *standard environment* ehk standardmajutus (valged tulbad). ** $p < 0,01$.

Visuaalselt on näha, et rikastatud keskkond tõstab uute rakkude arvu nii wt kui *Lsamp*-puudulikkusega hiirte hipokampuse hammaskäärus (Joonis 9).

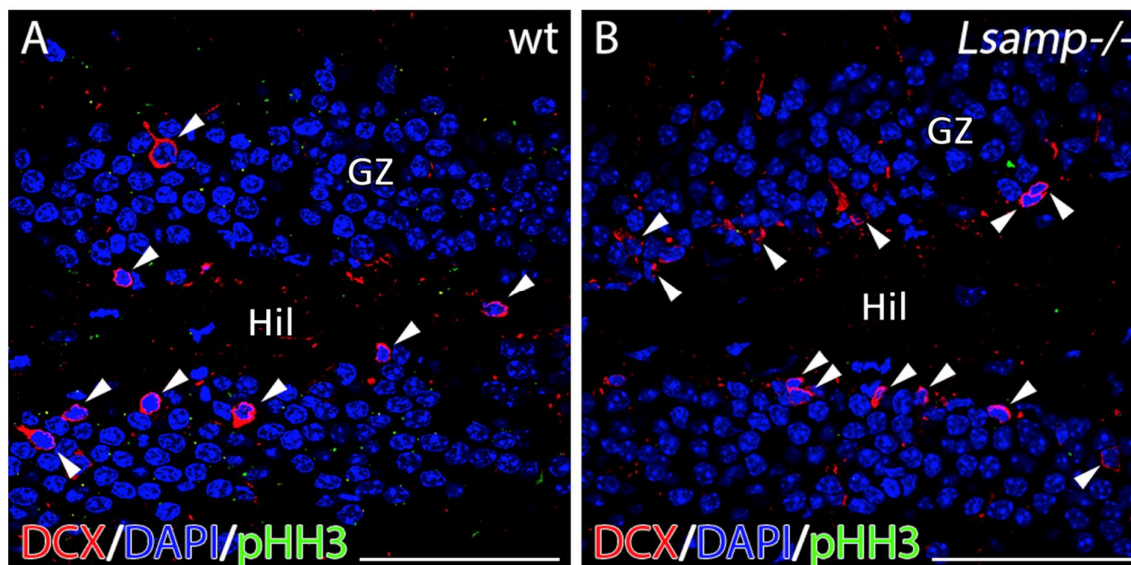


Joonis 9. Illustreeriv joonis BrdU-positiivsetest rakkudest standardmajutuses (A, B) ja rikastatud keskkonnas (C, D) kasvanud wt (A, C) ja *Lsamp*-puudulikkusega (B, D) hiirte hipokampuse hammaskäärus. Visuaalselt võib näha, et rikastatud keskkonnas (enrichment) kasvanud hiirte hipokampuse hammaskäärus on rohkem BrdU-märgistatud rakke kui tavatingumustes kasvanud katseloomadel. Hil, hiilus; GZ, granulaartsoon ehk sõmerrakkude kiht; SGZ, subgranulaartsoon. Punktiirjooned tähistavad hipokampuse hammaskääru piire.

2.3.3 Neuroblastide paiknemine ja tihedus wt ja *Lsamp*^{-/-} hiirte hipokampuses

Hammaskääru SGZ-is on doublecortin (DCX) ekspresseerunud ebaküpses neuronites ja neuroblastides, millede jagunemist on võimalik detekteerida fosfo-histoon H3 (pHH3) ekspressiooniga.

