

TARTU ÜLIKOOL
BIOLOOGIA-GEOGRAAFIATEADUSKOND
ZOOLOOGIA JA HÜDROBIOLOOGIA INSTITUUT

Karin Tamm

***BDNF*-i GEENI REGULATSIOON SCHWANNI RAKKUDE ARENGUS**

Magistritöö

Juhendajad: Marko Piirsoo, MSc
Tõnis Timmusk, PhD
Jüri Kärner, PhD

Tartu 2005

Hämmastav hüpotees:

`Sina, Sinu rõõmud ja Sinu kurvastused, Sinu mälestused ja Sinu ambitsioonid, Sinu enese isiksuse tajus ja vaba tahe, ei ole tegelikult midagi muud, kui tohutu hulga närvirakkude ja nendega seotud molekulide koostoime`

Francis Crick (1994)

SISUKORD

SISUKORD	3
SISSEJUHATUS	4
KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1. PERIFEERNE NÄRVISÜSTEEM (PNS)	6
1.1. Müeliini struktuur.....	8
1.2. Schwanni rakkude areng.....	11
2. NEUROTROFIINID	14
2.1. Neurotrofiinide retseptorid	17
2. 1. 1. TrkB lühendatud isovormid	19
2. 2. <i>BDNF</i> -i avaldumise füsioloogia.....	20
2. 3. <i>BDNF</i> geeni struktuur.....	22
2. 4. Troofilised faktorid Schwanni rakkude arengus ja perifeerse närvi regeneereerumisprotsessis.....	24
2. 4. 1. <i>BDNF</i> ja <i>NT-3</i> Schwanni rakkude ja istmikunärvi arengus	27
EKSPERIMENTAALNE OSA	29
TÖÖ EESMÄRGID	29
MATERJALID JA METOODIKA.....	30
1. Roti istmikunärvi (<i>nervus ischiaticus</i>) eraldamine	30
2. Kasutatud rakuliinid	30
2.1. 5% neureguliini (<i>NDF-β</i>) sisaldusega söötme valmistamine.....	31
2.2. Schwanni rakkude kultuuri induksioon.	31
3. RNA eraldamine ja cDNA süntees.....	31
4. RT-PCR ja kasutatud praimerid	32
5. DNA sekveneerimine	34
6. EMSA (<i>Electrophoretic mobility shift assay</i>).....	34
6.1. Erinevate genoomsete järjestuste jaoks kasutati järgmisi praimereid.	34
6.2. Rakuekstraktide valmistamine	37
6.3. Kaheahelaliste DNA oligote (<i>GATA</i> , <i>Sp1</i> , <i>Myt</i>) märkimine [γ - ³² P] ATP-ga	37
6.4. DNA/valk komplekside analüüs.....	38
7. <i>BDNF</i> geeni <i>in silico</i> analüüs	38
TULEMUSED.....	40
1. Primaarsete Schwanni rakkude kultuurid ja nende diferentseerumine	40
2. <i>BDNF</i> -i ja tema retseptorite ekspressioon Schwanni rakkudes	42
3. <i>BDNF</i> -i ja tema retseptorite avaldumine roti istmikunärvi arengus <i>in vivo</i>	44
4. <i>GDNF</i> -i perekonna ja retseptorite ekspressioon Schwanni rakkudes.....	46
5. <i>BDNF</i> geeni I promootorile seostuvate valkkomplekside analüüs	48
6. <i>BDNF</i> geeni V promootorile seostuvate valkkomplekside analüüs	51
7. <i>In silico</i> analüüs Schwanni rakkude arengus reguleeritud <i>BDNF</i> -i promootorite järjestustele	53
ARUTELU	58
KOKKUVÕTE	63
SUMMARY	64
TÄNUAVALDUSED	65
KASUTATUD KIRJANDUS	66

SISSEJUHATUS

Närvisüsteemil on võtmeroll organismi reageerimisel väliskeskkonnast tulenevatele muutustele ja nendega kohanemisel. Närvisüsteem tagab siseelundite täpse ja koordineeritud talitluse ning kooskõlastab kehaosade tegevust. Inimesel on närvisüsteem ühtlasi ka mõtlemise ja üldise psüühilise tegevuse organiks.

Närvisüsteem jaotatakse kesknärvisüsteemiks (KNS) ja perifeerseks närvisüsteemiks (PNS). KNS koosneb peaaugust, mis omakorda jaguneb suur-, väike-, kesk-, vahe-, piklikajuks ning seljaajust. PNS-i moodustavad kõik närvid ja närvipõimikud, mis asuvad väljaspool pea- ja seljaaju. Inimese täiskasvanud närvisüsteem koosneb 10^{11} närvirakust, mis omakorda jagunevad ligikaudu tuhandeks erinevaks rakutüübiks. Kuigi närvisüsteemi rakud varieeruvad omavahel enam kui ühegi teise kehaosa rakud, on neil ühiseid tunnuseid, mis eristab neid muudest keha rakutüüpidest. Morfoloogiliselt koosneb närvirakk rakukehast ning närvirakujätketest: dendriitidest ja aksonist. Rakukeha sisaldab tuuma ning RNA ja valkude sünteesiks vajalikke organelle. Ühel närvirakul on hulganisti harunevaid dendriite, mis toovad rakukehasse informatsiooni teistest närvirakkudest. Igal närvirakul on tavaliselt üks akson, mis elektrilise impulsi vahendusel kannab informatsiooni edasi teisele närvirakule või sihtmärkkoele. Suurim närvirakkude omapära on nende võime erutada, juhtida elektrilist impulssi. Närvirakkude elektrilise potentsiaali muutused on reguleeritudioonkanalite kaudu nende membraanis.

Teiseks tähtsamaks närvisüsteemi rakutüübiks on gliiarakud, mis oma arvu poolest ületavad närvirakke umbes 10 korda. Kuigi närvirakkudel näib olevat närvisüsteemis domineeriv roll, ei funktsioneerid närvirakud ilma gliiata normaalselt. Gliiarakud ümbritsevad, toetavad ja kaitsevad närvirakujätkeid, tagades närviimpulsi kiirema ja efektiivsema edasikandumise. Gliiarakud jagunevad makrogliiaks ja mikrogliiaks. Makrogliia rakkudeks on KNS-s astrotsüüdid ja oligodendrotsüüdid ning PNS-s Schwanni rakud. Mikrogliiaks on makrofaagid ja monotsüüdid, mis eemaldavad surnud kudet närviraku vigastuse või surma korral.

Närvisüsteemi areng ja funktsioneerimine on olnud juba aastasadu üheks mõistatuslikumaks uurimisvaldkonnaks teaduses, kuid selle võimalikud molekulaarsed mehhanismid on hakanud selguma alles viimastel aastakümnetel.

Normaalse ontogeneesi käigus sureb eelnevalt enam kui 50% närvirakkudest. Kuigi valikuline rakkude surm närvisüsteemi kujunemisel on normaalne, põhjustab närvirakkude vähenemine täiskasvanud organismis tõsiste ja pöördumatute neurodegeneratiivsete haiguste teket. Iga raku saatus näib olevat väga täpselt determineeritud, tagades selle funktsioneerimise õigel ajal õiges kohas. Närvirakkude ellujäämine, jätkete pikenemine ja jõudmine sihtmärgini on väga dünaamiline protsess, sõltudes nii rakusisestest kui –välistest teguritest. Valed otsused või valikute puudumine põhjustab raku surma. Selles “olelusvõitluses” mängivad väga olulist rolli troofilised faktorid (kreeka keeles *trophikos* on toit). Need toitvad faktorid võivad olla ekspresseeritud sihtmärkkoe või närvirakkude, samuti gliiarakkude poolt. 1950-ndate aastate avastused panid aluse hüpoteesile, et arenevate närvirakkude sihtmärkrakud produtseerivad limiteeritud koguses toitvaid troofilisi faktoreid, mis seonduvad närvirakujätkete lõpmetele. Sihtmärgile kiiremini jõudvad närvirakud jäävad tänu troofilistele faktoritele ellu, ülejäänud surevad. Üheks troofiliste faktorite perekonnaks on neurotrofiinid. Neurotrofiinid ekspresseeruvad peamiselt närvisüsteemis ning mõjutavad teatud nävirakupopulatsioonide arengut ja ellujäämist. Seni on põhjalikumalt kirjeldatud neurotrofiinide ekspressiooni ja funktsioone KNS-s. Viimastel aastatel on hakatud rohkem tähelepanu pöörama neurotrofiinide olulisusele ka PNS-i arengus ja funktsioneerimises.

Käesoleva töö kirjandusosas antakse ülevaade PNS-i gliiarakkude ehk Schwanni rakkude arengust, kirjeldatakse neurotrofiinide üldisi omadusi ning nende teadaolevaid omavahelisi seoseid. Eksperimentaalses osas keskendutakse ühe paremini kirjeldatud neurotrofiini *BDNF*-i, (*Brain Derived Neurotrophic Factor*) ekspressiooni kirjeldamisele roti istmikunärvi arengus ja eritüübilistes Schwanni rakupopulatsioonides ning uuritakse *in vitro* ja *in silico* *BDNF*-i geeni regulatsiooni nendes rakkudes.

KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1. PERIFEEERNE NÄRVISÜSTEEM (PNS)

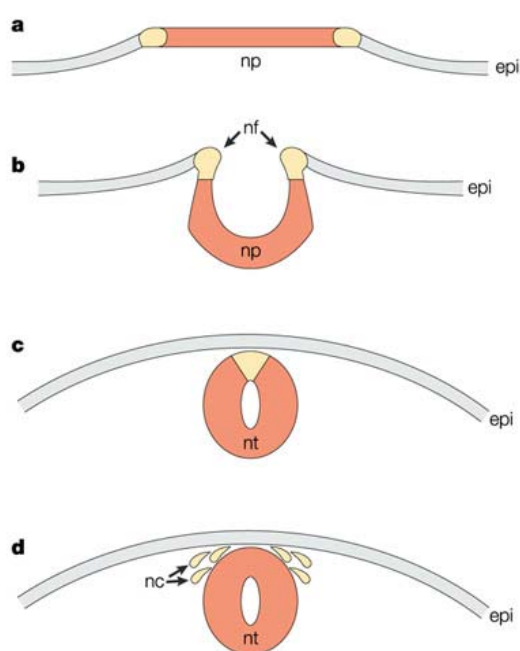
Täiskasvanud PNS-i moodustavad kõik närvirakud ja närvirakupõimikud, mis asuvad väljaspool kesknärvisüsteemi (KNS). PNS-i alla kuuluvad perifeersed närvid, seljaaju läheduses asuvad närvijuured, üle keha ganglionites paiknevad sensoorsed, sümpaatilised ja enteralsed neuronid.

Kõrgematel selgroogsetel organismidel võivad nävirakkude vahelised kaugused ulatuda meetripikkusteks ning organismi normaalseks funktsioneerimiseks on sealjuures oluline informatsiooni kiire edasikandumine. Kiire signaliseerimine nävirakkude vahel on võimalik tänu müeliinile, mis ümbritseb aksoneid ja tagab ülikiire elektriimpulsi juhitavuse. Müeliinkest on laminaarne membraanne organell ümber nävirakujätke. KNS-s moodustavad müeliinkesta oligodendrotsüüdid ja PNS-s on müeliniseerivateks rakkudeks Schwanni rakud. Schwanni rakkudel on lisaks müeliini moodustamisele oluline roll ka perifeerse närvi arengus ja regenererumisel (Jessen and Mirsky, 1999).

Erinevalt KNS-st on PNS-il harukordne võime peale kahjustust regenereruda ning taastada normaalsed motoorsed ja sensoorsed funktsioonid. Perifeerse närvi läbilõike tulemusel vigastatud piirkonnas akson taandareneb ja müeliin laguneb. Järgneb kahjustatud aksoni ja müeliinkihi jääkide eemaldamine makrofaagide poolt ning algab Schwanni rakkude regenererumisprotsess (Tona et al., 1993). Schwanni rakud hakkavad taas prolifereeruma ning sünteesima kasvufaktoreid, sealhulgas NGF-i ja BDNF-i, mis toetavad nävirakujätke kasvukoonuse taastumist (Meyer et al., 1992).

Selgroogsete närvisüsteem saab alguse ektodermist, millest kujuneb neuraalplaat. Neurulatsiooni käigus neuraalplaadi servad kerkivad kurdudena, moodustavad neuraalvaio, mis hiljem sulgub neuraaloruks. Neuraalorust arenevad erinevad kesknärvisüsteemi osad. Neuraaloru ja epidermise vahele moodustub neuraalhari (Joonis 1). Neuraalharja eellasrakkude diferentseerumine sõltub suuresti ümbritsevast rakukeskkonnast (Le Douarin et al., 2004). Neuraalhari moodustub pluripotentsetest rakkudest, mis on võimelised migreeruma ja diferentseeruma erinevateks rakutüüpideks, sealhulgas perifeerse närvisüsteemi (PNS) neuroniteks, gliiarakkudeks, melanotsüütideks ja endokriinseteks rakkudeks.

Esmased andmed PNS närvisüsteemi arengust pärinevad põlvvuti *Coturnix coturnix japonica* ja kana *Gallus gallus* neuraalharja kimääridega tehtud eksperimentidest, kus rakkude liikumine on hästi jälgitav tänu Le Douarini markeritele põlvvuti tuumades (Le Douarin, 1980). Nicole Le Douarin näitas, et PNS eellasrakkude siirdamine neuraalharjast mõnda teise embrüonaalsesse regiooni tagab organismi normaalse arengu ega sõltu rakkude esialgselt päritolust (Le Douarin, 1980).



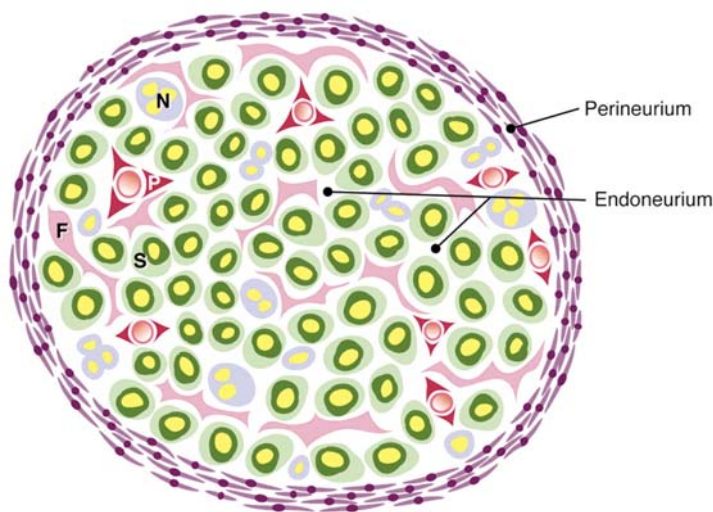
Nature Reviews | Genetics

Joonis1. Neuraalharja rakkude moodustumine. a) peale gastrulatsiooni tekib epidermisesse (epi) neuraalplaat (np) b) neuraalplaadi servad (nf) hakkavad sulguma c) moodustub neuraaltoru (nt) d) neuraaltoru ja epidermise vahele moodustuvad neuraalharja (nc) rakud. Joonis adapteeritud (Knecht and Bronner-Fraser, 2002).

1.1. Müeliini struktuur

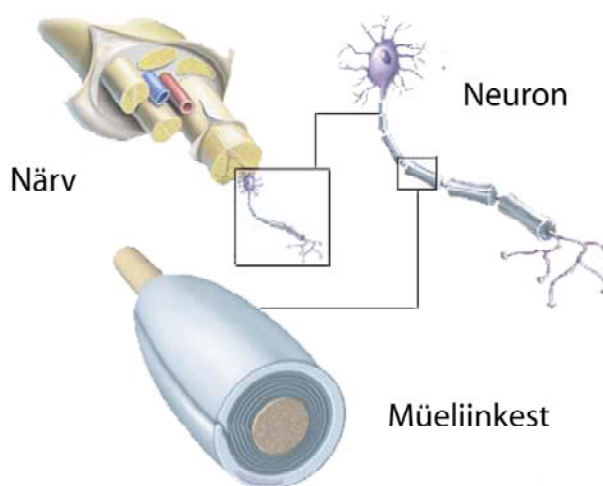
Kui imetajate KNS-i pea ja seljaaju on mehaaniliselt kaitstud vastavalt kolju ja selgrooga, siis

PNS närvifiibrid on välismõjude eest kaitstud kompaktsel sidekoelisel maatriksil, millel on kolm kihti: epineurium, perineurium ja endoneurium. Sidekoelised struktuurid ühendavad närvikiud kaabeljateks koondisteks - närvideks. Närvikiud paiknevad närvis eri suurusega kimpudena ehk fastsiikulitena. Fastsiikuleid katab ümbrisena perineurium, kiude isekeskis liidab endoneurium (Joonis 2). Endoneurium koosneb fibroblastidest ja peamiselt piki närvikiudusid paralleelselt jooksvatest kollageensetest kiududest. Epineurium seob kimbud närvideks. Epineurium koosneb kohevast sidekoest fibroblastide ja sidekoekiududega ning rasvarakkudest. Närvikatted on närvikiududele mehaaniliseks kaitseks ja toeks ning ka difusioonibarjääriks (Bunge et al., 1989) (Joonis 3).



Joonis 2. Perifeerset närvi ümbritsev koemaatriks. Närvikiude isekeskis liidab endoneurium, närvikimpe ümbritseb perineurium. N-närvirakk, S-Schwanni rakk, F-fibroblast, P- veresoont ümbritsev peritsüüt (Joseph et al., 2004).

Endoneuriumi sees paiknevad Schwanni rakkudega ümbritsetud aksonid. Üks müeliniseeruv Schwanni rakk moodustab kontakti ühe aksoniga ning keerdub selle ümber (Joonis 3). Piki aksonit jääb kahe järjestikuse Schwanni raku vahele väike vahe, kus akson on rakuvälisele keskkonnale avatud. Müeliinivabasid kohti Schwanni rakkude vahel nimetatakse vastavalt nende avastaja järgi Ranvier' soonisteks (Joonis 3). Ranvier' soonistesse on koondunud kõrges kontsentratsioonis Na⁺-kanaleid ja Na⁺/K⁺ pumpasid, mis tagavad aktsioonipotentsiaali kiire „hüppamise“ mööda närvifibrit. Ranvier' sooniste kõrval asuvaid müeliini piirkondi nimetatakse paranodaalseks regioonideks ja müeliini keskmist osa internodaalseks alaks.



Joonis 3. Perifeerne närv. Sidekoega kaetud närvi sees paiknevad närvikiud, mis koosnevad aksonitest. Närvirakk on ümbritsetud müeliinkestaga, mille moodustavad PNS-s Schwanni rakud. Kahe Schwanni raku vahele jääb Ranvier' soonis.