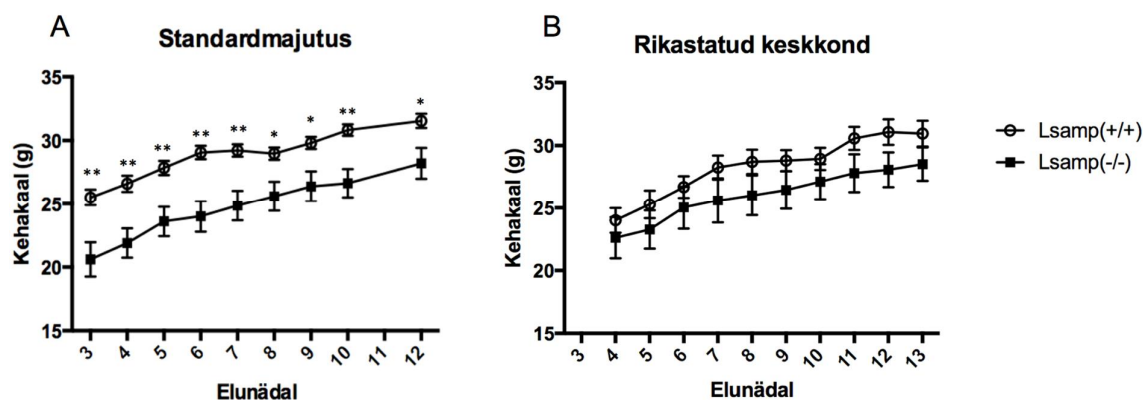
Lsamp-puudulikkusega hiirte DCX-positiivsete rakkude paiknemises kõrvalekaldeid ei esinenud. Nii *Lsamp*-puudulikkusega kui ka wt hiirtel paiknesid DCX-positiivsed rakud valdavalt subgranulaartsoonis, kuid üksikuid rakke oli märgata ka sõmerrakkude kihis (Joonis 11). Kolme ajuga tehtud immunohistokeemilised katsed näitasid, et *Lsamp*-puudulikkusega hiirtel oli märgata rohkem DCX-märgistatud neuroblaste ja ebaküpsid neuroneid kui wt hiirel (Joonis 11, noolepead).



Joonis 11. DCX-märgistatud rakkude paiknemine ja tihedus wt (A) ja *Lsamp*^{-/-} (B) hiirte hipokampuse hammaskäärus. *Lsamp*-puudulikkusega hiirtel on märgata oluliselt rohkem DCX-positiivseid neuroblaste ja ebaküpsid neuroneid kui wt hiirtel. DCX (punane), pHH3 (roheline) ja DAPI (sinine). Noolepead tähistavad DCX-märgistatud rakke. Hil, hiilus; GZ, granulaartsoon ehk sõmerrakkude kiht. Mõõtlõik 60 µm.

2.3.4 Standard- ja rikastatud keskkonnas elavate hiirte kehakaal

Kaalumistulemuste näitavad, et standardmajutuses kasvavate wt ja *Lsamp*^{-/-} hiirte kehakaal sõltub hiirte genotüübist ($p < 0,05$). *Lsamp*^{-/-} hiirte kehakaal on standardmajutuses kasvavatel hiirtel märkimisväärselt madalam kui nende metsiktüüpi pesakonnakaaslastel. Standardmajutuses kasvavate wt hiirte keskmine kehakaal 7. elunädalal oli $29,2 \pm 0,5$ grammi ning *Lsamp*-puudulikud hiired kaalusid keskmiselt $24,9 \pm 1,2$ grammi. Seega oli wt hiirte kehakaal ligikaudu 17% suurem kui *Lsamp*-puudulikkusega hiirtel, viimaseks nädalaks oli kaalude vahe langenud 12%-le (Joonis 12A). Ka rikastatud keskkonnas kasvavate wt ja *Lsamp*^{-/-} hiirte vahel võib märgata kaalu erinevusi, kuid antud erinevus ei osutunud statistiliselt oluliseks (Joonis 12B).



Joonis 12. Erinevate kasvutingimuste mõju kehakaalule. wt ja *Lsamp*-puudulikkusega hiirte kehakaalu võrdlus (A) standard- ja (B) rikastatud keskkonnas. Valged ringid: wt hiired; mustad kastid: *Lsamp*^{-/-} hiired. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

2.4 Arutelu

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli uurida *Lsamp*'i rolli täiskasvanud hiire hipokampuse SGZ neurogeneesis. Uuriti erinevusi wt ja *Lsamp*-puudulikkusega hiirte hipokampuse hammaskääru subgranulaartsooni uute neuronite arvus kahes erinevas kasvukeskkonnas (standard- ja rikastatud keskkonnas).

Varem on näidatud *Lsamp* alternatiivsete promootorite spetsiifilist regulatsiooni hipokampuse erinevates osades. Hammaskääru sõmerrakkude ja CA1 püramidaalrakkude kihis on tuvastatav tugev *Lsamp* 1a transkripti ekspressioon, *Lsamp* 1b transkripti ekspresseritakse peamiselt SGZ-s. Lisaks on näidatud *Lsamp* 1b transkripti ekspressiooni BrdU-positiivsetes hipokampuse hammaskääru SGZ-i rakkudes ning *Lsamp* 1b transkripti taseme tõusu rikastatud keskkonnas kasvanud hiirte hipokampuses, mis viitab LSAMP valgu osalusele neurogeneesis (Heinla jt, 2015). Käesoleva magistritöö eesmärgiks oligi tuvastada, kas LSAMP valk osaleb hipokampaalses neurogeneesis.

Rikastatud keskkonna poolt põhjustatud hipokampaalse neurogeneesi võimendumine on põhjalikult kirjeldatud fenomen. Seda efekti oli märgata mõlema genotüübiga hiire hipokampuses. Mõlema genotüüpi puhul oli rikastatud keskkonnas märgata rohkem uusi neuroneid kui standardmajutuses elavatel hiirtel. Siiski statistiline erinevus ilmnis vaid *Lsamp* -/- genotüübi puhul.

Wt ja *Lsamp*-puudulikkusega hiirte neurogeneesi baastasemete vahel statistiliselt olulist erinevust ei esinenud. Küll aga oli selgelt märgatav genotüüpide vaheline erinevus uute neuronite arvus rikastatud keskkonnas kasvanud loomadel. Rikastatud keskkonnas kasvanud *Lsamp*-puudulikel hiirtel oli oluliselt rohkem uusi neuroneid kui nende metsiktüüpi pesakonnakaaslastel (Joonis 10). Tulemused võivad olla seotud *Lsamp* geeni tuumor-supressori rolliga. Tuumor-supressorgeenide ülesandeks on hoida rakkude jagunemine normaalpiirides. Nad piiravad tuumorite kasvu inhibeerides tuumori rakkude proliferatsiooni ja/või soodustades nende apoptoosi. Seega toob *Lsamp* geeni välja lülitamine kaasa rakkude suurenenud proliferatsiooni.

Ebaküpsete neuronite markeritega tehtud katse tulemusest selgub, et *Lsamp*-puudulikkusega hiirtel neuroblastide ja ebaküpsete neuronite paiknemises kõrvalekaldeid ei esine ning võib oletada, et *Lsamp*-puudulikkusega hiirtel on hipokampuse hammaskäärus rohkem DCX-positiivseid neuronite eellasrakke kui wt katseloomadel (Joonis 11).

Olenemata suurenenud hipokampaalse neurogeneesi tasemest ei ole *Lsamp*-puudulikkusega hiirtel täheldatud muutusi mälus ja õppimisvõimes. Innos jt (2011) näitasid, et *Lsamp*-puudulikkusega hiired tulevad ruumilise mälu testimiseks mõeldud vesilabüridis samaväärselt toime kui nende metsiktüüpi pesakonnakaaslased. Samas Qiu jt (2010) näitasid, et *Lsamp*-puudulikkusega hiirtel on ruumilise mälu seotud õppimisvõime häirunud. Siinkohal võivad tulemuste erinevusi põhjustada *Lsamp*-puudulikkusega hiirte erinev taust. Järgnevad uuringud on vajalikud, et välja selgitada millist mõju omab intensiivistunud hipokampaalne neurogenees *Lsamp*-puudulikkusega hiirte kognitsioonile ning kuidas seda muudab rikastatud keskkond.

Lisaks võrreldi rikastatud keskkonnas ja standardmajutuses kasvanud *Lsamp*-puudulikkusega ja wt hiirte kehakaalusid. Standardmajutuses kasvavate *Lsamp*-puudulikkusega hiirte kehakaal on märgatavalt väiksem kui nende metsiktüüpi pesakonnakaaslastel (Innos jt, 2011). Lisaks on näidatud, et rikastatud keskkonna mõjul hiirte vaheline kehakaalude erinevus kaob (Innos jt, 2012). Läbi viidud kaalumiskatse tulemused langesid kokku varem saadud tulemustega (Joonis 12). Samas Catania jt (2008) ei suutnud tuvastada wt ja *Lsamp*-puudulikkusega hiirte kehakaalude vahel olulist erinevust, mis võib olla põhjustatud erinevate uurimisgruppide poolt kasutatud hiireliinide erinevast taustast. Catania jt (2008) kasutasid C57 tausta viidud *Lsamp*-puudulikkusega hiiri ent meie kasutasime antud töös sarnaselt Innos jt (2011, 2012) poolt kasutatud C57 ja SV segataustaga *Lsamp*-puudulikkusega hiiri.