Müeliin jaguneb koostiselt kompaktselt ja mittekompaktseks, varieerudes oma valgulise koostise poolest. Kompaktne müeliin moodustab suurema osa müeliinkestast, paiknedes internodaalses osas. Mittekompaktset müeliini võib leida müeliinkesta külgmistes alades ehk paranodaalsetes osades ning Schmidt-Lantermani müeliini sälkudes.

PNS kompaktnen müeliin on lipiidirikas, koosnedes peamiselt kolesteroolist ja sfingolipiididest (Hudson 1990) ning lisaks valkudest: P0 (*protein zero*), PMP-22 (*peripheral myelin protein*) ja MBP (*myelin basic protein*).

P0 on kõige laialdasemalt PNS-i müeliinis esinev valk ning selle avaldumine on omane ainult Schwanni rakkudele. P0 paikneb kompaktses müeliini internodaalsetes osades, moodustab omavahel tetrameere ning hoiab koos müeliini erinevaid kihte (Shapiro et al., 1996) (Joonis 4).

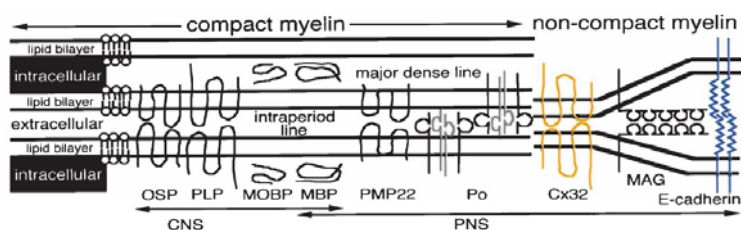
PMP-22 on kompaktses müeliini transmembraanne valk, mille täpne funktsioon pole veel teada. Struktuurilt meenutab PMP-22 ionikanalit ja rakuväline osa näib olevat adhesiivsete omadustega (Suter and Snipes, 1995) (Joonis 4).

Kolmas PNS-i kompaktses müeliinis esinev valk on MBP, mis avaldub ka KNS-i oligodendrotsüütides. MBP paikneb tsütoplasmas. Oma kõrge positiivse laengu tõttu võib MBP reageerida happeliste lipiididega ning mõjutada plasmamembraani konformatsiooni (Staugaitis et al., 1996) (Joonis 4).

Tsütoplasmarikkamad piirkonnad mittekompaktses müeliinis sisaldavad teisi valke, nagu müeliiniga seotud glükoproteiin (MAG- *myelin associated glycoprotein*), E-kadheriin, $\alpha 6\beta 4$ integriin ja konneksiin 32. MAG ja E-kadheriin on mõlemad transmembraansed valgud. E-kadheriin aitab koos hoida mittekompaktses müeliini erinevaid Schwanni rakkude kihte (Fannon et al., 1995). MAG paikneb aksoniga külgnevas Schwanni raku kihis ehk mesaksonis ja arvatavasti omab stabiliseerivat rolli aksoni ja mesaksoni vahel (Li et al., 1994) (Joonis 4).

$\beta 4$ ja $\alpha 6$ integriinid moodustavad heterodimeere Schwanni rakkude pealmises kihis, mis kontakteerub basaalmembraaniga. Arvatakse, et nad on laminiini retseptorid Schwanni rakkude pinnal ning vahendavad rakusisest ras-MAPK signaalirada (Mainiero et al., 1996).

Konneksiin 32 paikneb Schmidt-Lantermani müeliini perioodilistes katkestustes ja paranodaalsetes osades. Konneksiin-32 moodustab auk- ehk sideliiduseid Schwanni rakkude kihtide vahel, mis võimaldavad madalama molekulmassiga valkudel liikuda otse kõrvalolevatesse kihtidesse (Scherer et al., 1995) (Joonis 4)



Joonis 4. Müeliini valkude lokalisatsioon kompaktses ja mittekompaktses müeliinis (Joonis adapteeritud Scherer et al., 1995).

1.2. Schwanni rakkude areng

Schwanni rakkude arengus võib morfoloogiliselt ja bioloogiliselt eristada kolme staadiumit. Esmalt toimub rakkude liikumine neuraalharjast ning embrüonaalsete närvikimpude moodustumine. Aksonitega seotud rakud eristuvad neuraalharja rakkudest, kujunedes Schwanni rakkude eellasteks (Jessen and Mirsky, 1991). Eellasrakud kontakteeruvad üksteisega, moodustades suuri kimpe ümber aksonite. Oluline omadus eellasrakkude eristamiseks neuraalharja rakkudest ja küpsetest Schwanni rakkudest ilmneb eellasrakkude eraldamisel aksonitest. Eellasrakud surevad mõne tunni jooksul ilma neuraalse toetuseta (Jessen et al., 1994), seega vajavad nad ellujäämiseks närvirakkude toetust. Ühed kõige paremini kirjeldatud närvirakkude poolt ekspresseeritavad kasvufaktorid on neureguliinid (NRG-d), mis vahendavad oma signaali läbi türosiinkinaasest aktiivsust omavate ErbB retseptorite. Schwanni rakkude arengu jooksul ekspresseeruvad Erb-2 ja Erb-3 (Burden and Yarden, 1997). NRG-1 reguleerib neuraalharja rakkude ja Schwanni rakkude diferentseerumist läbi heterodimeerse retseptorkompleksi ErbB3/ErbB2 (Garratt et al., 2000).

Järgmises etapis toimub Schwanni rakkude üleminek eellastest embrüonaalseteks rakkudeks, mis rotil leiab aset E14-E17. Embrüonaalsed Schwanni rakud hakkavad suurte närvikimpude asemel looma aksonitega üks-ühest kontakti. *In vitro* võib embrüonaalseid Schwanni rakke nende eellasrakkudest eristada lisaks morfoloogilistele muutustele mitmete molekulaarsete markerite abil. Molekulaarsete markerite näideteks on Ca^{2+} siduv valk S100, Galactotserebrosiid (GalC) ja sulfatiidi valgu antigeen O4 (Jessen and Mirsky, 1991). Kõige märkimisväärsem erinevus eelasrakkude ja embrüonaalsete rakkude vahel on viimaste võime ellu jääda ilma neuraalse toetuseta. Embrüonaalsed Schwanni rakud omavad autokriinset tagasisidet, mis tagab nende iseseisva ellujäämise (Jessen and Mirsky, 1994). Võimalike ellujäämisfaktoritena selles Schwanni rakkude arengustaadiumis on kirjeldatud insuliini-sarnast kasvufaktorit (IGF-1/-2), vereliistaku vahendatud kasvufaktorit BB (PDGF-BB) ja neurotrofiin 3-e (NT-3) (Meier et al., 1999).

Schwanni rakkude arengu kolmas staadium on nende diferentseerumine müeliniseerivateks või mittemüeliniseerivateks rakkudeks. Siinkohal mängib olulist rolli akson ning eriti selle diameeter. Suurema kui 1µm läbimõõduga aksonid müeliniseeritakse, väiksema diameetriga aksonid ümbritsetakse mittemüeliniseerivate Schwanni rakkude poolt. Aksoni läbimõõd on omakorda reguleeritud tema poolt innerveeritava koe suurusega. Küpsed Schwanni rakud saavutavad aksonitega 1:1 suhte, kus üks Schwanni rakk müeliniseerib ainult ühte aksonit,

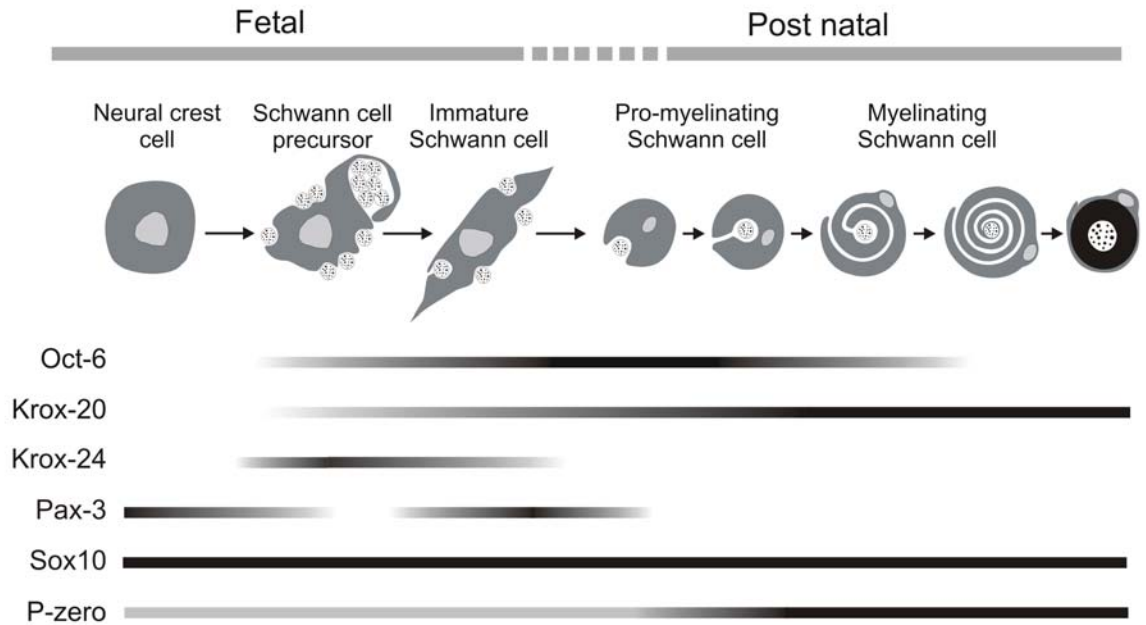
vastupidiselt oligotendrotsüütidele KNS-s, mis on võimelised müeliniseerima mitmeid aksoneid korraga. Vastastikune signaliseerimine aksoni ja Schwanni raku vahel tagab promüeliniseeriva fenotüübi muutumise ja müeliini lõpliku kujunemise (Bunge, 1994).

Schwanni rakkude diferentseerumise käigus toimub müeliinispetsiifiliste geenide aktivatsioon. Müeliniseerimisel mängivad olulist rolli transkriptsioonifaktorid Sox-10, Pax-3, Oct-6, Krox-24 Krox-20 ja NFκB (Joonis 5). Transkriptsioonifaktor Sox-10 on oluline juba gliiarakkude varases arengus neuraalharjas ning selle avaldumise tase jääb kõrgeks ka Schwanni rakkude hilisemates arengustaadiumites. Sox-10 seondub teiste Schwanni rakkude arengus oluliste transkriptsioonifaktoritega, nagu Pax-3, POU-domääni faktor Oct-6 ja tsink-sõrme valk Krox-20-ga, mõjutades nende regulatoorset aktiivsust (Kuhlbrodt et al., 1998). Pax-3 omab regulatoorset ekspressioonimustrit Schwanni rakkudes. Esmalt on Pax-3 ekspressioon detekteeritav neuraalharja rakkudes. Järgnevalt tuleb Pax-3 ekspressioon esile embrüonaalsetes rakkudes ning jääb püsima mittemüeliniseerivates Schwanni rakkudes (Kioussi et al., 1995) (Joonis 5).

Embrüonaalsetes Schwanni rakkudes on kõrgelt ekspresseerunud ka transkriptsioonifaktor NFκB. Hiljem NFκB ekspressioon järk järgult väheneb ning puudub täiskasvanu staadiumis. NFκB subühiku p65 null-mutantses hiires on müeliini moodustumine märkimisväärselt vähenenud. NFκB ekspressiooni inhibeerimisega takistatakse ka müeliini moodustamiseks vajaliku transkriptsioonifaktori Oct-6 ekspressiooni. Seega NFκB on üks oluline faktor Schwanni rakkude üleminekul promüeliniseerivatest rakkudest müeliniseerivateks (Nickols et al., 2003).

Oct-6 ja Krox-20 (nim ka Erg-2) on olulised normaalseks müeliniseerimiseks *in vivo* (Mirsky and Jessen, 1999). Oct-6 null-mutantsel hiirel on müeliniseerimine maha jäänud ning Krox-20 null-mutantsel hiirel puudub hoopis (Topilko et al., 1994). Krox-20 on vajalik Schwanni rakkude üleminekuks promüeliniseerivast fenotüübist müeliniseerivaks (Topilko et al., 1994). Oct-6 ekspresseerub promüeliniseerivates Schwanni rakkudes ajaliselt natukene varem kui Krox-20. Krox-20-ga samasse perekonda kuulub teine tsink-sõrme transkriptsioonifaktor Krox-24, mis ekspresseerub vahetult enne Krox-20-t promüeliniseerivates Schwanni rakkudes. Müeliniseerimisprotsessi alates Krox-24 ekspressioon kaob müeliniseerivates Schwanni rakkudes, kuid säilib mõneti mittemüeliniseerivates Schwanni rakkudes (Topilko et al., 1997)

Oct-6 ekspressioon on indutseeritud hetkel, kui Schwanni rakud hakkavad looma üks-ühed kontakti laia kalibriga aksonitega ning müeliniseerimisprotsessi jätkudes selle ekspressioon väheneb (Blanchard et al., 1996)(Joonis 5).

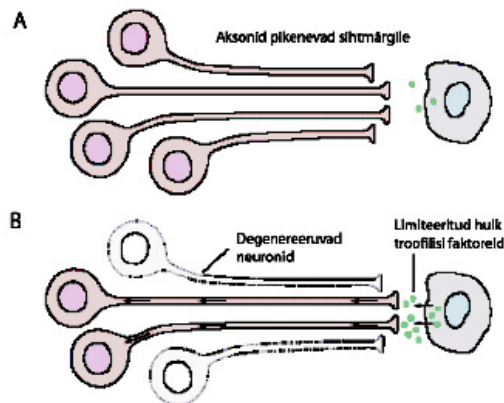


Joonis 5. Schwanni rakkude arengus ekspresseeruvad transkriptsioonifaktorid (Joonis adapteeritud Topilko ja Meijer, Glial Cell Development 2001).

2. NEUROTROFIINID

Närvisüsteemi arengu jooksul toodetakse neuroneid suures ülehulgas ning enam kui pooled nendest surevad. Närvirakud vajavad oma ellujäämiseks sihtmärkkoe sekreteeritavaid troofilisi faktoreid. Sihtmärkkoe sekreteerivad toitvaid faktoreid piiratud koguses ning neuronite vahel toimub nende pärast nii-öelda võistlus. Ilma troofilise toetuseta närvirakud degenerereeruvad. Seega on troofiliste faktoriteni jõudmine närviraku jaoks elu ja surma küsimus. Erinevate troofiliste faktoritega tagatakse spetsiifiliste närvirakupopulatsioonide ellujäämine (Joonis 6).

Üheks paremini kirjeldatud troofiliste faktorite perekonnaks on neurotrofiinid. Neurotrofiinide perekonda kuulub neli liiget: NGF, BDNF, NT-3 ja NT-4/5. Lisaks retrograadsele ekspressioonile sihtmärkkoe poolt võivad neurotrofiinid olla ekspresseeritud ka anterograadselt närviraku poolt. Neurotrofiinidel on närvisüsteemi arengus ja funktsioneerimises väga oluline roll, tagades närvirakkude ellujäämise, diferentseerumise, sünaptilise plastilisuse. Häired neurotrofiinide ekspressioonis põhjustavad nendest sõltuvate närvirakkude suremist, mis omakorda viib teatud neurodegeneratiivsete haiguste kujunemisele, nagu näiteks närvirakkude vähenemine juttkehas (*striatum*) põhjustab Huntingtoni haigust (Zuccato et al., 2001), mustuumas Parkinsoni haigust (Altar et al., 1992), ajukoores ja hipokampuses Alzheimeri haigust (Fahnestock et al., 2002).



Joonis 6. Neurotrofiinide hüpotees. Närvirakud pikendavad oma aksoneid sihtmärgi poole. Sihtmärkrakud sekreteerivad limiteeritud koguses troofilisi faktoreid. Ilma troofilise toetuseta närvirakud degenerereeruvad. (Joonis adapteeritud Reichardt ja Farinas, 1997).

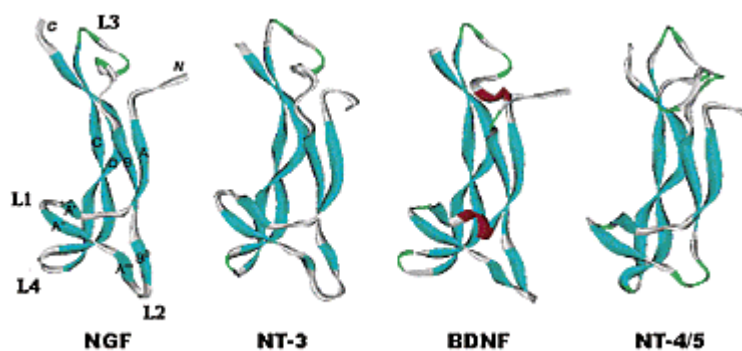
Esimene troofiline faktor avastati juba aastal 1952 itaalia naisteadlase Rita Levi-Montalcini poolt ning nimetati vastavalt oma omadustele närvi kasvu faktoriks (NGF)(Levi-Montalcini, 1987; Levi-Montalcini et al., 1954). Hiire kasvajakude süstimine kana embrüosse põhjustas kana embrüo spinaalganglionite närvirakufiibrите väljakasvu ja pikenemise. NGF eraldati ja sadestati aastal 1956 hiire kasvajakudest, mille kultuuri oli lisatud rästiku mürki (Cohen and Levi-Montalcini, 1957). Tänapäevaks on NGF hästi kirjeldatud troofiline faktor, mis vastutab spetsiifiliste perifeersetes närvirakupopulatsioonide ellujäämise ja säilitamise eest. Samuti tagab NGF koliinergiliste neuronite arengu ja ellujäämise KNS-s (Levi-Montalcini, 2004). Levi-Montalcini ise on nimetanud NGF-i etturiks närviteaduse malelual.

NGF (-/-) null-mutantsel hiirel on vähenenud närvirakkude hulk sensoorsetes ja sümpaatilistes ganglionites, samuti spinaalganglionites (Crowley et al., 1994).