Antud töö tulemustest lähtuvalt tuleks teha täiendavaid katseid neuronaalsete eellasrakkude-spetsiifiliste markeritega, mis annaksid lisateavet kas genotüüpide vahel esinev neuroblastide ja ebaküpsede neuronite arvu muutus on statistiliselt oluline. Huvitav oleks ka vaadata kas *Lsamp*-puudulikkusega hiirtel esineb muutusi neuronite elulemuses ja apoptoosis. Põhjalikumalt tuleks uurida kas rikastatud keskkond parandab *Lsamp*-puudulikkusega hiirtel kognitiivset võimekust. Edasiste uuringute käigus võiks vaatluse alla võtta lisaks teised IgLON valguperekonna liikmed.

KOKKUVÕTE

Käesoleva magistritöö peamine eesmärk oli selgitada *Lsamp* geeni/valgu osalust täiskasvanud hiire hipokampaalses neurogeneesis. Lähtuvalt töö tulemustest võib teha järgnevad järeldused:

- *wt* ja *Lsamp*-puudulikkusega hiirte hipokampaalse neurogeneesi baastasemete vahel statistiliselt olulist erinevust ei esinenud.
- Mõlema genotüüpi puhul oli rikastatud keskkonnas märgata rohkem uusi neuroneid kui standardmajutuses elavatel hiirtel, kuid see osutus statistiliselt oluliseks vaid *Lsamp*-puudulikkusega hiirte puhul.
- Neuronaaalsete eellasrakkude markeritega tehtud katse tulemustest võib oletada, et *Lsamp*-puudulikkusega hiirtel on hipokampuse hammaskäärus rohkem neuroblaste ja ebaküpseid neuroneid kui nende metsiktüüpi pesakonnakaaslastel.
- *Lsamp*-puudulikkusega ja *wt* hiirtega tehtud kaalumiskatsed näitavad kehakaalu sõltuvust genotüübist. Rikastatud keskkonna mõjul hiirte vaheline kehakaalude erinevus kaob.

Kuna *Lsamp* geen on liikidevaheliselt tugevalt konserveerunud, saab hiirtega tehtud uuringute põhjal teha ka järeldusi *Lsamp* geeni võimaliku funktsiooni kohta inimorganismis. Saadud tulemused kinnitavad *Lsamp* geeni/valgu olulisust neurogeneesis.

The role of *Lsamp* gene/protein in adult mouse hippocampal neurogenesis

Maria Piirsalu

SUMMARY

Adult neurogenesis is a process of generating functional neurons from neural progenitor cells. Neurogenesis was thought to occur only during embryonic stages in the mammalian central nervous system (CNS). Recently it has become generally accepted that new neurons are added in discrete regions of the adult mammalian CNS. In most mammals, active neurogenesis occurs throughout life in the subventricular zone (SVZ) of the lateral ventricle and in the subgranular zone (SGZ) of the dentate gyrus in the hippocampus. Neurons generated in the SVZ migrate anteriorly through the rostral migratory stream (RMS) into the olfactory bulb and become interneurons. New neurons generated in the SGZ migrate to the granular layer (GL).

Adult hippocampal neurogenesis is associated with neural plasticity which allows the brain to adapt to injury and changing environmental conditions (Freund et.al., 2013). Exposure to enriched environment and physical activity increases hippocampal neurogenesis (van Praag et.al., 2000).

Limbic system associated membrane protein (*Lsamp*) is a neural cell adhesion molecule expressed on the neuronal dendrites and somata (Zacco et.al., 1990). Polymorphisms in *Lsamp* gene have been associated with anxiety and broad spectrum of psychiatric disorders. In addition *Lsamp* has been identified as tumor-suppressor gene, being associated with several types of cancer. Recent publications have shown that LSAMP is involved in synaptogenesis in the hippocampal neurons, indicating its role in plasticity (Hashimoto et.al., 2009). Furthermore, environmental enrichment enhances the expression level of *Lsamp* in the SGZ of the dentate gyrus in the hippocampus, which is a known area of enrichment-induced neurogenesis in adult mice (Heinla jt, 2015).

Thus we decided to investigate the putative role of LSAMP in hippocampal neurogenesis. We compared differences in the number of newly generated cells in the dentate gyrus of wt and *Lsamp*-deficient mice living in standard and enriched environment. To describe the level of

neurogenesis we used the BrdU method, which is based on the visualization of replicating cells. The density of neural precursor cells was investigated using the neuroblast marker doublecortin (DCX) and mitosis-specific marker phospho-histone H3 (PHH3). In addition, we also collected body weight data of wt and *Lsamp*-deficient mice living in standard and enriched environment.

The results of the current masters thesis can be summarized as follows

- Basal cell proliferation in the SGZ did not differ between wt and *Lsamp*-deficient mice.
- *Lsamp*-deficient mice exposed to environmental enrichment have significantly higher neurogenesis compared to their wt littermates.
- Immunostaining against DCX revealed that *Lsamp*-deficient mice have more DCX-positive neuroblasts in the SGZ of the dentate gyrus.
- *Lsamp*-deficient mice living in standard housing have consistently lower body weight compared to wt mice. However, the body weights of both genotypes were nearly identical in mice living in enriched conditions.

Based in the results *Lsamp*-deficient mice have more hippocampal progenitors and neurons compared to their wt littermates. *Lsamp* role as a tumor-suppressor gene could be a potential explanation as in the absence of functional *Lsamp* the proliferation rate of cells is enhanced. Therefore *Lsamp* gene is important in normal inhibition of cellular proliferation and when gene expression is lost, loss of normal inhibitory control of the cell cycle occurs.

TÄNUAVALDUSED

Eelkõige tänan oma juhendajaid Kersti Lillevälja ja Tambet Tõnissood oskusliku juhendamise ja konstruktiivsete nõuannete eest. Lisaks tänan kõiki füsioloogia instituudi doktorante, teadureid ja kaasmagistrante, kes on andnud oma panuse antud magistritöö valmimisse. Sealhulgas suured tänusõnad Triin Tekkole ja Toomas Jagomäele igakülgse abi ja sõbraliku toetuse eest. Loomulikult tänan ka oma vanemaid ja lähedasi toetuse, ära kuulamise ja motivatsiooni eest.

KIRJANDUSE LOETELU

A) Artiklid

Akeel, M., McNamee, C. J., Youssef, S., Moss, D. (2011). DigLONs inhibit initiation of neurite outgrowth from forebrain neurons via igLON-containing receptor complex. *Brain Res.* 1374: 27-35.

Ang, E. S. Jr., Haydar, T. F., Gluncic, V., Rakic, P. (2003). Four-dimensional migratory coordinates of GABAergic interneurons in the developing mouse cortex. *J Neurosci* 23: 5805–5815.

Brown, J., Cooper-Kuhn, C. M., Kempermann, G., Van Praag, H., Winkler, J., Gage, F. H., Kuhn, G. (2003). Enriched environment and physical activity stimulate hippocampal but not olfactory bulb neurogenesis. *Eur. J. Neurosci.* 17: 2042-6.

Bultje, R. S., Castaneda-Castellanos, D. R., Jan, L. Y., Jan, Y-N., Kriegstein, A. R., Shi, S-H. (2009). Mammalian Par3 Regulates Progenitor Cell Asymmetric Division via Notch Signaling in the Developing Neocortex. *Neuron.* 63(2): 189-202.

Catania, E. H., Pimenta, A., Levitt, P. (2008). Genetic deletion of Lsamp causes exaggerated behavioral activation in novel environments. *Behav Brain Res.* 188(2): 380-390.

Chen, J., Lui, W. O., Vos, M. D., Clark, G.J., Takahashi, M., Schoumans, J. (2003). The t(1;3)breakpoint-spanning genes LSAMP and NORE1 are involved in clear cell renal cell carcinomas. *Cancer Cell.* 4: 405–413.

Cote, P. Y., Levitt, P., Parent, A. (1995). Distribution of limbic system-associated membrane protein immunoreactivity in primate basal ganglia. *Neuroscience.* 69(1): 71-81.

Doetsch, F., Caille, I., Lim, D. A., Garcia-Verdugo, J. M., Alvarez-Buylla, A. (1999). Subventricular Zone Astrocytes are Neural Stem Cells in the Adult Mammalian Brain. *Cell.* 97(6):703-16.

Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J. M., Alvarez-Buylla, A. (1997). Cellular Composition and Three-Dimensional Organisation of the Subventricular Germinal Zone in the Adult Mammalian Brain. *J Neurosci.* 17(13): 5046-61.