Järgmine neurotroofiline faktor eraldati sea ajast ning see sai nimeks BDNF (*Brain Derived Neurotrophic factor*) (Barde et al., 1982). Kirjeldati BDNF-i võimet toetada embrüonaalse kana sensoorsete neuronite ellujäämist ja jätkete väljakasvu võimendamist. BDNF sarnaneb nii struktuurilt kui funktsioonilt NGF-le. BDNF toetab erinevate neuronite ellujäämist ja kasvu, sealhulgas spinaalganglionite (Acheson et al., 1995) ning hipokampaalseid ja kortikaalseid neuroneid (Huang and Reichardt, 2001). BDNF (-/-) hiir sureb teisel või kolmandal postnataalsel nädalal ning tal esineb perifeersetes sensoorsetes neuronite degeneratsiooni tõttu märkimisväärsed koordinatsiooni ja tasakaaluhäireid (Ernfors, Lee et al. 1994). Heterosügootne BDNF (+/-) hiir on elujõuline, kuid mitmete iseäralike fenotüübiliste tunnustega nagu ülekaalulisus (Kernie et al., 2000; Lyons et al., 1999), vähenenud kalduvus epileptilistele atakkidele (Kokaia et al., 1995) ja halvem ruumiline õppimisvõime (Linnarsson et al., 1997). BDNF füsioloogiat ja geeni struktuuri kirjeldatakse põhjalikumalt alljärgnevalt.

Lähtuvalt struktuursetest homoloogiast ja troofilistest omadustest on lisaks NGF-le ja BDNF-le kirjeldatud veel kahte neurotrofiini: neurotrofiin-3 (NT-3) (Ernfors et al., 1990; Hohn et al., 1990; Maisonpierre et al., 1990) ja neurotrofiin-4 (NT-4/5) (Berkemeier et al., 1991; Ip et al., 1992). Mõlemad nii NT-3 kui ka NT-4 toetavad neuraalharjast pärit embrüonaalsete sensoorsete neuronite ellujäämist *in vitro*. NT-3 (-/-) null-mutantsed hiired surevad vahetult peale sünni (Ernfors et al., 1994). Neil puudub suur osa perifeersetest sensoorsetest ja sümpaatilistest neuronitest. NT-4 (-/-) homosügootsed null-mutantsed hiired on elujõulised, kuid neil on vähenenud perifeersetes sensoorsetes neuronite hulk (Liu et al., 1995).

Neurotrofiinid on kaladest imetajateni evolutsiooniliselt väga kõrgelt konserveerunud (Hallbook et al., 1991). Neurotrofiinide primaarstruktuur sarnaneb omavahel ~50%, veidi madalama homoloogiaga teiste suhtes on NT-4/5. Lisaks primaarstruktuurile on neurotrofiinidel veel teisigi sarnaseid omadusi. Struktuuriselt sisaldavad neurotrofiinid kolme paari antiparalleelset β -lehte, mis on ühendatud nelja β -juuksenõela aasaga. Valgu südamiku moodustavad kolm disulfiidsilda, mis moodustuvad kõrgelt konserveerunud tsüsteiinide vahel (Joonis 7). Kõik neurotrofiinid sünteesitakse esialgu eellasvalkudena, mis peale proteolüütilist lõikust on molukulmassiga 13.2-15.9 kDa. Oma funktsiooni vahendavad neurotrofiinid dimeeridena.



Joonis7. Neurotrofiinide NGF, NT-3, BDNF ja NT-4/5 monomeeride struktuurid. Näidatud on L1-L4 juuksenõela aasad (Joonis adapteeritud Pattarawarapan and Burges, 2003).

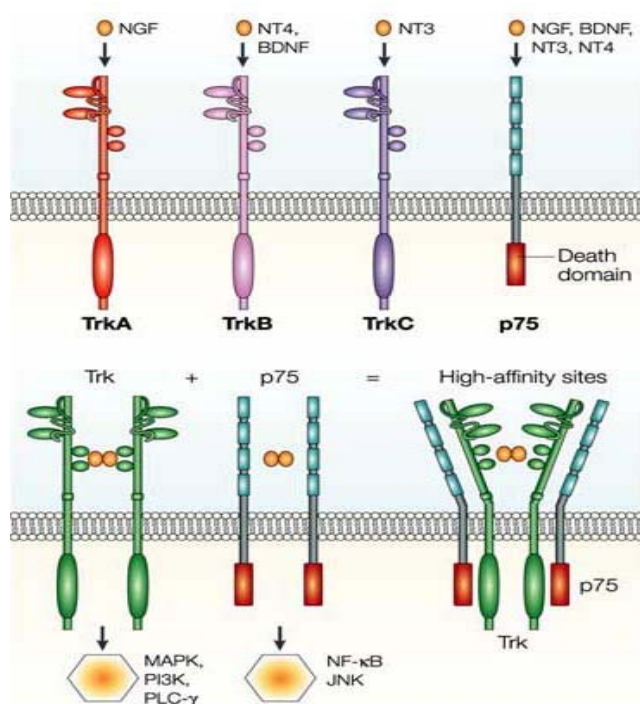
2.1. Neurotrofiinide retseptorid

Neurotrofiinid vahendavad oma signaali kahte tüüpi rakupinnaretseptorite kaudu, Trk retseptor türosiinkinaaside ja tuumor nekroosi faktorite (TNF) superperekonna retseptori NGFR (*nerve growth factor receptor*, nimetatakse ka NTR^{NTRp75} või lihtsalt p75) (Segal and Greenberg, 1996)(Joonis 8).

Läbi Trk retseptorite vahendatakse peamiselt positiivseid bioloogilisi signaale, nagu närvijätkete väljakasv, närvirakkude ellujäämine ja diferentseerumine. Iga neurotrofiin seondub kõrge afiinsusega vastavale Trk retseptorile. NGF seondub spetsiifiliselt TrkA-le, BDNF ja NT-4/5 seonduvad eelistatult Trk-B-le ja NT-3 TrkC-le. Antud selektiivsus ei ole absoluutne, kuna NT-3 seondub ka madalama afiinsusega TrkA-le (Ibanez, 1994; Ibanez, 1998) (Joonis 8). Ligandi seondues retseptorid dimeriseeruvad ning autofosforüleerivad üksteise rakusiseseid türosiini järjestusi. Fosforüleeritud türosiinijäägid on mitmete spetsiifiliste rakusiseste signaalmolekulide seondumiskohtadeks, nagu näiteks fosfolipaas C (PLC γ), p85 (PI-3 kinaasi mittekatalüütiline ühik) ja Shc (Patapoutian and Reichardt, 2001). Viimased vahendavad edasisi rakusiseseid signaali kaskaade, nagu Ras-MAPK ja CREB fosforüleerimine (Patapoutian and Reichardt, 2001).

Kõik neli neurotrofiini seonduvad madalama afiinsusega NGFR-le, mis vastupidiselt Trk-le ei ole kinaasse aktiivsusega (Roux and Barker, 2002)(Joonis 8). Oma rakuvälises osas omab NGFR nelja tsüsteiini kordust (Smith et al, 1994) ja rakusiseses osas surma domääni, mis on omane kõigile TNF perekonna retseptoritele ning reguleerib valdavalt raku surma (Bamji et al., 1998). Koos Trk retseptoritega tagab NGFR neurotrofiinide spetsiifilisema seondumise. Moodustub retseptorite tetrameerne kompleks kahest NGFR-st ja kahest Trk retseptorist. Arvatavasti moduleerib NGFR Trk-retseptorite rakusisest fosforüleerimisprotsessi ja edasist signaalirada (Huang and Reichardt, 2001). Lisaks Trk seondumisele on näidatud NGFR kompleksi lingo-1 ja Nogo retseptoriga (NgR), mille vahendusel inhibeeritakse müeliini regeneratsiooniprotsesse (Wang et al., 2003; Wong et al., 2002). Hiljuti lisandus NGFR koretseptorite ritta sortilin (kuulub Vps10p perekonda), mis sorteerib raku membraanis retseptoreid sekreteeritavatele molekulidele (Mazella, 2001). NGFR-il on omab närvisüsteemis üsna erinevad, isegi vastakad rollid, soodustades neuraalset diferentseerumist ja ellujäämist, inhibeerides regeneratsiooni ning vahendades rakkude apoptoosi.

Ainiti juba viimase paari aasta jooksul on erinevad publikatsioonid kirjeldanud NGFR võimet toetada (Bentley and Lee, 2000) või inhibeerida (Yamashita et al., 2002) aksonite kasvu, võimendada (DeFreitas et al., 2001) või alla suruda (Troy et al., 2002) neuraalset ellujäämist ning vajalikkust (Boyd and Gordon, 2001) või ebaolulisust (Sond et al., 2004) neuraalse regeneratsiooni inhibeerimisel.



Nature Reviews | Neuroscience

Joonis 8. Neurotrofiinid ja nende retseptorid. Neurotrofiinid seonduvad spetsiifiliselt Trk retseptoritele, vastavalt NGF TrkA-le, BDNF ja NT-4/5 TrkB-le ja NT-3 TrkC-le. Kõik neurotrofiinid seonduvad madalama afiinsusega NGFR-le (joonisel p75). Trk ja NGFR retseptorid kombinatsioonis moodustavad veel kõrgema afiinsuse neurotrofiinidele. NGFR ja Trk-d vahendavad erinevaid rakusiseseid signaaliradu (Chao et al., 1998).

2. 1. 1. TrkB lühendatud isovormid

BDNF ja NT-4 retseptori TrkB alternatiivse mRNA splaissingu tagajärjeks on kolm erinevat isovormi (Klein et al., 1989; Soppet et al., 1991). Lisaks täispikale TrkB retseptorile esineb kaks rakusiseselt lühemat isovormi, TrkBT1 ja TrkBT2 (Klein et al., 1990; Middlemas et al., 1991). TrkB lühendatud isovormid sarnanevad oma struktuurilt täispikale TrkB-le, välja arvatud rakusisene domään, mille kinaasne osa on asendatud unikaalse lühikese aminohappelise järjestusega (Klein et al., 1990; Middlemas et al., 1991). Lühendatud TrkB füsioloogilised funktsioonid pole täpselt teada, aga on näidatud nende võimet inhibeerida täispika TrkB signaliseerimist (Biffo et al., 1995; Eide et al., 1996; Li et al., 1998). T1 ja T2 isovormid on samuti võimelised siduma ligande (BDNF, NT-4) ja seega vähendavad nad täispikale isovormile võimalike ligandide seondumist. Kuigi TrkB-T1 on võimeline siduma BDNF-i, ei mõjuta see BDNF-ist sõltuvate geenide ekspressiooni (Offenhauser et al., 2002). Lühendatud TrkB isovormid ekspresseeruvad peamiselt gliiarakkudes ja teistes aju mitteneuraalsetes kudedes, samas täispikal TrkB-l on laialdane ekspressioon peamiselt närvirakkude (Cabelli et al., 1996). Siiani pole näidatud lühendatud TrkB isovormide otseselt võimet vahendada kiiret rakusisest signaliseerimist, kuid juba väike BDNF kogus põhjustab astrotsüütides, mis ekspresseerivad eelistatult TrkB-T1 isovormi, rakusisese Ca^{2+} vabanemist endoplasmaatilisest retiikulumist (Rose et al., 2003).

TrkB lühendatud isovormid võivad käituda kui dominant negatiivsed retseptorid. Trk perekonna retseptorite aktivatsioon eeldab ligand-indutseeritud retseptorite dimerisatsiooni ning kahe kinaasse domääni üksteise fosforüleerimist (Klein et al., 1991). Kinaasse domääniga täispika TrkB isovormi heterodimeer lühendatud isovormiga inhibeerib türosiinkinaasest autofosforülatsiooni. Seega TrkBT1 ja TrkBT2 käituvad kui dominant negatiivsed retseptorid. Lisaks on inimese ajust leitud veel TrkB-Shc isovorm, millel puudub samuti rakusisene kinaasne aktiivsus, kuid membraani lähedases alas esineb Shc seondumiskoht. Shc isovorm ekspresseerub peamiselt ajus, aga selle bioloogilised funktsioonid pole veel täpselt teada (Stoilov et al., 2002).

2. 2. *BDNF*-i avaldumise füsioloogia

BDNF-i geeni avaldumise füsioloogilisel regulatsioonil näib olevat aju arengus suur tähtsus. Varajases arengus mõjutab *BDNF* närvisüsteemi arengut pea igast aspektist: alates neuraalsest proliferatsioonist, migratsioonist, närvirakkude ellujäämisest, aksoni juhtimisest sihtmärgile, dendriitide kasvust ja harunemisest, sünapsi moodustamisest, sünaptilise plastilisuse tagamisest kuni neurotransmitterite vabastamiseni (Tapia-Arancibia et al., 2004). Kuigi neurotrofiine on seostatud peamiselt närvisüsteemi arenguliste protsessidega, esineb neid kõrgetes kontsentratsioonides ka täiskasvanu teatud ajuosades. *BDNF*-i mRNA avaldub täiskasvanu roti hipokampuses, septumis, hüpotaalamuses ning ajukoos (Castren et al., 1993).

Neurotrofiinide, sealhulgas *BDNF*-i ning tema retseptorite, ekspressioon on neuraalsest aktiivsusest sõltuv (Lindholm et al., 1994). *In vitro* ja *in vivo* katsed demonstreerivad aktiivsusest sõltuvat *BDNF*-i avaldumist roti hipokampuses, ajukoos ja hüpotaalamuses, mis on ülesreguleeritud ergutavate neurotransmitterite nagu glutamaat, atsetüülkoliin, serotoniin ning allareguleeritud pidurdavate (GABA) poolt. Katsed glutamaadi agonisti kainaat happega (KA *kainic acid*) ja GABA_A retseptori antagonisti bicuculline'ga näitavad *BDNF*-i mRNA taseme tõusu hipokampuses ning ajukoos (Metsis et al., 1993).

Teiste molekulide seas omab *BDNF* kindlasti olulist rolli sünaptilise plastilisuse tagamisel (McAllister, 1999). *BDNF* ja tema retseptorid avalduvad ajupiirkondades, mis on tuntud oma kõrge plastilisuse poolest. Neuraalse aktiivsusega suurendatakse *BDNF*-i ja tema retseptorite ekspressiooni ning reguleeritakse sünaptilist ülekannet kahe närviraku vahel. Pikaajalise sünaptilise ülekande võimenduse (LTP *long term potentiation*) esilekutsumine hipokampuses põhjustab selektiivselt *BDNF*-i mRNA taseme järsu tõusu (Castren et al., 1993). *BDNF* geeni null-mutantses hiires on LTP häiritud (Korte et al., 1995).

Närviteaduses valitses pikka aega dogma, et uusi närvirakke elu jooksul juurde ei teki. Tänapäevaks on teada, et neurogenes toimub siiski ka täiskasvanud närvisüsteemis. Neurogeneesi käigus tekib uusi närvirakke peamiselt kolmes ajupiirkonnas *dentate gyrus*'es, haistmissibulas ja subventrikulaarses alas (*subventricular zone*) (Gage, 2002). Neurogeneesi stimuleerivad üllataval kombel sarnased füsioloogilised seisundid, mis tõstavad ka *BDNF*-i mRNA ekspressiooni. Näiteks õppimine ja füüsilised harjutused stimuleerivad uute närvirakkude teket *dentate gyrus*'es ning samuti *BDNF*-i mRNA taseme tõusu samas piirkonnas (Hall et al., 2000; Neeper et al., 1995). Vastupidiselt mõjub

neurogeneesile stressiseisund, vähendades uute neuronite teket *dentate gyrus*'es ning ka *BDNF*-i mRNA taset antud piirkonnas (Gould and Tanapat, 1999). Krooniline antidepressantide kasutamine seevastu jällegi tõstab *BDNF*-i mRNA taset ning soodustab uute närvirakkude teket hipokampuses (Malberg et al., 2000).

BDNF-i ekspressioonitaseme muutusi on seostatud mitmete patoloogiliste seisunditega, nagu epilepsia, Alzheimeri, Parkinsoni ja Huntingtoni tõved.

Epilepsia puhul tekivad ettearvamatud krambid ajus, millega kaasneb lühiajaline *BDNF*-i mRNA ekspressiooni tõus hipokampuses, ajukoores, olfaktorsetes tuumades ja ventromediaalses hüpotaalamuses (Ernfors et al., 1991). *BDNF*-i taseme tõusu tekitavad glutamaadi vabastamine ja Ca^{2+} sissevool rakkudesse. Arvatavasti on neurotrofiinide, sealhulgas *BDNF*-i, ekspressiooni tõus vajalik neuraalse plastilisuse taastamiseks.

Alzheimeri tõve korral on vähenenud *BDNF*-i mRNA ja valgu tase hipokampuses ja ajukoore teatud piirkondades (nt oimukoores) (Fahnestock et al., 2002). *In vivo* ja *in vitro* katsed näitavad, et *BDNF* toetab hipokampaalsete ja eesaju basaalsete koliinergiliste neuronite ellujäämist ning diferentseerumist. Viimastel aastatel on palju viidatud *BDNF* Val⁶⁶Met polümorfismile, mida on seostatud õppimis- ja mäluhäiretega inimestel (Hariri et al., 2003). 66. koodon asub 5'pro-*BDNF*-i järjestuses, mis kodeerib *BDNF*-i eellasvalku ja eemaldatakse normaalselt proteolüütilise lõikusega. Val⁶⁶Met polümorfismi ei oma otsest efekti funktsionaalsele *BDNF*-le, kuid mõjutab oluliselt selle liikumist, pakkimist ja sekretsiooni hipokampaalsetes neuronites.

Parkinsoni tõve korral on täheldatud progressiivset dopamiinergiliste neuronite suremist musttuumas (*substantia nigra*) (Altar et al., 1992). On teada, et musttuuma dopamiinergilised neuronid sõltuvad *BDNF*-st. Surmajärgsed Parkinsoni tõve patsientide uuringud näitavad *BDNF*-i madalat taset musttuumas, samuti sabatuumas (*nucleus caudatus*) ja kooriktuumas (*putamen*) (Mogi et al., 1999).

Hiljutised andmed viitavad, et *BDNF*-l võib olla oluline roll ka Huntingtoni tõve kujunemisel (Zuccato et al., 2001). Normaalne huntingtiin valk reguleerib positiivselt *BDNF*-i transkriptsiooni. Täpsemalt on näidatud, et huntingtiin inhibeerib NRSE (*neuron restrictive silencer element*) kaudu *BDNF* geeni ekspressiooni II promootorilt (Zuccato et al., 2003; Timmusk et al., 1999). *BDNF* omab troofilist efekti juttkeha neuronitele. Viimaste degenerereerumine on Huntingtoni tõvele iseloomulik, mis võib muuhulgas olla põhjustatud mutantse huntinkiini vahendatud *BDNF*-i transkriptsiooni allaregulatsioonist.

Kokkuvõttes on neurotroofsete faktorite täpne roll neurodegeneratiivsete haiguste kujunemisel veel üsna ebaselge. Endiselt jääb küsimus, kas neurotrofiinide ekspressioonitasemete muutused on neurodegeneratiivsete haiguste kujunemise tekkepõhjusteks või hoopis haiguste tagajärjel tekkinud esmased sümptomid.

2. 3. *BDNF* geeni struktuur

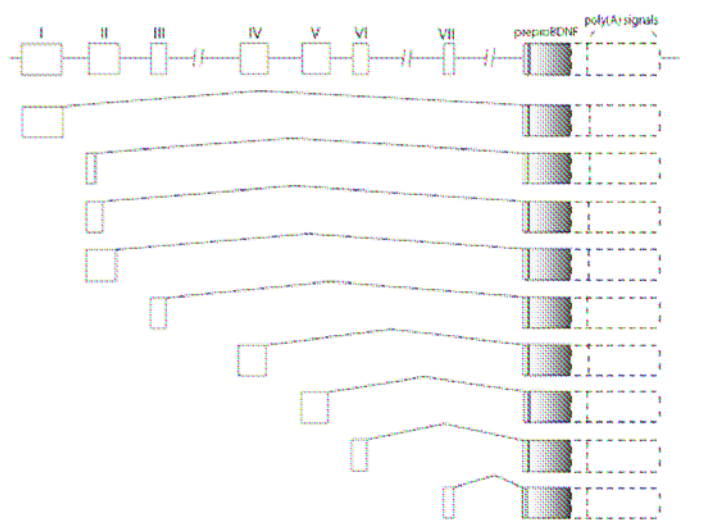
Neurotrofiinidele on omane kompleksne geenistruktuur (Timmusk et al., 1993). Nende ekspressioon on reguleeritud alternatiivsete promootorite poolt, mida kasutatakse sama geeniproducti ekspresseerumiseks erinevates kudedes. Roti *BDNF* geen paikneb 3. kromosoomi pikemas õlas (3q33). Inimese ja hiire *BDNF* geenid asuvad vastavalt 11. ja 2. kromosoomis (UniGene). Inimese *BDNF* geen hõlmab enda alla üle 70 kb genoomset järjestust. Viimaste andmete põhjal koosneb inimese *BDNF* geen vähemalt seitsmest mittekodeerivast 5'eksonist ja ühest kodeerivast 3'eksonist, millelt sünteesitakse valk (Liu et al., 2005). Lisaks alternatiivsetele 5'eksonitele on *BDNF* geenil vähemalt kaks võimalikku 3' polüadenüleerimissignaali pikkust. Analooogne *BDNF* geenistruktuur on hiirel (Hayes et al., 1997) ja rotil (Timmusk et al., 1993) (Joonis 9) ning ka kaugematel organismidel nagu sebrakala (Heinrich, 2003) ja kana (Gotz et al., 1992). Hiljuti avastati *BDNF* vastasahelalt uus geen (*BT*), mille transkriptidel on *BDNF*-ga osaliselt kattuv ekspressioonimuster, kuid mille täpne funktsioon pole hetkel veel teada (Liu et al., 1995). *BDNF* on kõrgel tasemel ekspresseerunud KNS-s, peamiselt hipokampuses ja ajukoores. Väljaspool närvisüsteemi on *BDNF*-i märkimisväärset avaldumist täheldatud põrnas, südames, skeleti lihastes, kopsus ja testises, kus on ekspresseerunud I, IV ja V eksonitelt transkribeeritud mRNA isovormid (Kozak, 2002).

Tänaeni on üsna vähe teada *BDNF*-i transkriptsiooni aktivatsiooni ja regulatsiooni mehhanismidest, mis tagavad selle geeni aja- ja koespetsiifilise avaldumise. *BDNF*-i II proksimaalses promootoris on kindlaks tehtud palindroomne NRSE (*neuron-restrictive silencer element*) järjestus (Timmusk et al., 1999). Üldiselt NRSE takistab neuraalsete geenide ekspressiooni mitteneuraalsetes kudedes. *BDNF*-i II promootoris paiknev NRSE järjestus mõjutab *BDNF*-i I ja II promootori aktiivsust ajus, tüümuses ja kopsus (Timmusk et al., 1999). Mutatsioon NRSE järjestuses põhjustab *BDNF*-i avaldumise tõusu nimetatud kudedes. Teistes mitteneuraalsetes kudedes NRSE mutatsiooni tagajärjel *BDNF*-i

ekspressioon ei muutu, viidates *BDNF*-i keerulisele vaigistamismehhanismile mitteneuraalsetes kudedes.

Kodeeriva VIII eksoni 5' osas (kus asub ka translatsiooni stardikoht) on kirjeldatud östrogeeni retseptorit siduvat elementi (Sohrabji et al., 1995). Tedaolevalt östrogeen tõstab *BDNF*-i mRNA ekspressiooni *in vivo* (Gibbs, 1999).

Põhjalikumalt on kirjeldatud *BDNF* geeni regulatsiooni Ca^{2+} -sõltuvate elementide poolt (Finkbeiner, 2000). Neuraalse aktiivsusega, mis vallandab membraani depolarisatsioonist tuleneva Ca^{2+} signaliseerimise, täheldatakse *BDNF*-i I ja IV (vana nomenklatuuri järgi *BDNF* III) promootorite aktiivsuse tõusu (Tabuchi et al., 2000). *BDNF* IV promootoris on kindlaks tehtud cAMP-d siduva valguga (CREB) seondumiskoht CRE (Shieh et al., 1998; Tao et al., 1998). Lisaks on kirjeldatud veel kolme Ca^{2+} -sõltuvat elementi (CaRE1-3) *BDNF* IV promootoris (Tao et al., 2002). Arvatavasti käituvad kolm CaRE-d kooperatiivselt, kuna mutatsioonid ühes neist takistavad neuraalsest aktiivsusest sõltuvat transkriptsiooni. Võrreldes *BDNF* IV promootoriga on *BDNF* I promootori Ca^{2+} -sõltuv aktiivsus mitmeid kordi madalam, kuid siiski märkimisväärne (Tabuchi et al., 2002). *BDNF* I promootori proksimaalses osas asub CRE element, mis kattub osaliselt USF (*upstream stimulatory factor*) seondumiskohaga. Lisaks CREB-le võib ka USF1/USF2 käituda kui Ca^{2+} poolt stimuleeritud transkriptsioonifaktor *BDNF*-i promootoris.



Joonis 9. Roti ja hiire *BDNF* geeni struktuur. *BDNF* geenil on seitse 5' mittetransleeritavat eksonit, alternatiivsete promootoritega nende ees ja üks 3' kodeeriv ekson, alternatiivsete poly(A) pikkustega. (Joonise koostanud Tamara Aid).

2. 4. Troofilised faktorid Schwanni rakkude arengus ja perifeerse närvi regenereerumisprotsessis

Perifeerse müeliini kujunemine on kompleksne ja dünaamiline protsess, sõltudes Schwanni rakkude ja neuronite vastastikkusest signaliseerimisest ning interaktsioonidest.

Mitte ainult Schwanni rakud ei sõltu oma arengu jooksul otseselt aksonaalsest kontaktist, vaid ka närvirakud vajavad Schwanni rakkude toetust aksonite piknemiseks ja sihtmärgile jõudmiseks. Lisaks sihtmärgi poolt sekreteeritavatele troofilistele faktoritele, on näidatud ka Schwanni rakkude võimet ekspresseerida erinevaid troofilisi faktoreid ning toetada sensoorsete ja motoorsete närvirakkude ellujäämist (Bunge, 1993). Ilma Schwanni rakkude troofilise toetuseta väheneb närvirakkude ellujäämine märgatavalt.

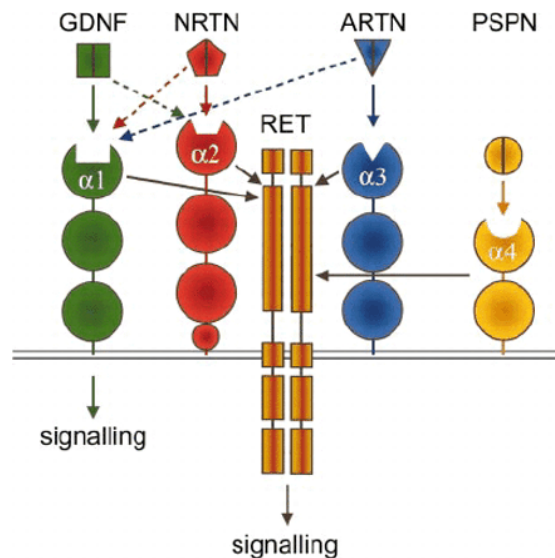
Schwanni rakkude osatähtsust perifeersete närvide ellujäämisel iseloomustavad neureguliini, ErbB2 ja ErbB3 null-mutantsed hiired, kellel puuduvad Schwanni rakud ning enamus sensoorsetest ja suur osa motoorsetest närvifiibritest (Britsch et al., 1998). ErbB2 (-/-) hiir sureb südamepuudulikkuse tõttu juba embrüonaalse arengu keskel, kuid ektoopiline ErbB2 avaldumine transgeensete loomade südamelihases pikendab ErbB2 null-mutantse hiire eluiga sünnini. Sellistel ErbB2 (-/-) hiirtel puuduvad Schwanni rakud ning enamus motoneuroneid (Woldeyesus et al., 1999). Homosügootsetel ErbB3 (-/-) hiirtel puuduvad Schwanni rakud, mis peaksid ümbritsema sensoorseid ja motoorseid aksoneid. Kuigi motoorsed ja sensoorsed närvid arenevad spinaalganglionis esialgu normaalselt, sureb hilisemas ErbB3 (-/-) hiire arengustaadiumis enamus perifeerseid neuroneid (Riethmacher et al., 1997).

Lisaks neureguliini primaarsele rollile, on oma osa närviraku ja teda ümbritsevate Schwanni rakkude vahelises interaktsioonis ka mitmesugustel troofilistel faktoritel.

Neurotrofiinidel (NGF, BDNF, NT-3 ja NT-4/5) ja nende retseptoritel (TrkA, TrkB, TrkC ja NGFR) on spetsiifiline, kuid mõneti kattuv avaldumismuster nii närvirakkudes kui ka Schwanni rakkudes.

Lisaks neurotrofiinidele omavad PNS-i arengus olulist rolli teisedki troofilised faktorid. Hästi on kirjeldatud TGF- β superperekonda kuuluvat GDNF (gliiapärane närvikasvufaktor) valguperekonda. GDNF perekonda kuuluvad veel neurturiin (NRTN), artemiin (ARTN) ja persefiin (PSPN) (Bennett et al., 1998). GDNF ja tema homoloogid vahendavad oma bioloogilisi funktsioone läbi GFR α -RET multikomponentse retseptorkompleksi. GDNF, NRTN, ARTN, PSPN seonduvad spetsiifiliselt GPI- rakupinnale ankurdatud retseptoritele

vastavalt GFR α -1-le, GFR α -2-le, GFR α -3-le ja GFR α -4-le. Rakusisene signaal antakse edasi RET retseptor türosiinkinaasiga (Airaksinen et al., 1999; Saarma and Sariola, 1999) (Joonis 10).



Joonis10. Homodimeersed GDNF perekonna ligandid: GDNF (roheline), NRTN (punane), ARTN (sinine) ja PSPN (kollane) seonduvad kõrgema afinsusega spetsiifilistele GFR α rakupinnaretseptoritele ning aktiveerivad Ret türosiinkinaasi. (Joonis adapteeritud Saarma, 2000)

GDNF omab troofilist efekti sensorsetele neuronitele, mis ei ekspresseeri oma pinnal Trk retseptoreid ning toetab mootorsete ja autonoomsete neuronite ellujäämist (Buj-Bello et al., 1995; Henderson et al., 1994). On viidatud BDNF ja GDNF koekspressioonile, seda nii dopamiinergiliste neuronite ellujäämisel KNS-s (Pei et al., 2004) kui ka retrograadset koekspressiooni mootorsetele neuronitele PNS-s (Rind et al., 2005).

Neuraalset ellujäämist toetavad ka neurokiinid. Neurokiinide perekonda kuuluvad CNTF (*ciliary neurotrophic factor*), leukeemia inhibitoorne faktor (LIF) ja interleukiin 6 (IL-6). LIF ja IL-6 vahendavad oma signaali LIF retseptor β (LIFR β) ja gp130 kompleksi kaudu. CNTF vajab oma funktsioneerimiseks lisaks veel CNTF retseptor α -t (CNTFR α) (Ip et al., 1996).

Neurotrofiinide ja nende retseptorite dünaamiline ekspressioon ilmneb väga selgelt peale perifeerse närvi kahjustust. NGF-i mRNA ekspressioon on normaalses istmikunärvis

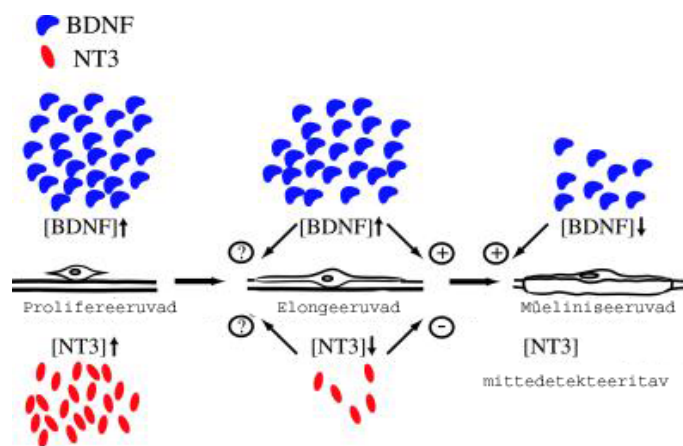
vaevudetekteritav, kuid tõuseb vahetult peale närvikahjustust Schwanni rakkudes märgatavale tasemele (Saika et al., 1991). Ka BDNF-i ekspressioon tõuseb peale istmikunärvi transektiooni Schwanni rakkudes ning samuti närvikahjustuse lähedal olevas lihases. Võrreldes NGF-ga on BDNF-i ekspressioon 10 korda intensiivsem ning erineb ka ajaliselt. BDNF ekspressioon hakkab aeglaselt tõusma 3 päeva peale närvikahjustust ja jääb maksimaalsele tasemele 2-3 nädalaks (Meyer et al., 1992). Erinevalt NGF-st ja BDNF-st omab NT-3 roti kahjustamata istmikunärvis ja lihases selgelt detekteeritavat ekspressiooni. 6-12 tundi peale närvikahjustust väheneb NT-3 ekspressioon ligi 9 korda ning saavutab oma endise ekspressioonitaseme alles 2 nädala möödudes (Funakoshi et al., 1993). NT-4 ekspressioon väheneb 6-12 tundi peale istmikunärvi kahjustust, kuid 2 nädalat hiljem saavutab 8 korda kõrgema ekspressioonitaseme võrreldes kahjustmata närviga (Funakoshi et al., 1993). Madala afiinsusega neurotrofiinide retseptori NGFR mRNA ei ole normaalses istmikunärvis detekteeritav, kuid tõuseb märgatavalt peale närvikahjustust. NGFR ekspressioonitase jääb kõrgeks ligi 3 kuuks, mis on vajalik roti istmikunärvi regeneratsiooniks (Newman et al., 1996). Trk-de ekspressioon drastiliselt muutusi perifeerse närvi regenereerumisprotsessis läbi ei tee. Nädal peale närvikahjustust võib Schwanni rakkudes märgata kerget TrkB ja TrkC ekspressioonitõusu (Funakoshi et al., 1993). CNTF-i ekspresseeriooni on PNS-s täheldatud peamiselt Schwanni rakkudes ja peale istmikunärvi kahjustust see kaob ning ei taastu enne aksonite regenereerumist (Rabinovsky et al., 1992). Peale roti istmikunärvi kahjustust tõuseb järsult GDNF-i mRNA ekspressioon kahjustuse ümbruses ja Schwanni rakkudes ning jääb kõrgele tasemele kuni 5 kuuks (Hammarberg et al., 1996).

Perifeerse närvi regenereerumine on selge näide närvisüsteemi plastilisusest. Troofiliste faktorite võimet toetada närvijätkete taastumist ja remüeliniseerimisprotsessi võib olla tulevikus terapeutiline potsentsiaal perifeersete neuropaatiate või *sclerosis multiplex* ravimisel.

2. 4. 1. BDNF ja NT-3 Schwanni rakkude ja istmikunärvi arengus

Schwanni rakkude arengus on detailsemalt kirjeldatud BDNF-i ja NT-3-e ekspressioonimustrit. Üllataval kombel on nimetatud neurotrofiinidel PNS-i arengus üsna erinevad, kohati isegi vastakad rollid.

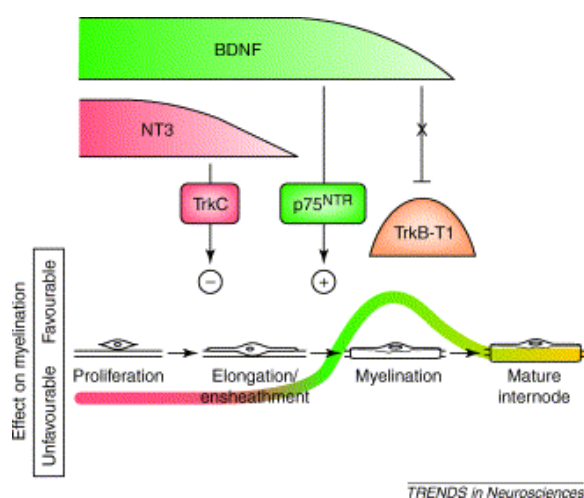
Üheks mudeliks uurimaks neurotrofiinide rolli müeliniseerimisprotsessis on Schwanni rakkude ja spinaalganglionite (DRG) kooskultuur. Schwanni rakkude lisamisel neuraalsele kultuurile hakkavad nad kiiresti prolifereeruma ja aksonitega kontakti otsima. Schwanni rakkude külvamisel DRG neuronitele toimub NT-3 ekspressiooni järsk langus. BDNF-i tase jääb antud tingimustel konstantseks alates Schwanni rakkude prolifereerumisest kuni promüeliniseerumiseni, langedes alles aktiivse müeliini sünteesi ajal (Chan et al., 2001)(Joonis 11). Eksogeense BDNF-i lisamine Schwanni rakkude/DRG kooskultuuri tõstis müeliinivalkude MAG ja P0 ekspressiooni vastavalt 2 ja 1.5 korda, samas kui NT-3 vähendas antud valkude ekspressiooni 2 ja 3 korda. *In vivo* katsed, kus subkutaanselt süstiti BDNF-i ja NT-3 vastündinud hiire istmikunärvi lähedusse, kinnitasid BDNF-i stimuleerivat ja NT-3-e inhibeerivat rolli müeliinivalkude ekspressioonile arenevas istmikunärvis.