- Ernst, E., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Perl, S., Tisdale, J., Possnert, G., Druid, H., Frisen, J. (2014) Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. *Cell*. 156(5): 1072-83.
- Falkenberg, T., Mohammed, A. K., Henriksson, B., Persson, H., Winblad, B., and Lindfors, N. (1992). Increased expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat hippocampus is associated with improved spatial memory and enriched environment. *Neurosci. Lett.* 138(1): 153–156.
- Franco, S. J., Müller, U. (2013). Shaping Our Minds: Stem and Progenitor Cell Diversity in the Mammalian Neocortex. *Neuron*. 77(1):19-34.
- Freund, J., Brandmaier, A. M., Lewejohann, L., Kriste, I., Kritzler, M., Krüger, A., Sachser, N., Lindenberger, U., Kempermann, G. (2013). Emergence of individuality in genetically identical mice. *Science*. 340: 756-759.
- Ge, S., Yang, C. H., Hsu, K. S., Ming, G. L., Song, H. (2007). A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain. *Neuron*. 54(4): 559-66.
- Gil, O. D., Zhang, L., Chen, S., Ren, Y. Q., Pimenta, A., Zanazzi, G., Hillman, D., Levitt, P., Salzer, J. L. (2002). Complementary expression and heterophilic interactions between IgLON family members neurotrimin and LAMP. *J Neurobiol*. 51(3): 190– 204.
- Gould, E. (2007). How widespread is adult neurogenesis in mammals? *Nat Rev Neurosci*. 8(6): 481-8.
- Grumet, M. (1991). Cell adhesion molecules and their subgroups in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol*. 1(3): 370-6.
- Hashimoto, T., Maekawa, S., Miyata, S. (2009). IgLON cell adhesion molecules regulate synaptogenesis in hippocampal neurons. *Cell Biochem. Funct.* 27: 496–498.
- Hastings, N. B., Seth, M. I., Tanapat, P., Rydel, T. A., Gould, E. (2002). Granule neurons generated during development extend divergent axon collaterals to hippocampal area CA3. *J Comp Neurol*. 452: 324-333.
- Hatten, M. E. (1999). Central nervous system neuronal migration. *Annu Rev Neurosci*. 22: 511-39.

Heinla, E., Leidmaa, E., Kongi, K., Pennert, A., Innos, J., Nurk, K., Tekko, T., Singh, K., Vanaveski, T., Reimets, R., Mandel, M., Lang, A., Lilleväli, K., Kaasik, A., Vasar, E., Philips, MA. (2015). Gene expression patterns and environmental enrichment-induced effects in the hippocampi of mice suggest importance of Lsamp in plasticity. *Front Neurosci.* 9: 205.

Horton, H. L., Levitt, P. (1988). A unique membrane protein is expressed on early developing limbic system axons and cortical targets. *J Neurosci.* 8(12): 4653-61.

Innos, J., Leidmaa, E., Philips, MA., Sütt, S., Alttoa, A., Harro, J., Kõks, S., Vasar, E. (2013). Lsamp^{-/-} mice display lower sensitivity to amphetamine and have elevated 5-HT turnover. *Biochem Biophys Res Commun.* 430(1): 413-8.

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

Innos, J., Philips, MA., Raud, S., Lilleväli, K., Kõks, S., Vasar, E. (2012). Deletion of the Lsamp gene lowers sensitivity to stressful environmental manipulations in mice. *Behav Brain Res.* 228(1): 74-81.

Jessberger, S. ja Kempermann, G. (2003). Adult-born hippocampal neurons mature into activity-dependent responsiveness. *Eur J Neurosci.* 18(10): 2707-12.

Juraska, J. M., Fitch, J. M., Henderson, C., Rivers, N. (1985). Sex differences in the dendritic branching of dentate granule cells following differential experience. *Brain Research.* 333(1): 73-80.

Kempermann, G. ja Gage F. H. (2000) Neurogenesis in the adult hippocampus. *Novartis Found Symp* 231:220-35; discussion 235-41, 302-6.

Koido, K., Janno, S., Traks, T., Parksepp, M., Ljubajev, Ü., Veiksaar, P., Must, A., Shlik, J., Vasar, V., Vasar, E. (2014). Associations between polymorphisms of LSAMP gene and schizophrenia. *Psychiatry Res.* 215(3): 797-8.