Joonis 11. Endogeense neurotrofiinide tasemed ja nende võimalikud rollid müeliini kujunemisel PNS-s. BDNF ja NT-3 on kõrgel tasemel ekspresseerunud müeliini arengu algusfaasidel. Enne müeliniseerimisprotsessi algust langeb järsult NT-3 tase, kuid BDNF-i ekspressioon jääb konstantseks. NT-3 taseme vähenedes hakkavad Schwanni rakud keerduma ümber aksoni. BDNF-i ekspressioon on vajalik müeliniseerimisprotsessi alustamiseks. Müeliniseerimisprotsessi jätkudes BDNF-i ekspressioonitase langeb ja NT-3 pole detekteeritav. Joonis adapteeritud (Chan et al., 2001).

BDNF-i positiivne efekt müeliniseerimisprotsessile on vahendatud NGFR retseptori kaudu (Cosgaya et al., 2002). NGFR on Schwanni rakkudes kõrgelt ekspresseerunud nii perifeerse närvi arengus kui ka regeneerumisel. NT-3 toetab Schwanni rakkude ellujäämist promüeliniseerivas staadiumis TrkC kaudu. NGFR ja TrkC on ekspresseerunud müeliniseerimisprotsessi ajal nii Schwanni rakkude/DRG kokultuuris kui ka istmikunärvis, hiljem nende tase väheneb. Täispika TrkB avaldumine on analüüsitud kooskultuuris ja istmikunärvis vaevudetekteeritav, kuid selle lühendatud isovormi TrkB-T1 ekspressioon indutseeritakse müeliniseerimisprotsessi alguses. Arvatavasti on NGFR endogeense BDNF-i funktsionaalne retseptor müeliniseerimisprotsessi indutseerimisel. Aktiivse müeliniseerimisprotsessi alguses TrkB-T1 inhibeerib BDNF-i signaali konkureerides NGFR-ga. NGFR, TrkB-T1 ja TrkC retseptorid on peamised neurotrofiinide mediaatorid PNS-i müeliniseerimisprotsessis (Joonis 12).

Neurotrofiinid on PNS-i müeliniseerimisprotsessi võtmeregulaatorid ning BDNF-i ja NT-3 vastavalt positiivne ja negatiivne roll on vahendatud erinevate retseptoritega.



Joonis 12. Neurotrofiinide ja nende retseptorite ekspressioonitaseme muutused PNS müeliniseerimisel.

Perifeerse närvi varajases arengus NT-3 ja BDNF ekspresseeruvad kõrgel tasemel. BDNF vahendab oma positiivseid efekte müeliniseerimisele läbi retseptori NGFR (+). NT-3 seondumine TrkC-le inhibeerib müeliini geenide ekspressiooni (-). Schwanni rakkude liikumisega aksonitele toimub NT-3-e taseme langus, kuid BDNF-i ja NTRNTRp75 ekspressioon jääb kõrgeks. Müeliniseeritud närvis langeb kõikide neurotrofiinide ekspressioonitase ning BDNF-i ülehulk eemaldatakse TrkB-T1-ga. (Cosgaya et al., 2002).

EKSPERIMENTAALNE OSA

TÖÖ EESMÄRGID

BDNF avastati ajast ja omab kõrget ekspressiooni eelkõige KNS-i närvirakkudes. Viimastel aastatel on aga hakatud tähelepanu pöörama BDNF-i rollile ka PNS-s ning täheldatud BDNF-i reguleeritud avaldumismustrit gliiarakkudes, spetsiifiliselt Schwanni rakkudes. Schwanni rakud on PNS-i koostise tähtis komponent ja nende areng ning talitus on mõjutatud nii endogeense kui ka eksogeense BDNF-i tasemest.

Käesoleva töö üldine eesmärk on uurida *BDNF* geeni avaldumise molekulaarseid mehhanisme, kirjeldada *BDNF*-i ekspressiooni perifeerses närvisüsteemis ja analüüsida *BDNF*-i ekspressiooni Schwanni rakkude arengus.

Täpsemateks tööeesmärkideks on:

- analüüsida *BDNF* geeni struktuuri bioinformaatiliste meetoditega, teostada primaarstruktuuri fülogeneetiline analüüs, konserveerunud promootorite ja nende reguleerivate alade ennustamine;
- tuvastada *BDNF* geeni ekspressiooni muster roti istmikunärvi arengus;
- analüüsida *BDNF*-i avaldumismustrit Schwanni rakkudes;
- *BDNF*-i promootorite *in vitro* analüüs reguleerivate järjestuste tuvastamiseks.

MATERJALID JA METOODIKA

1. Roti istmikunärvi (*nervus ischiaticus*) eraldamine

Istmikunärvid eraldati rottidest (Sprague-Dawley) erinevatel arengustaadiumitel, alates 17. embrüonaalsest arengupäevast (E17) ning edasi E19, P1, P3, P10, P20 ja täiskasvanud rotist. Närvid eraldati, kasutades binokulaari abi. Loomadele sooritati eutonaasia dekapitatsiooni meetodil.

2. Kasutatud rakuliinid

Roti Schwanni rakkude primaarkultuuri valmistamisel kasutati kohandatud varem kirjeldatud meetodit (Brookes et al., 1979). Eraldatud 3-5 päeva vanuste rottide istmikunärvid koguti petri tassil 2 ml L-15 (GIBCO) söötmesse. Järgnevalt asendati L-15 sööde 2 ml 0.1% kollagenaasi sisaldava L-15 söötmega ja pärast närvide eraldamist süstlanõelte abil üksikuteks fiibriteks inkubeeriti 30 min 37°C. Koe ühtlaseks lagundamiseks pipeteeriti söödet 1 ml pipetiga iga 5 min järel. Seejärel lisati 0.25 ml 0.25% trüpsiini lahust ja inkubeeriti veel 10 min 37°C. Reaktsiooni peatamiseks lisati 10 ml L-15/10% FCS söödet ja pärast segamist tsentrifuugiti rakud põhja (5 min 1000rpm). Rakusade resuspendeeriti 2 ml L-15/10% FCS söötmes ja lisati 8 ml L-15/10% FCS. Pärast retsentrifugimist (5 min 1000 rpm) resuspendeeriti sade 2ml C_B söötmes (DMEM Glutamax (GIBCO), 10% FCS, 1x penitsilliin/streptomütsiin), lahjendati 4 ml C_B söötmes ning plaaditi 6 cm Primaria (Becton Dickinson) tassile. Primaarkultuure kasvatati 37°C juures 5% CO₂ atmosfääris.

Järgmisel päeval pesti kinnitunud rakud 1xPBS-ga ja lisati värske C_B sööde. 12 h möödudes asendati sööde C_B söötmega, mis sisaldas lisaks 10 µM Ara-C. Kultuuri fibroblastidest puhastamiseks vahetati C_B 10 µM Ara-C söödet 2 korda päevas 3 päeva jooksul.

Peale Ara-C töötlust asendati sööde Schwanni rakkude proliferatsiooni söötmega SCPM(D-MEM Glutamax (GIBCO), 3% FCS, 5% neureguliini sisaldusega sööde, 20 µM forskoliin, 1x penitsilliin/streptomütsiin).

2.1. 5% neureguliini (NDF- β) sisaldusega söötme valmistamine

Neureguliini üleekspresseeriv CHO rakuliin pärineb Elijor Peles'lt ja Yoshi Yarden'lt Weizmann Instituudist (Rehovot, Iisrael). Rakke kasvatati konfluentsuse saavutamiseni DMEM/5% FCS söötmes. Seejärel plaaditi konfluentne plaat 1:10 ja järgmisel päeval vahetati sööde DMEM/1%FCS-ga. See sööde jäeti rakkudele kolmeks päevaks, filtreeriti ja säilitati alikvootidena -20°C. Neureguliiniga konditsioneeritud söödet kasutati neureguliini allikana primaarsete Schwanni rakkude kultuuri söötme valmistamisel.

2.2. Schwanni rakkude kultuuri induktsioon.

Prolifeeruvatel roti Schwanni rakudel indutseeriti *in vitro* diferentseerumine või kasvuarest. Diferentseerumiseks hoiti rakke 36 h ilma seerumita söötmes, mis sisaldas 1x N2 söötmelisandit (GIBCO), 1x penitsilliin/streptomütsiin, 5% neureguliini sisaldavat söödet ja 20 μ M forskoliini (lahustatud DMSOs, Sigma). Forskoliin aktiveerib adenülaastsüklaasi ja tõstab rakusisest cAMP taset. Rakkude kasvuaresti esile kutsumiseks lisati söötmele forskoliini asemel ainult DMSO-d.

3. RNA eraldamine ja cDNA süntees

RT-PCR-i matriitsina kasutati roti Schwanni rakkude või roti istmikunärvi cDNA-si. RNA eraldati rakkudest, kasutades RNAwiz kemikaali (Ambion). Konfluentsele roti Schwanni rakkude plaadile (d=60mm) lisati 1ml RNAwiz kemikaali ning rakud kraabiti kokku ning kanti üle eppendorfi tuubi. Lisati 0.2 ml kloroformi, segati ja hoiti 10 min ruumitemperatuuril. Tsentrifuugiti 30 min 5000xg. Veefaas kanti üle uude tuubi ja lisati 0.5x esialgsest kogusest RNase-vaba vett. Lisati 1 ruumala isopropanooli, hoiti 30 min -20°C ning tsentrifuugiti 30 min 5000xg. RNA sadet pesti 1 esialgse koguse külma 70% etanooliga. Sade lahustati RNase-vabas vees. cDNA sünteesiks kasutati 0,5-1 μ g totaalset RNA-d. RNA-le lisati 1 μ l 50 μ M oligo(dT) praimerit, 1 μ l 10 mM dNTP segu, RNase-vaba vett kuni 10 μ l- ni. Inkubeeriti 5 min 65°C ja seejärel hoiti vähemalt 1 min jääl. cDNA sünteesiks segati kokku 2 μ l 10x Reverse Transcriptase puhvrit (Invitrogen), 4 μ l 25 mM MgCl₂, 2 μ l 0.1 M DTT, 1 μ l RNaseOUT (40U) (Invitrogen) ning SuperScript III Reverse Transcriptase (200U) (Invitrogen). RNA ja cDNA reaktsioonisegud segati kokku ning

inkubeeriti 50 min 50°C juures. Reaktsioon lõpetati, kuumutades reaktsioonisegu 5 min 85°C. cDNA kvaliteeti kontrolliti aktiini või GAPDH praimeritega.

4. RT-PCR ja kasutatud praimerid

BDNF I, II, III, VI eksonite RT-PCRiks kasutati HotFire DNA polümeraasi (Solis Biodyne). PCR reaktsioonisegu (50 µl) sisaldas 5 µl 10 x Puhver B, 5 µl 10 x Solution S (GC rikastele aladele), 5 µl 25 mM MgCl₂ µl 10 mM dNTP, 2 µl kumbagi praimerit ja 1 µl (10U) Taq HotFire DNA polümeraasi.

G/C rikaste produktide (IV ja V eksoni) RT-PCR teostati GC-süsteemiga (Rosch). PCR reaktsioonisegu (50 µl) sisaldas 10 µl 5x GC süsteemi puhvrit, 5 µl GC *resolution solution*, 5 µl 25 mM MgCl₂ µl 10 mM dNTP, 2 µl kumbagi praimerit ja 1 µl (10U) Taq HotFire DNA polümeraasi (Solis Biodyne).

RT-PCR reaktsioonides kasutati järgmisi primereid:

BDNF praimerid:

hiir/rottBDNFIsense 5'-GTGTGACCTGAGCAGTGGGCAAAGGA-3'

hiir/rottBDNFIIIsense 5'-GGAAGTGGAAGAAACCGTCTAGAGCA-3'

rottBDNFIIIIsense 5'-CCTTTCTATTTTCCCTCCCCGAGAGT-3'

hiir/rottBDNFIVIsense 5'-CTCTGCCTAGATCAAATGGAGCTTC-3'

rottBDNFVIsense 5'-GCTGGCTGTGCGCACGGTCCCCATT-3'

hiir/rottBDNFIVIsense 5'-GTGTGTGTCTCTGCGCCTCAGTGGA-3'

hiir/rottBDNFantisense 5'-GAAGTGTACAAGTCCGCGTCCTTA-3'

TrkB praimerid:

TrkBsense 5'-CTGGACCACGCCAACTGACA-3'

TrkB-FLantisense 5'-TGGCAGAGTCATCGTCGTTG-3'

TrkB-T1antisense 5'-AAGCAGCACTTCCTGGGATAG-3' (seondumine 53°C)

TrkB-T2antisense 5'-TGGTATCATATCCTTGCTGCTAT-3'

TrkB-Shcantisense 5'-AGA ACTCTTCTTCCTCCATCAG

NGFR:

75sense 5'-TGCTGCCTGCAGCGCCAT-3' (seondumine 55°C)

75antisense 5'-CGGAATGTGGGACAGGACAG-3'

GDNF perekonna ligandide ja retseptorite praimerid:

rottARTNsense 5'-TGCTGAGCAGCGTCACAGA-3'

rottARTNanti 5'-CATGAAGGAGACTGCCTCAT-3'

rott/hiirGDNF sense 5'-TATGGGATGTCGTGGCTGTCT-3' 58C

rott/hiirGDNF anti 5'-TAGCCCAAACCCAAGTCAGTG-3' (seondumine 53°C)

rott/hiirNRTN sense 5'-TGGTGTGCTCATCTGCAGC-3'

rottNRTN anti 5'-CTCTTTGCGCACGCGTCGT-3'

rott/hiirPSPN sense 5'-ATGGCTGCAGGAAGACTTCG-3'

rott/hiirPSPN anti 5'-TCATCAAGGAAGGTCACATCA-3'

rottRET sense 5'-TGATGCTGCAGTGCTGGAAG-3'

rottRET9 anti 5'-CTCCAGTGTCATCTTAAGTTGC-3'

rottRET51anti 5'-CTTGGCCAGTATGGTGTGCA-3'

rottGFRa1sense 5'-CTTACTAGCCACACACCATC-3'

rottGFRa1anti 5'-GGTACACTTGGATGTTGGATG-3'

rottGFRa2 sense 5'-TCTGGACAAGATGAGACCCT-3' (seondumine 51°C)

rottGFRa2 anti 5'-GACTCGCTTCCTAGTACGTT-3'

rottGFRa3 sense 5'-CAACTGCCTAGATCTTCGGA-3'

rottGFRa3 anti 5'-GAAGAAAGACAGAACGGGTAG-3'

rottGFRa4 sense 5'-GGTAAGCTTTAAGGCAGAGG-3'

rottGFRa4A anti 5'-AGGAAACAGCACCCAGCATT-3'

rottGFRa4B anti 5'-TTTCTGCCTCCATCTCTTCTC-3'

Kõik amplifikatsioonid viidi läbi järgmistel tingimustel: ensüümi aktiveerimine ja esmane denatureerimine 95°C 15 min, denatureerimine 95°C 30 s, praimerite seondumine (temperatuur vastavalt disainitud praimeritele) 30 s, elongatsioon 72°C 1 min 30 s (25-35 tsükli), viimane elongatsioon 72°C 10 min, jahutus 10 min 4°C. Kasutati Eppendorf MasterCycler´it.

5. DNA sekveneerimine

Sekveneerimisreaktsioon viidi läbi, kasutades BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit´i (Applied Biosystems). 10 µl-s (3 µl MQ, 200 ng DNA, 100 ng M13 praimereid, 4 µl BigDye). PCR viidi läbi tingimustel: 96°C 30 s, 50°C 15 s, 60°C 4 min (25 tsükli), 60°C 1 min, 4°C 10 min.

6. EMSA (*Electrophoretic mobility shift assay*).

EMSA-s kasutatud radioaktiivsete BDNF I, IV ja V (uus nomenklatuur) promootorite fragmentide sünteesiks kasutati matriitsina BDNF I 0.6 kb *Bam* HI/*Sac* I, BDNF III 0.9 kb *Hinc* II/*Xba* I, BDNF IV 0.7 kb *Eco* RI/*Sma* I (vana nomenklatuur) (Timmusk et al 1993) alasid, mis olid kloneeritud pBSKS-i. Radioaktiivsed fragmendid BDNF-i promootorites sünteesiti PCR-ga, kasutades spetsiifilisi praimereid ning lisades [α - ³²P]-dCTP: 5 µl 10xPCR puhver, 5 µl MgCl₂, 4 µl 10 µM praimereid, 10 ng DNA, 1 µl Taq (Naxo Taq Polümeraas) DNA polümeraas, 1 µl 10mM -dCdNTP (milles puudus dCTP), 1 µl 0.1 nM dCTP, 5 µl [α - ³²P] dCTP, vesi kuni 50 µl. PCRi tingimused olid: 2 min 94°C, 45 s 94°C, 45 s 55°C (või vastavalt praimeritele), 1 min 30 s 72°C. Märgitud proovid puhastati NICK™ kolonnidel (Amersham) või sadestati küllastatud NH₄AC-ga.

6.1. Erinevate genoomsete järjestuste jaoks kasutati järgmisi praimereid.

BDNF I promootori 0.6 kb *Bam* HI/*Sac* I praimerid:

BDNFIsense1 5'-ATCCTCCCCTCCTAGCCTAT-3'

BDNFianti1 5'-GAGAGTTAACAGCCTCTGTG-3'

BDNFianti2 5'-CTAATGGCTTATGGCTTCTCA-3'

BDNFIsense2 5'-TCTTCGCTCAGAGATCTAGG-3'

BDNFIsense3 5'-AGCCATTAGAGCAAACGCAG-3'

BDNFIsense4 5'-CTTCATTCAACTCAAGCCGC-3'

BDNFianti3 5'-TGTAAGCCAAGCTCTCAAGC-3'

BDNFianti4 5'-TTAGGGACTGATGACTAGGC-3'

BDNFIsense5 5'-GCCTAGTCATCAGTCCCTAA-3'

(secondumine 59°C)

BDNFIsense6 5'-GAGGAAAAGGGAAGTTGTGG-3'

BDNFanti5 5'-ATCGAAGAGCGCATCAGCC-3'

BDNFianti6 5'-AGGAGTGACTTGTTCTAGGG-3'

BDNFIsense7 5'-ACAAGTCACTCCTGCTCCAT-3'

BDNFianti7 5'-ACCATGACTAAGGGTCTCCA-3'

BDNFIsense8 5'-TGATCATCACTCACGACCAC-3'

BDNFianti8 5'-GTGACTCCCTTGGTAAAAAGG-3'

BDNFIsense9 5'-TTACCAAGGGAGTCACAGTG-3'

BDNFIsense10 5'-ACGTAACTGGCTCAGAGAGG-3'

BDNFianti9 5'-CCTCTCTGAGCCAGTTACGT-3'

BDNFianti10 5'-GAATACCAGAAAAGCGCAGC-3'

BDNFIsense11 5'-GCTGCGCTTTTCTGGTATTC-3'

BDNFIsense12 5'-GGTGCAGGAAAGCAACAAGT-3'

BDNFianti11 5'-GAAAAGCTTCGCCTTGTCAG-3'

BDNFianti12 5'-AGCTCGGCTCAGGAGATTTC-3'

BDNF IV 0.9 kb *Hinc* II/*Xba* I

BDNFIVsense1 5'-GAGGCTGTGACACTATGCTC-3'

BDNFIVanti1 5'-CCTCTAATCCAGCCAGTAAG-3'

BDNFIVsense2 5'-GGGCAACGTTTACCAAAGCA-3'

BDNFIVanti2 5'-GCTGTATGGTAAACTCTGCC-3'

BDNFIVsense3 5'-GTCCTCCAGAAACCAGTCAT-3'
BDNFIVanti3 5'-CCAAAATTTAGGGTGAGGGG-3'
BDNFIVsense4 5'-GTGTTGTTGCTGCCTAGATG-3'
BDNFIVanti4 5'-CGTTTCCACTTCCAGTCCTA-3'
BDNFIVsense5 5'-GTGAGTTCGCTAGGACTGGA-3'
BDNFIVsense6 5'-GCCCTGGAACGGAATTCTTC-3'
BDNFIVanti5 5'-CAGAATCAGAATCCGCGCA-3'
BDNFIVanti6 5'-TATGATACCTCCTCTGCCTC-3'
BDNFIVsense7 5'-CTGGTAATTCGTGCACTAGAG-3'
BDNFIVanti7 5'-AATGGGAAAGTGGGTGGGAG-3'
BDNFIVsense8 5'-CTCCCACCCACTTTCCATT-3'
BDNFIVanti8 5'-GGGAGATTTTCATGCTAGCTC-3'

BDNF V 0.7 kb *Eco* RI/*Sma* I

BDNFV79sense 5'-CTGATGTGTTTAAGGTAGCGG-3'
BDNFV79anti 5'-CCACAGAGCTAGAAAAAGCG-3'
BDNFV79sense+ 5'-TAGCGGAGTAAACCATAACCC-3'
BDNFV79anti- 5'-GAAACTACACAGAGTGTGCG-3'
BDNFV52sense 5'-TTCTATTAGGCAAACCTCCGG-3'
BDNFV52anti 5'-TTAACCAGAGTTGCGCGC-3'
BDNFV183sense 5'-GGAAATGGACAGAAGCCGGT-3'
BDNFV183anti 5'-AGCTTCGATTGGTCAGACAG-3'
BDNFV183sense+ 5'-GAATCCCGGCAAGGAAAAGG-3'
BDNFV183anti- 5'-CTGCTTAAAGGGGACGACG-3'
BDNFV77sense 5'-ATAATGTCTGACCCCAGTGC-3'
BDNFVsense120 5'-CGCTTTTTCTAGCTCTGTGGT-3'

BDNFV_{sense200} 5'-CAGAACTTGGGTGTTGGGAT-3'

BDNFV_{anti200} 5'-ATCCCAACACCCAAGTTCTG-3'

BDNFV_{sense290} 5'-CACTTGTTCCCTCCTACTCT-3'

BDNFV_{anti250} 5'-GACTACCACGCTCCCAAATC-3'

BDNFV_{anti390} 5'-CTGCTTAACCCCAAAGCTCT-3'

Rasvase tekstiga on märgitud praimerid, mille produktiga saadi EMSA-s diferentsiaalne mobiilsusnihe.

6.2. Rakuekstraktide valmistamine

Rakud pesti 3x5 ml 1xPBS-ga, koguti 1 ml 1xPBS-s, tsentrifuugiti 5 min 1500g. Rakusademele lisati 10x koguses WCE puhvrit (20 mM Hepes-KOH pH 7.9, 400 mM KCl, 1 mM EDTA, 10% Glütserool, DTT kuni 10 mM, PMSF kuni 1 mM, 1x Proteaasi Inhibiitorit (Roche). Rakud homogeniseeriti Dounce'i homogenisaatoriga ja lõhuti, külmutades vedelas lämmastikus ja sulatades jääl (3x). Rakumembraani komponendid tsentrifuugiti põhja, 11000g 4°C 30 min. Supernatant külmutati osade kaupa vedelas lämmastikus ja säilitati -80°C.

Tuumaekstraktide valmistamiseks pesti rakud 3x5 ml 1xPBS-ga, koguti kokku 1 ml 1xPBS-s, tsentrifuugiti 5min 1500xg, eraldati PBS. Ühele d=10cm konfluentsele plaadile lisati 400 µl puhvrit, mis sisaldas 10mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF. Rakke hoiti 15 min jääl. Lisati 25 µl 10% NP-40. Rakud sadestati 11000g 30s. Supernatant sisaldas rakkude tsütoplasmat. Tuumad resuspendeeriti 50 µl jääkülmas puhvril, mis sisaldas 20 mM HEPES pH 7.9, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF ja inkubeeriti 15min 4°C. Pärast mittelahustuva fraktsiooni eemaldamist 5 min 4°C 1300 rpm. supernatant külmutati alikvootidena vedelas lämmastikus ja säilitati -80°C.

6.3. Kaheahelaliste DNA oligote (GATA, Sp1, Myt) märkimine [γ -³²P] ATP-ga

Valgu konsensusjärjestuste märkimiseks võeti 1pmol oligonukleotiidi sense ahelat, lisati 5 µl H₂O-d, inkubeeriti 5min 65°C. Lisati 1 µl 10x kinaasi puhvrit, 3 µl [γ -³²P] ATP-d, 10U T4 Polinukleotiid kinaasi (Fermentas). Hoiti 15min 37°C, seejärel lisati veel 10U T4

Polünukleotiidi kinaasi, 15min 37°C. Reaktsioonile lisati 90 µl TES (5mM Tris, 1mM EDTA, 0.1% SDS). Vabad nukleotiidid eraldati Sephadex G-50 geelfiltratsiooniga. Lisati 5 pmooli vastasahela praimerit ja sadestati 1 µg dextransi, 0.2M NaAc ja 2.5 mahu ETOH-ga. Tsentrifugeeriti 12.5K 4°C, 20min, sadet pesti 70% ETOH-ga.

DNA lahustati 20 µl-s puhvris (100mM KCl, 10mM Tris-HCl, pH7.5, 1mM MgCl₂). Kaheahelalised EMSA proovid lahjendati kuni 250 µl-ni puhvriga (50mM NaCl, 10mM Tris-HCl, pH7.5, 1mM MgCl₂). EMSA-ks kasutati 1-4 µl (4-16fmol) märgitud proovi.

Radioaktiivselt märkimata proovide valmistamiseks segati 10 µl (100 µM) kumbagi konsensusjärjestuse DNA ahelat ja 80 µl puhvrit (50mM NaCl, 10mM Tris-HCl, pH7.5, 1mM MgCl₂), asetati keevasse vesivanni ning lasti jahtuda ruumitemperatuurini.

Kasutati järgmisi oligonukleotide, mis sisaldasid transkriptsioonifaktorite sidumislalsid:

GATA oligo 5'-TCCAGGCCCCAGATAAGAGGCCAT-3'

SP1 oligo 5'-ATTCGATCGGGGCGGGGCGAGC-3'

Myt1 oligo 5'-GATCCGGAAAGTTTGC GCGAAAGTTTGA-3'

Toodud on vaid ühe ahela järjestused, tumedalt on märgitud vastavate transkriptsioonifaktorite seondumiseks vajalikud konsensusjärjestused.

6.4. DNA/valk komplekside analüüs.

2-4 µg rakuekstrakte ja ³²P-ga märgitud DNA proovi (~100 000 cpm, mõõdeti β-kaunteriga) inkubeeriti 20 µl reaktsioonipuhvris (10mM HEPES pH 7.6, 4% Ficoll, 60mM KCl, 5mM EDTA, 5mM DTT, 2µg poly dIdC). Konkureerivas EMSA-s lisati märkimata DNA proovi 50x molaarses ühelas. DNA ja rakuekstraktide segu hoiti 20-30 min jään komplekside moodustumiseks. DNA-valgu komplekse lahutati 4%-6% polüakrüülamiid geelis (30 akrüülamiid: 1 bis-akrüülamiid) 0.25x TBE-s, 150V 2 h. Geelid kuivatati ja eksponeeriti Fosfoimageris. Totaalne valgu hulk rakuekstraktides määrati BCA Protein Assay Reagent Kit'ga (23227) vastavalt valmistaja poolt ettekirjutatud protokollile.

7. BDNF geeni *in silico* analüüs

BDNF geeni *in silico* analüüsiks kasutati internetipõhiseid programme. Fülogeneetilist konserveerumist inimese (*Homo sapiens*), šimpansi (*Pan troglodytes*), hiire (*Mus*

musculus), roti (*Rattus norvegicus*), koera (*Canis familiaris*), kana (*Gallus gallus*), kerakala (*Fugu rubripes*) ja sebrakala (*Dario rerio*) vahel analüüsiti Genome Browser'i poolt pakutavate bioinformaatiliste vahenditega (<http://genome.ucsc.edu>), kus leitakse vähemalt 95% sarnasusega järjestused (põhineb varjatud Markovi mudelitel).

cis-regulatoorsete järjestuste leidmiseks kasutati ConSite tarkvara (<http://mordor.cgb.ki.se/cgi-bin/CONSITE/consite/>). ConSite programmi ennustused põhinevad transkriptsioonifaktorite seostumissaitide kaalumatriksitel ja filtreeritud liikidevahelisel võrdlusel. ConSite'i poolt ennustatud tulemusi võrreldi MatInspector'i (<http://www.genomatix.de/MatInspector>) ning TESS-i (<http://www.cbil.upenn.edu/tess/>) transkriptsioonifaktorite ennustusprogrammidega.

TULEMUSED

1. Primaarsete Schwanni rakkude kultuurid ja nende diferentseerumine

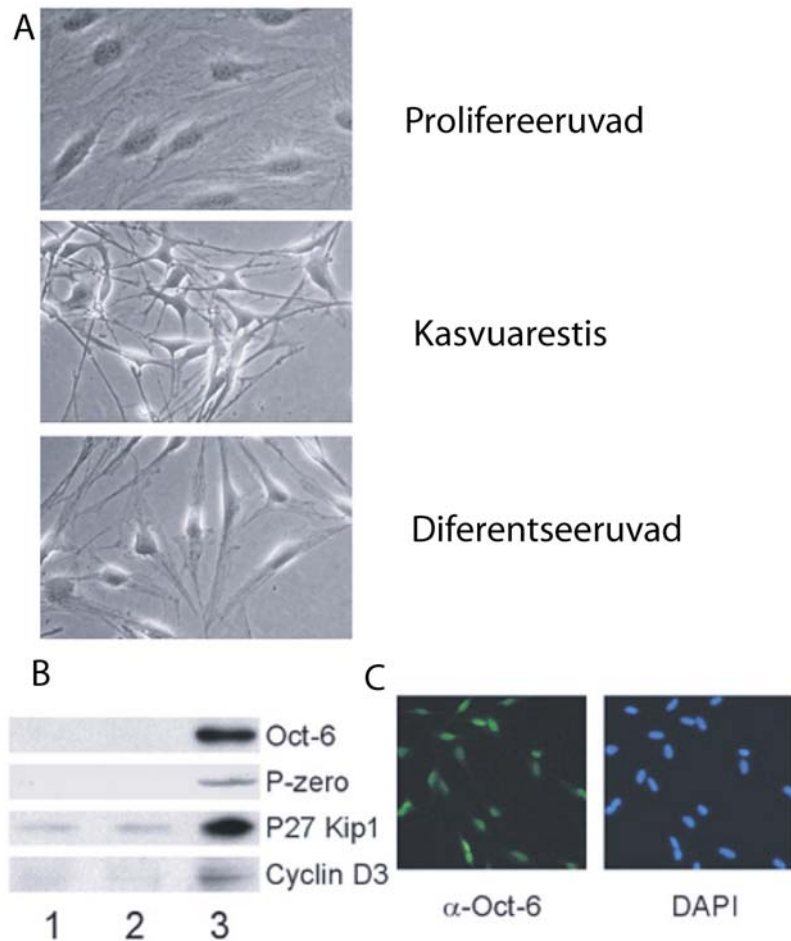
Antud töös kasutati kolme tüüpi Schwanni rakkude kultuure - aktiivselt prolifereeruvaid, kasvuarestis olevaid ja *in vitro* diferentseeritud rakke.

Primaarsed rakud eraldati 3-5 päevase roti istmikunärvist. Prolifereeruvaid rakke kasvatati seerumi ja neureguliin NDF- β juuresolekul. Neureguliin on vajalik Schwanni rakkude eluspüsimiseks (Mirsky et al, 1996). Prolifereeruvad rakud on oma morfoloogialt ovaalsed, üksteisega kontakti otsivad, suure tsütoplasma hulgaga, poolkonfluentsed kultuurid saavutavad konfluentsuse 2-3 päevaga. Rakkude diferentseerumiseks lisati seerumivabasse söötmesse forskoliini. Forskoliin stimuleerib membraanseoselist adenulaadi tsüklaasi ja selle kaudu suurendab rakusisest cAMP taset, mis omakorda aktiveerib cAMP-st sõltuvad kinaasid ja nendest sõltuvad signaalirajad. Forskoliini lisamine Schwanni rakukultuuri imiteerib aksoni kontakti ja indutseerib rakkude diferentseerumise. Juba 2-3 tunni möödudes võis näha muutusi rakkude morfoloogias. Diferentseeruma indutseeritud rakud muutusid kitsamaks ja peenemaks, distaalsed rakuosad omandasid hargneva morfoloogia ja rakkude jagunemine peatus.

Kolmandat tüüpi rakkudele ei lisatud forskoliini ning need ei omandanud diferentseeruvat fenotüüpi, vaid läksid seerumivabas söötmes kasvuaresti. Kasvuarestis Schwanni rakud on võrreldes prolifereeruvate ja diferentseeruvate rakkudega palju väiksemad, minimaalse tsütoplasma kogusega ning moodustavad koekultuuritassil võrkja moodustise (Joonis 13A). Diferentseeruvaid ja kasvuarestis olevaid rakke hoiti seerumivabas tingimustes 36h. FACS (*fluorescence-activated cell sorting*) analüüs näitas, et kasvuaresti ja diferentseeruma indutseeritud Schwanni rakud ei jagune (Marko Piirsoo avaldamata andmed).

Rakkude diferentseerumise molekulaarse markerina kasutati spetsiifiliselt diferentseeruvates Schwanni rakkudes avalduva Oct-6 tuvastamist (Scherer et al., 1994) (Joonis 9). Kolme eritüübilise Schwanni rakupopulatsiooni analüüs Western blot'ga on näidanud müeliniseerimisprotsessile omaste valkude Oct-6, P0, P27Kip1 ja CyclinD3 avaldumist diferentseeruvates tingimustes (Piirsoo ja Meijer avaldamata andmed) (Joonis 13B). Rakkude *in situ* värvimine Oct-6 antikehaga tuvastas Oct-6 valguga lokaliseeritud diferentseeruvate Schwanni rakkude tuumades ning näitas, et diferentseerumine meie eksperimentaalsetes tingimustes on homogeenne protsess (Joonis 13C).

Müeliinspetsiifiliste valkude diferentne ekspressioon viitab, et kasutatud rakkude *in vitro* süsteem imiteerib Schwanni rakkude diferentseerimist *in vivo*.



Joonis 13. Primaarsete roti Schwanni rakkude diferentseerimine *in vitro*. **A.** Prolifereeruvad, kasvuarestis ja diferentseeruvad roti Schwanni rakud. Prolifereeruvad roti Schwanni rakud on morfoloogialt ovaalsed, suure tsütoplasma hulgaga, üksteisega kontakti otsivad. Kasvuarestis rakud on minimaalse tsütoplasma hulgaga. Diferentseerima indutseeritud roti Schwanni rakud on hargneva morfoloogiaga. **B.** Western blot analüüs kolmes eritüübilises Schwanni rakukultuuris diferentsiaalselt ekspresseerunud valkudele. 1. rajal prolifereeruvate, 2. rajal kasvuarestis olevate ja 3. rajal diferentseeruma indutseeritud Schwanni rakkude valgu analüüs Oct-6, P0, P27 Kip1 ja Cyclin D3 suhtes. **C.** 100% roti Schwanni rakkudest diferentseeruvad *in vitro* 20 μ M forskoliini juuresolekul. Vasakpoolsel pildil on näidatud immunofluorestsents analüüs Oct-6 antikehaga, parempoolsel pildil on sama vaatevälja rakkude tuumad värvitud DAPI-ga. Kõik tuumad on Oct-6 positiivsed.

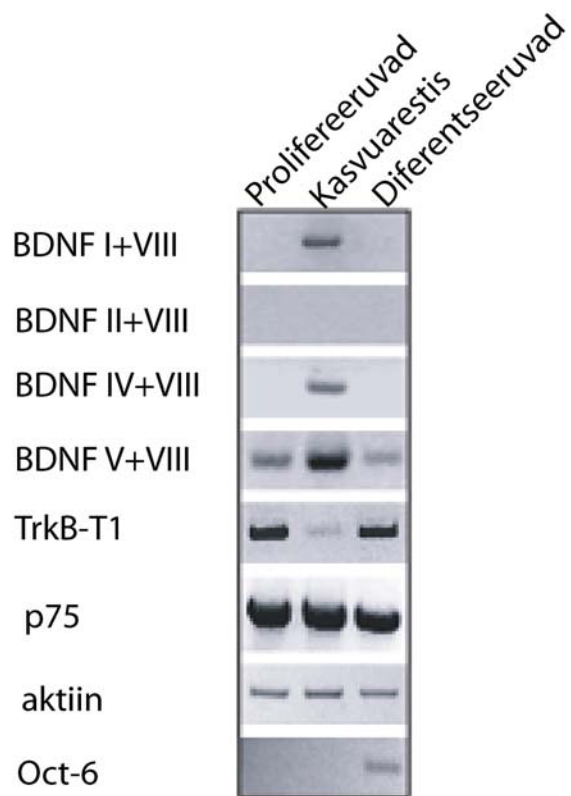
2. *BDNF*-i ja tema retseptorite ekspressioon Schwanni rakkudes

BDNF-i erinevatelt eksonitelt transkribeeritud mRNA vormide avaldumist roti Schwanni rakkudes uuriti RT-PCR-ga. Selleks disainiti spetsiifilised praimerid *BDNF*-i 5' eksonitele ja vastasahela praimer kodeerivale 3' eksonile (Joonis 9). Katsetes kasutati matriitsina prolifereeruvate, kasvuarestis olevate ja diferentseeruma indutseeritud Schwanni rakkude cDNA-si.