Koido, K., Kõks, S., Must, A., Reinmets, A., Maron, E., Shlik, J. (2006). Association analysis of limbic system-associated membrane protein gene polymorphisms in mood and anxiety disorders. *Eur Neuropsychopharmacol.* 16: S9-10.

- Koido, K., Traks, T., Balõtsõev, R., Eller, T., Must, A., Maron, E., Koks, S., Tõru, I., Shlik, J., Vasar, V., Vasar, E. (2012). Associations between LSAMP gene polymorphisms and major depressive disorder and panic disorder. *Transl Psychiatry*. 2: e152.
- Kresse, S. H., Ohnstad, H. O., Paulsen, E. B., Bjerkehagen, B., Shuzai, K., Serra, M. (2009). LSAMP, a novel candidate tumor suppressor gene in human osteosarcomas, identified by array comparative genomic hybridization. *Genes Chromosom Cancer*. 48: 679–693.
- Kriegstein, A. R., Götz, M. (2003). Radial glia diversity: a matter on cell fate. *Glia*. 43(1):37-43.
- Kühn, M. W., Radtke, I., Bullinger, L., Goorha, S., Cheng, J., Edelmann, J. (2012). Highresolution genomic profiling of adult and pediatric core-binding factor acute myeloid leukemia reveals new recurrent genomic alterations. *Blood*. 119(10): e67–75.
- Lazarini, F., Lledo, P. M. (2011). Is adult neurogenesis essential for olfaction? *Trends Neurosci*. 34(1): 20-30.
- Levitt, P. (1984). A monoclonal antibody to limbic system neurons. *Science*. 223(4633): 299-301.
- Lledo, P. M., Alonso, M., Grubb, M. S. (2006). Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat. Rev. Neurosci*. 7: 179–193.
- Lois, C., Alvarez-Buylla, A. (1994). Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science*. 254(5162): 1145-8.
- Marin, O., Rubenstein, J. L. R. (2001). A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nat. Rev. Neurosci*. 11: 780-90.
- Marin, O., Valiente, M., Ge, X., Tsai, L.H. (2010). Guiding neuronal cell migrations. *Cold Spring Harb Perspecct Biol*. 2(2): a001934
- Ming, G-L., Song, H. (2005). Adult Neurogenesis in the Mammalian Central Nervous System. *Annu Rev Neurosci*. 28: 223-50.
- Must, A., Tasa, G., Lang, A., Vasar, E., Kõks, S., Maron, E., Väli, M. (2008). Association of limbic system-associated membrane protein (LSAMP) to male completed suicide. *BMC Med Genet*. 9: 34.

- Pancea, V., Luskin, M. B. (2003). Prenatal development of the rodent rostral migratory stream. *J. Comp. Neurol.* 463: 402-418.
- Pham, T. M., Ickes, B., Albeck, D., Soderstrom, S., Granholm, A. C., and Mohammed, A. H. (1999). Changes in brain nerve growth factor levels and nerve growth factor receptors in rats exposed to environmental enrichment for one year. *Neuroscience.* 94: 279–286
- Philips, M-A., Lilleväli, K., Heinla, I., Luuk, H., Hundahl, C. A., Kongi, K., Vanaveski, T., Tekko, T., Innos, J., Vasar, E. (2014). Lsamp is implicated in the regulation of emotional and social behavior by use of alternative promoters in the brain. *Brain Struct Funct.* 220(3): 1381-93.
- Pimenta, A. F., Fischer, I., Levitt, P. (1996a). cDNA cloning and structural analysis of the human limbic system-associated membrane protein (LAMP). *Gene* 170: 189-195.
- Pimenta, A. F., Levitt, P. (2004). Characterization of the genomic structure of the mouse limbic system-associated membrane protein (Lsamp) gene. *Genomics.* 83: 790-801.
- Pimenta, A. F., Zhukareva, V., Barbe M. F., Reinoso B. S., Grimley, C., Henzel, W., Fischer, I., Levitt, P. (1995). The limbic system-associated membrane protein is an Ig superfamily member that mediates selective neuronal growth and axon targeting. *Neuron.* 15: 287-97.
- Pimenta, A. F., Tsui, L. C., Heng H. H., Levitt, P. (1998). Assignment of the gene encoding the limbic system-associated membrane protein (LAMP) to mouse chromosome 16B5 and human chromosome 3q13.2-q21. *Genomics.* 49(3): 472-4.
- Qiu, S., Champagne, D. L., Peters, M., Catania, E. H., Weeber, E. J., Levitt, P., Pimenta, A. F. (2010). Loss of limbic system-associated membrane protein leads to reduced hippocampal mineralocorticoid receptor expression, impaired synaptic plasticity, and spatial memory deficit. *Biol. Psychiatry.* 68(2): 197-204.
- Rampon, C., Tang, Y. P., Goodhouse J., Shimizu, E., Kyin, M., Tsien, J. Z. (2000). Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nat Neurosci.* 3(3): 238-44.
- Raymont, V., Grafman, J. (2006). Cognitive neural plasticity during learning and recovery from brain damage. *Prog Brain Res.* 157: 199-206.