Roti Schwanni rakkudes ekspresseerusid *BDNF*-i I, IV ja V eksonitelt sünteesitud transkriptid ja seda kõrgeimal tasemel kasvuarestis olevates rakkudes (Joonis 14). Kasvuarestis olevad rakud peaksid vastama rakutsüklilist väljunud mittediferentseerunud Schwanni rakkudele.

BDNF-i retseptoritest oli kolmes uuritavas Schwanni rakupopulatsioonis ühtlaselt kõrgel tasemel ekspresseerunud *NGFR* (Joonis 14). *TrkB* isovormidest avaldus Schwanni rakkudes *TrkB-T1*, millel puudub rakusisene kinaasne domään. *TrkB-T1* ekspressioon oli kõrgel tasemel prolifereeruvates ja diferentseeruvates Schwanni rakkudes, madalamal tasemel kasvuarestis olevates rakkudes (Joonis 14). *TrkB-FL* (täispikk), *TrkB-T2* ja *TrkB-Shc* ei olnud mRNA tasemel Schwanni rakkudes detekteeritavad. *TrkB-T1* ja *BDNF* omavad vastupidist avaldumismustrit Schwanni rakkudes *in vitro*. *BDNF*-i signaliseerimine on Schwanni rakkudes vahendatud *NGFR*-i ja *TrkB-T1* poolt.

Immunoloogilise ELISA meetodiga kontrolliti *BDNF*-i avaldumist ka valgu tasemel, mis kinnitas eelnevalt mRNA tasemel saadud tulemusi, näidates *BDNF*-i madalat avaldumist kasvuarestis olevates Schwanni rakkudes (andmed pole näidatud).



Joonis 14. *BDNF*-i ja tema retseptorite ekspressioon roti primaarsetes Schwanni rakkudes. Schwanni rakkudes on ekspresseerunud *BDNF*-i I, IV ja V eksonilt sünteesitud transkriptid. *BDNF* avaldub kõrgemal tasemel kasvuarestis olevates Schwanni rakkudes. *TrkB-T1* omab *BDNF*-le vastupidist ekspressioonimustrit, olles kõrgemal tasemel prolifereeruvates ja diferentseeruvates Schwanni rakkudes. *NGFR* (joonisel p75) on kõrgelt ekspresseerunud kõigis kolmes Schwanni rakupopulatsioonis. *Oct-6* avaldub diferentseeruvate Schwanni rakkude spetsiifiliselt.

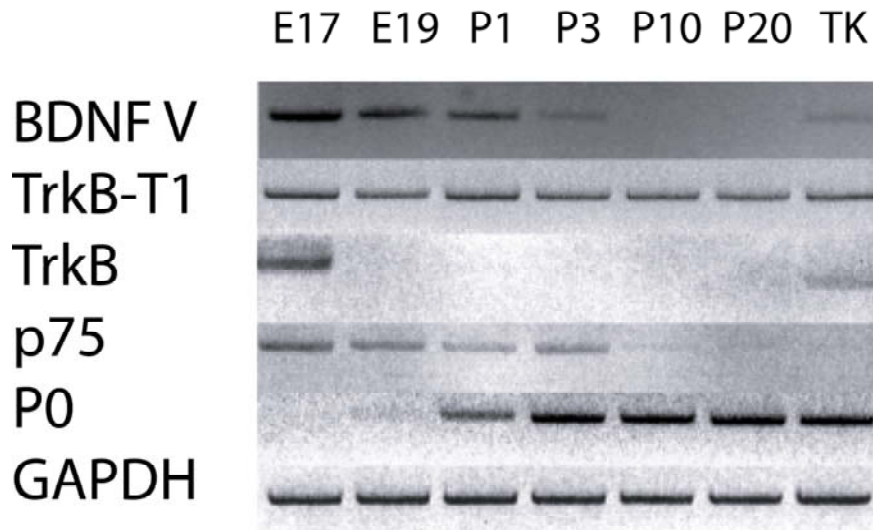
3. *BDNF-i* ja tema retseptorite avaldumine roti istmikunärvi arengus *in vivo*

BDNF-i ja selle retseptorite avaldumist analüüsiti mRNA tasemel roti istmikunärvi (*nervus ischiaticus*) arengus. Istmikunärvid eraldati järgnevatel pre- ja postnataalsetel arengustaadiumitel: 17. embrüonaalsel arengupäeval (E17), E19, postnataalse arengu 1. päeval (P1), P3, P10, P20 ning täiskasvanud (TK) rotist.

Roti perifeerse närvi arengu käigus avaldub *BDNF-i* V eksonilt sünteesitud transkript. *BDNF* oli mRNA tasemel ekspresseerunud arengustaadiumites E17, E19, P1 ja P3 ja seda langevas tendentsis (Joonis 15). *BDNF-i* ekspressioon puudus P10 ja P20, kuid üllataval kombel taastus madalal tasemel täiskasvanud roti istmikunärvis (Joonis 15).

Järgnevalt uuriti *BDNF-i* retseptorite avaldumist istmikunärvi arengus. Täispikk *TrkB* avaldus vaid prenataalses arengus (E17) ning puudus järgnevatel arenguetappidel, kuid taastus madalal tasemel täiskasvanud roti istmikunärvis (Joonis 15). *TrkB-T1* isovorm oli ekspresseerunud ühtlasel tasemel kõigis analüüsitud istmikunärvi arenguetappides, alates E19 kuni TK (Joonis 15). *NGFR* omas istmikunärvi arengus langevat avaldumismustrit, olles kõrgemal tasemel ekspresseerunud E17, nõrgemalt E19, P1, P3, vaevudetekteeritavalt P10, P20 ning puududes täiskasvanud roti istmikunärvis (Joonis 15). Võrdluseks vaadeldi ka müeliinivalgu P0 ekspressiooni roti istmikunärvi arengus. P0 madalat ekspressiooni võis detekteerida E19 ning see tõusis järgnevatel arengumomentidel, jäädes ühtlaselt kõrgele tasemele täiskasvanud roti istmikunärvis (Joonis 15) (Chan et al., 2001).

Saadud tulemused näitavad, et *BDNF* ja *NGFR* omavad varajases arengus (E17 kuni P3) sarnast langevat avaldumismustrit, kuid täiskasvanud istmikunärvis *NGFR* ekspressioon puudub. Vastupidiselt *NGFR*-le omab *TrkB* sarnaselt *BDNF*-le nõrka ekspressioonitaset täiskasvanud roti istmikunärvis.



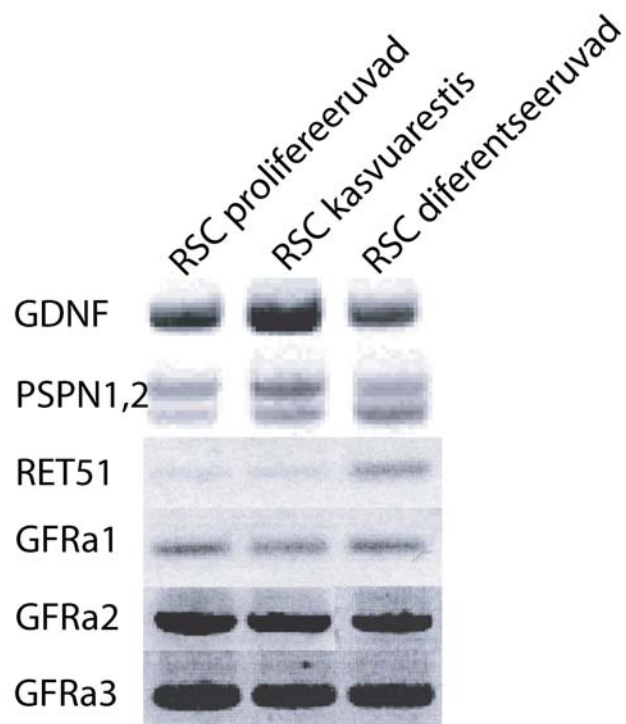
Joonis 15. *BDNF*-i ja tema retseptorite ekspressioon roti istmikunärvi arengus. Roti istmikunärvi arengus avaldub *BDNF*-i V eksonilt sünteesitud transkript. *BDNF* avaldub langevas tendentsis alates E17 kuni P3, puudub P10 ja P20 ning taastub täiskasvanud närvis (TK). *TrkB-T1* retseptor avaldub roti istmikunärvi arenguetappidel ühtlasel tasemel. Täispikk *TrkB* retseptor avaldub E17 ning madalamal tasemel TK. *NGFR* (joonisel p75) omab sarnast avaldumismustrit *BDNF*-le, kuid puudub TK roti istmikunärvis. Müeliinispetsiifilise geeni *P0* ekspressiooni on võimalik detekteerida E19 ning see jääb edasises arengus kõrgele tasemele.

4. *GDNF*-i perekonna ja retseptorite ekspressioon Schwanni rakkudes

Lisaks *BDNF*-le uuriti ka *GDNF*-i perekonna kasvufaktorite ja nende retseptorite avaldumismustrit samades roti Schwanni rakupopulatsioonides. Teadaolevalt ekspresseerub *GDNF* Schwanni rakkudes mRNA tasemel ning selle ekspressioon tõuseb järsult peale istmikunärvi kahjustust (Springer et al., 1994). Meie poolt uuritavates Schwanni rakkudes omab *GDNF* *BDNF*-le sarnast ekspressiooni, olles kõrgemal ekspresseerunud kasvuaresti rakkudes ja madalamal tasemel prolifereeruvates ja diferentseeruvates rakkudes (Joonis 16). Teine *GDNF*-i perekonna liige *PSPN* omab kahte splaissvarianti, mis olid erinevalt ekspresseerunud uuritavas Schwanni rakkude *in vitro* süsteemis. Pikem splaissvariant, *PSPN1*, oli sarnaselt *BDNF*-le ja *GDNF*-le kõrgemal tasemel ekspresseerunud kasvuarestis ja madalamal tasemel prolifereeruvates ja diferentseeruvates Schwanni rakkudes (Joonis 16). *PSPN2* omas erinevat avaldumismustrit, olles kõrgemal tasemel ekspresseerunud diferentseeruvates Schwanni rakkudes ning madalamal tasemel ka prolifereeruvates ja kasvuaresti rakkudes (Joonis 16). *PSPN*-i kahe alternatiivse mRNA splaissvarianti erinev ekspressioonimuster uuritud rakkudes viitab selle kasvufaktori muutuvale rollile Schwanni rakkude arengus.

Kahe ülejäänud *GDNF*-i perekonna kasvufaktori *ARTN*-i ja *NRTN*-i mRNA-d ei olnud meie eksperimentaalsetes tingimustes tuvatatavad. *GDNF*-i perekonna kasvufaktorid vahendavad oma signaali läbi *GFR α* -Ret retseptorkompleksi. *GDNF* seondub spetsiifiliselt *GFR α 1*-le, *NRTN* *GFR α 2*-le, *ARTN* *GFR α 3*-le ja *PSPN* *GFR α 4*-le ning rakusisene signaal antakse edasi RET retseptor türosiinkinaasiga (Saarma and Sariola, 1999). Alternatiivsest splaissingust tulenevad peamiselt kaks RET isovormi, RET9 ja RET51, mis erinevad oma C-terminuse pikkuse poolest (Le Hir et al., 2000). RET9 ja RET51 võivad vahendada erinevaid rakusiseseid signaaliradasid (Tsui-Pierchala et al., 2002). *GDNF*-i perekonna kasvufaktorite retseptoritest oli uuritavates Schwanni rakkudes ekspresseerunud *RET51* isovorm, mille ekspressioon tõusis oluliselt rakkude diferentseerudes ning koretseptorid *GFR α 1*, *GFR α 2* ja *GFR α 3* (Joonis 16). *GFR α* -de ekspressioon Schwanni rakkude diferentseerumisel ei muutunud. *GFR α 1* oli ekspresseerunud teistest madalamal tasemel. *RET9* ja *PSPN*-i spetsiifiline retseptor *GFR α 4* ei olnud antud tingimustel mRNA tasemel detekteeritavad.

GDNF-i perekonna kasvufaktoritel ja nende retseptoritel on Schwanni rakkude arengus varieeruv ekspressioon.



Joonis 16. GDNF-i perekonna kasvufaktorite ja retseptorite mRNA-de ekspressioon roti Schwanni rakkudes (RSC). *GDNF* on kõrgemal tasemel ekspresseerunud kasvuarestis olevates RSC-des. *PSPN1* kasvuarestis ja *PSPN2* diferentseeruvates RSC-des. *RET51* retseptor diferentseeruvates. *GFRa1*, *GFRa2* ja *GFRa3* koretseptorid avalduvad kolmes Schwanni rakupopulatsioonis ühtlaselt, *GFRa1* natukene madalamal tasemel.

5. *BDNF* geeni I promootorile seostuvate valkkomplekside analüüs

BDNF I promootoris on kirjeldatud Ca^{2+} poolt reguleeritud piirkondi. -94 kuni -82 bp I eksonist asub CRE konsensusjärjestus 5'-TTGGTCACGTAA-3' ja sellega kattuvalt -94 kuni -79 bp USF konsensusjärjestus 5'-TTGGTCACGTAAGT-3' (Tabuchi et al, 2002).

Schwanni rakkudes avaldus *BDNF* I promootori aktiivsus mRNA tasemel rakkudes, mille jagunemine oli peatatud. Transkriptsiooni regulatsioonis osalevate primaarjärjestuste analüüsiks kasutasime *BDNF* I promootori 0.6 kb *Bam* HI/*Sac* I (Timmusk et al 1993) ala, mis asub - 528 bp kuni + 118 bp *BDNF* I eksoni suhtes. Antud piirkonnale disainiti spetsiifilised praimerid ja radioaktiivse PCR-i abil sünteesiti [α - ^{32}P]-dCTP-ga märgitud 50-100 bp pikkused fragmendid. Märgitud fragmentide seondumist uuriti Schwanni rakkude tuumaekstraktides olevate valkudega, kasutades EMSA meetodit. Kasutades erinevate praimeritega saadud fragmente analüüsiti EMSA-ga detailselt kogu 0.6 kb pikkune *BDNF* I promootori ala. Peatähelepanu oli pööratud kolmes roti Schwanni rakupopulatsioonist eraldatud tuumaekstraktidega diferentsiaalselt seonduvatele *BDNF* I promootori piirkondadele. *BDNF* I promootoris leiti EMSA analüüsiga kaks sellist regiooni, mis andsid uuritavates Schwanni rakupopulatsioonides erineva mobiilsusnihke. Esimene 93 bp pikkune ala (sünteesitud praimeritega BDNFI_{sense5} ja BDNFI_{anti6}) asub -318 kuni -225 bp I eksonist, mis omas intensiivsemaid mobiilsusnihkeid prolifereeruvate Schwanni rakkude tuumaekstrakte kasutades (Joonis 17A). Kontrollina kasutati eksperimentides roti ajukoore ekstrakte, kuna *BDNF* avaldub ajukoores teadaolevalt kõrgel tasemel.

Teine 85 bp pikkune promootori piirkond (sünteesitud praimeritega BDNFI_{sense7} ja BDNFI_{anti7}) asub -238 kuni -152 bp *BDNF* I eksonist, mis andis esimese piirkonnaga analoogse mobiilsusnihke, tugevama kompleksi prolifereeruvate Schwanni tuumaekstraktidega (Joonis 17B).

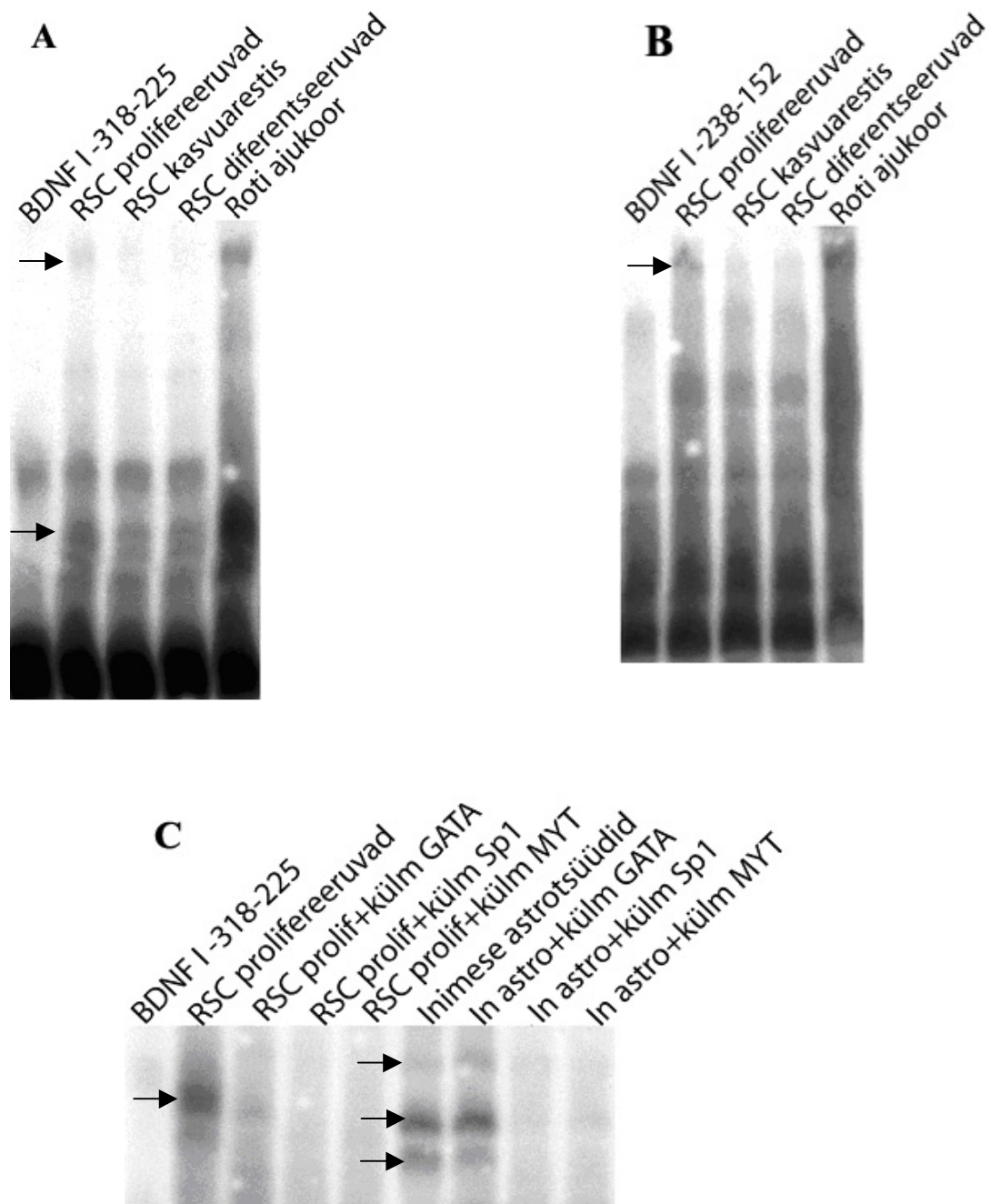
Kasutades transkriptsioonifaktorite sidumiskohtade ennustusprogramme (vt materjalid ja meetodid ning *BDNF in silico* analüüs) uuriti, millised teadaolevad transkriptsioonifaktorid võivad seonduda eelpool leitud regulaatorsetele aladele. *BDNF* I promootori -318 kuni -225 pb alal on teiste seas võimalikud seondumiskohad transkriptsioonifaktoritel GATA (GAT trinukleotiidid -273 bp ja -261 bp I eksonist), MYT (AGTT -284 bp I eksonist) ja Sp1-l (mitu seondumiskohta -299 kuni -285 järjestustes AGAGGAAAAGGGAA ning AGAGGA -199 bp). *BDNF* -318 kuni 225 bp ala I eksonist spetsiifiliseks uurimiseks, lisati EMSA reaktsiooni 50x molaarses ülehulgas eelpool nimetatud transkriptsioonifaktorite

märgistamata seondumiskohti. Radioaktiivselt märgistamata MYT ja Sp1 järjestused seonduvad EMSA reaktsioonis rakuekstraktides olevate valkudega, konkureerides radioaktiivselt märgistatud *BDNF* I -318 kuni -225 bp alaga.