Reinoso, B. S., Pimenta, A. F., & Levitt, P. (1996). Expression of the mRNAs encoding the limbic system-associated membrane protein (LAMP): I. Adult rat brain. *J Comp Neurol.* 375(2): 274–88.

Rousselot, P., Lois, C., Alvarez-Buylla, A. (1995). Embryonic (PSA) N-CAM reveals chains of migrating neuroblasts between the lateral ventricle and the olfactory bulb of adult mice. *J Comp Neurol.* 351: 51–61

Seri, B., Garcia-Verdugo, J. M., Collado-Morente, L., McEwen, B. S., Alvarez-Buylla, A. (2004). Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. *J Comp Neurol.* 478: 359–378.

Seri, B., Garcia-Verdugo, J. M., McEwen, B. S., Alvarez-Buylla, A. (2001). Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci.* 21: 7153–7160.

Zhukareva, V., Levitt, P. (1995). The limbic system-associated membrane protein (LAMP) selectively mediates interactions with specific central neuron populations. *Development.* 121(4): 1161-72.

Van Praag, H., Kempermann, G., Gage, F.H. (2000). Neural consequences of environmental enrichment. *Nat. Rev. Neurosci.* 1(3): 191-198.

Wang, L., Hauser, E. R., Shah, S. H., Seo, D., Sivashanmugan, P., Exum, S. T., jt. (2008). Polymorphisms of the tumor suppressor gene LSAMP are associated with left main coronary artery disease. *Ann Hum Genet.* 72(4): 443–453.

Yamada, M., Hashimoto, T., Hayashi, N., Higuchi, M., Murakami, A., Nakashima, T., Maekawa, S., Miyata, S. (2007). Synaptic adhesion molecule OBCAM; synaptogenesis and dynamic internalization. *Brain Res.* 1165: 5–14.

B) Raamatud

Taupin, P. 2007. The Hippocampus: Neurotransmission and Plasticity in the Nervous System, lk 4-9. Nova Science Publishers, Inc. New York.

Gilbert, S.F. 2014. Developmental Biology, 10th ed. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts.

Shepherd, G.M., Chen, W.R., Greer, C.A. 2004. Olfactory bulb. In The Synaptic Organization

of the Brain, 5th ed, lk 165–216. Oxford Univ. Press. New York.

Kaufman, M.H. 1994. The Atlas of Mouse Development, revised ed. Elsevier Academic Press. Amsterdam, The Netherlands.

Squire, L., Bloom, F.E., Spitzer, N.C., Berg, D., Lac, S., Ghosh, A. 2008. Fundamental Neuroscience, 3rd ed. Elsevier Academic Press. San Diego, California.

MacLean, P.D. 1990. The Triune Brain in Evolution: Role in Paleocerebral Functions. Plenum Press. New York.

C) Veebiaadressid

<http://www.brain-map.org>

<http://anatomie.vetmed.uni-leipzig.de/external/hippocampus/index.html>

Xinhua Zhang and Guohua Jin (2012). Neurogenesis in Adult Hippocampus, Neural Stem Cells and Therapy, Dr. Tao Sun (Ed.), ISBN: 978-953-307-958-5, InTech, URL:

<http://www.intechopen.com/books/neural-stem-cells-and-therapy/neurogenesis-in-adult-hippocampus>

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Maria Piirsalu

(sünnikuupäev: 28.09.1988)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose
“Lsarp geeni/valgu roll täiskasvanud hiire hipokampaalses neurogeneesis”,
mille juhendajad on Kersti Lilleväli ja Tambet Tõnissoo,
 - 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **25.05.2019** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 25.05.2016