EMSA-s roti prolifereruvate Schwanni rakkude tuumaekstraktidega võis täheldada külma GATA proovi lisamisel väikest mobiilsusnihke signaali intensiivsuse nõrgenemist. Külmade MYT ja SP1 lisamisel toimus mobiilsusnihete signaali silmnähtav vähenemine (Joonis 17C). Samuti uuriti, kuidas käitub *BDNF* I -318 kuni -225 bp märgistatud ala inimese astrotsüütide ekstraktidega ja kas ka seal toimub muutus külmade GATA, MYT ja SP1 seondumiskohtade lisamisel. Märgistatud *BDNF* I -318 kuni -225 bp ala annab inimese astrotsüütide ekstraktides kolm mobiilsusnihet. Külma GATA seondumiskoha lisamisega ei toimu mobiilsusnihke intensiivsuse vähenemist, küll aga kaob visuaalne kompleks märgistamata MYT ja SP1-e konsensusjärjestuste liias lisamisel EMSA reaktsiooni (Joonis 17C).

BDNF I -238 kuni -152 bp piirkond sisaldab teiste seas samuti GATA ja SP1 ning lisaks DRE võimalikke seondumiskohti. Nimetatud transkriptsioonifaktorite märgistamata seondumiskohtade ülehulgas lisamine EMSA reaktsiooni märgistatud *BDNF* I promotori -238 kuni -152 bp fragmendi ja prolifereruvate roti Schwanni rakkude tuumaekstraktidega ning inimese astrotsüütide ekstraktidega ei põhjustanud mobiilsusnihke intensiivsuse vähenemist.

Eelpooltoodud eksperimentide tulemusel saab järeldada, et *BDNF* I promootoris leidub mitu piirkonda, mis osalevad transkriptsiooni regulatsioonis. Transkriptsioonifaktorid Sp1 ja MYT seonduvad spetsiifiliselt *BDNF* I promotori -318 -225 bp piirkonda ning võivad osaleda *BDNF*-i ekspressiooni represserimises prolifereruvates Schwanni rakkudes.



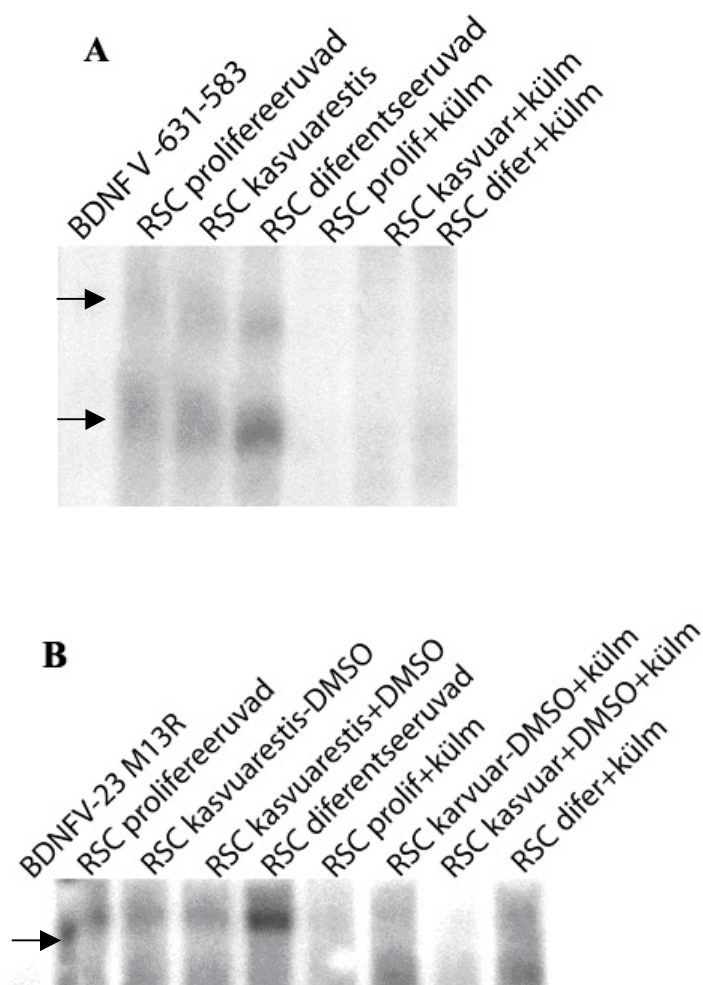
Joonis17. *BDNF I* promootori analüüs EMSA-ga. A. EMSA *BDNF I* promootori -318 kuni -225 bp ala ja roti Schwanni rakkude (RSC) tuumaekstraktidega. Intensiivsemad mobiilsusnihked proliferatsioonivõimeliste Schwanni rakkude tuumaekstraktidega. B. EMSA *BDNF I* promootori -238 kuni -152 bp ala ja RSC tuumaekstraktidega. Intensiivsemad mobiilsusnihked proliferatsioonivõimeliste RSC tuumaekstraktidega. C. EMSA *BDNF I* -318 kuni -225 bp ala ja RSC proliferatsioonivõimeliste tuumaekstraktide ning inimese astrotsüütide ekstraktidega. EMSA reaktsioonile lisati määrdamata GATA, Sp1 ja MYT konsensusjärjestused. Nooltega on näidatud tekkinud mobiilsusnihked.

6. *BDNF* geeni V promootorile seostuvate valkkomplekside analüüs

Kõige kõrgemal tasemel avaldus Schwanni rakkudes *BDNF* V mittekodeerivat eksonit sisaldav mRNA. Selline *BDNF*-i mRNA avaldus intensiivsemalt kasvuarestis olevates ning madalamal tasemel proliferuuvates ja diferentseeruvates roti Schwanni rakkudes. Et tuvastada transkriptsiooni regulatsioonis osalevaid järjestusi EMSA analüüsis, kasutati *BDNF* V 0.7 kb *Eco* RI/*Sma* I piirkonda (Timmusk et al., 1993), mis asub -634 kuni +86 bp *BDNF* V eksoni mažoorsest alguskohast. Vastavale alale disainiti spetsiifilised praimerid ja PCR-ga sünteesiti radioaktiivselt märgistatud 50-100 bp pikkused fragmendid, millega analüüsiti EMSA-t kasutades kogu 0.7 kb piirkond. Peatähelepanu pöörati reguleerivatele mobiilsusnihetele eritüübilistes Schwanni rakkude tuumaekstraktides. Selles *BDNF*-i promootoris leiti kaks piirkonda, mis andsid diferentsiaalse mobiilsusnihe uuritavate tuumaekstraktidega. Esimene 48 bp pikkune promootori ala (sünteesitud praimeritega BDNFV52sense ja BDNFV52anti) asub -631 kuni -583 bp V eksoni alguskohast. EMSA-ga võis detekteerida antud ala kahte mobiilsusnihet, mis olid intensiivsemad diferentseeruvate roti Schwanni rakkude tuumaekstraktidega. Mitteradioaktiivselt märgistatud 48 bp fragmendi lisamine 50x molaarses ülehulgas kaotas nähtavad mobiilsusnihed, mis näitab sidumise spetsiifilisust (Joonis 18A).

Teine eeldatavalt reguleeriv piirkond leiti vahetult enne *BDNF* V eksoni algust, -23 bp. Eelkatsetes, kus uuritav *BDNF* V 0.7 kb *Eco* RI/*Sma* I ala lõigati restriktasiga *Alu* I (lõikekoht positsioonis AG/CT) ning saadud fragmentidega teostati EMSA analüüs, viitasid reguleerivale alale -27 kuni +12 bp *BDNF* V eksoni mažoorsest alguskohast. Edasistes katsetes kasutati *BDNF* V promootoralale disainitud spetsiifilisi praimereid (mõnes eksperimendis kasutati vektoris asuvaid praimereid, sest GC rikkuse tõttu osutus promootorspetsiifiliste praimerite disain võimatuks). BDNFV77sense ja M13R praimeritega sünteesitud fragment (mis katab piirkonna -23 bp kuni +83 bp *BDNF* I eksonist) andis iseloomult sarnase mobiilsusnihe, eelkatsetes saadud -27+12 *Alu* I fragmendiga. Intensiivsemat DNA/valk interaktsiooni võis näha proliferuuvate ja diferentseeruvate roti Schwanni tuumaekstraktidega. Märkimata proovi lisamine 50x molaarses ülehulgas kaotas mobiilsusnihed proliferuuvate ja diferentseeruvate tuumaekstraktidega (Joonis 18B). Kokkuvõttes leiti *BDNF*-i V promootoris kaks ala, mis tekitasid kolmes erinevas Schwanni rakupopulatsioonist eraldatud rakuekstraktidega diferentsiaalseid mobiilsusnihi. Need piirkonnad *BDNF* V eksoni eelses promootoris võivad sisaldada transkriptsioonifaktorite

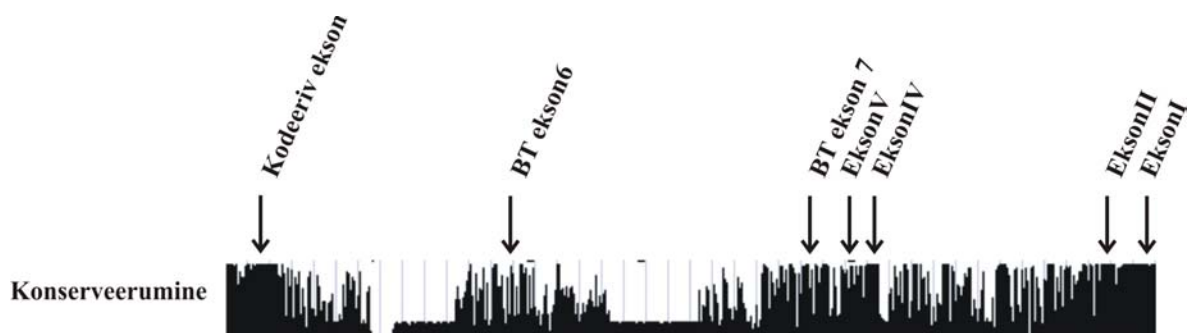
seondumiskohti, mis inhibeerivad *BDNF*-i ekspressiooni prolifereruvates ja diferentseeruvates Schwanni rakkudes.



Joonis 18. *BDNF* V promootori analüüs roti Schwanni rakkudes (RSC) EMSA-ga. A. EMSA *BDNF* V promootori -581 kuni -533 alaga andis intensiivsemid mobiilsusnihked prolifereruvate ja diferentseeruvate RSC tuumaekstraktidega. *BDNF* V -581-533 külma proovi lisamisel tõrjuti välja visuaalne kompleks. **B.** EMSA *BDNF* V promootori ala -23 bp enne V eksoni algust andis intensiivsema mobiilsusnihke prolifereruvate ja diferentseeruvate RSC tuumaekstraktidega. Nooltega on näidatud tekkinud mobiilsusnihked.

7. *In silico* analüüs Schwanni rakkude arengus reguleeritud *BDNF*-i promootorite järjestustele

BDNF geeni primaarjärjestuse fülogeneetiline analüüs (kasutatud programmid vt materjalid metoodika) näitab inimese *BDNF* geeni struktuuri kõrget konserveerumist imetajate seas. Imetajatele analoogne *BDNF* geeni struktuur esineb ka fülogeneetiliselt kaugemal asuvatel organismidel, kanal, kerakalal ja sebrakalal (Joonis 19). Viimaste andmete kohaselt on inimesel seitse, hiirel ja rottil kuus ja sebrakalal samuti seitse 5'eksonit ja üks kodeeriv 3'ekson (Gotz et al., 1992; Hayes et al., 1997; Heinrich, 2003; Timmusk et al., 1993).



Joonis 19. *BDNF* geeni primaarjärjestuse konserveerumine erinevate liikide vahel. Järjestatud inimese *BDNF* geeni (AY054392) suhtes. Joonise ülemisel osal on näidatud *BDNF*-i ja vastasahelal paikneva *BT* geenide eksonite asukohad. Konserveerumine on näidatud piikidena inimese, šimpansi, koera, hiire, roti, kana, kerakala ja sebrakala *BDNF*-i geenide vahel. (kasutades UCSC Genome Browser'it <http://genome.ucsc.edu>).

BDNF-i I, IV ja V eksonid ja nende eelnevad promootorialad, mis kodeerivad Schwanni rakkudes ekspresseeruvaid mRNA-si, on imetajatel kõrgelt konserveerunud. *In vitro* Schwanni kolmes erinevast kasvutingimusest leitud reguleerivaid alasid analüüsiti transkriptsioonifaktorite ennustusprogrammiga ConSite ning saadud tulemusi võrreldi MatInspector ja TESS programmidega (vt materjalid ja metoodika).

BDNF I promootori -318 bp kuni -225 piirkond on imetajate seas (inimene, hiir, rott, koer) osaliselt (-318 kuni -272 *BDNF* I eksonist) väga kõrgelt konserveerunud (Joonis 20). ConSite programm ennustab seal mitut Sp1 (SPI-1, SPI-B) sidumise konsensusjärjestust ja

samuti mitut GATA perekonna transkriptsioonifaktorite võimalikku seondumiskohta. MatInspector programm ennustas lisaks teiste seas MYT1 (*myelin transcription factor 1*) sidumisjärjestust (gggaaAGTTgtgggg -290 bp kuni -275 bp *BDNF* I eksonist). EMSA-ga võis antud piirkonna ja prolifereeruvate Schwanni rakkude tuumaekstraktide vahel detekteerida mitut DNA/valk interaktsiooni, mis märkimata Sp1 ja MYT konsensusjärjestuste lisamisel kaotasid visuaalse kompleksi.

Ka *BDNF* I -238 kuni -152 bp piirkond on fülogeneetiliselt konserveerunud. Eriti kõrgelt on konserveerunud inimese, hiire, roti ja koera suhtes *BDNF* I promootori piirkond -201 kuni -153 bp enne I eskoni algust (Joonis 21). ConSite programm ennustab antud piirkonnale teiste seas mitut GATA1,2, Sp1, Pax-2 ja MZF1-4 (*myeloid zinc finger*) transkriptsioonifaktorite seondumiskohti. MatInspector programm ja TESS ennustavad antud piirkonnale lisaks veel paljusi *cis*-regulaatorseid järjestusi, teiste seas neurogeniini (*Ngn1,3*) konsensusjärjestust (cccCCATttgatc -216 kuni -194 bp *BDNF* I eksonist). Edaspidistes katsetes oleks huvitav uurida selle närvisüsteemispetsiifilise valguga võimalikku rolli *BDNF* I promootori regulatsioonis.

BDNF V promootor on samuti suhteliselt konserveerunud. *In vitro* EMSA analüüsiga kolmes *in vitro* saadud Schwanni rakupopulatsioonis leiti erinev DNA/valk komplekside moodustamise võime aladel -631 bp kuni -583 bp ja -23 bp kuni +83 bp *BDNF* V eksonist. ConSite programm ennustab -615 kuni -583 bp regiooni AML-1, E2F, SPI-1, AP2alpha, Pax-2 seondumiskohti (Joonis 22). Rohkem tähelepanu võiks siinkohal pöörata transkriptsioonifaktorile E2F, mis on seotud rakutsükli regulatsiooniga (Cobrinik, 2005). Ka MatInspector ja TESS ennustavad E2F-i seondumist suure tõenäosusega -615 kuni -583 piirkonda *BDNF* V eksoni ees. Järgnevates katsetes oleks kindlasti väga huvitav uurida nimetatud faktori osatähtsust *BDNF* V promootori regulatsioonis.

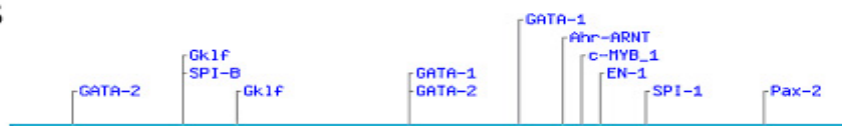
BDNF V eksoni algus ja sellele eelnev promootoriala on väga GC rikkad, mis teeb selle ala bioinformaatilise analüüsi komplitseerituks. Väheste transkriptsioonifaktorite jaoks on leitud spetsiifilise mustriaga GC rikkaid sidumissaite. *In vitro* leiti, et kolmes Schwanni rakupopulatsioonis käitub regulaatorsest piirkond, mis algab -23 bp V eksoni stardikohast. -18 kuni -9 bp V eksoni algusest asub inimese, šimpansi, hiire, roti vahel kõrgelt konserveerunud 9 bp pikkune järjestus, millele ConSite ennustab c-Fos-i seondumist (tuntud ka AP-1 sidumissaidina) (75% cutoff score) (Joonis 23). c-Fos (nim ka SRF) osaleb silelihaste diferentseerumise ja prolifereerumisega seotud geenide aktivatsioonis (Wang et al., 2004).

Bioinformaatika analüüs *BDNF* I ja V promootori aladele, mis olid Schwanni rakkude kolmes rakupopulatsioonis erinevalt reguleeritud, viitab antud alade kõrgele konserveerumisele. Erinevate transkriptsioonifaktorite ennustusprogrammidega võib leida mitmete huvitavate, rakutsüklis sõltuvate või rakkude diferentseerumist mõjutavate faktorite seondumiskohti *BDNF* I ja V promootorite aladele.

A

Inimene CAGCCCAACAACCTTTCCCTTTTCCTCTTAGGTACTGATGACTAGGC
Hiir CAGCCCCACAACCTTTCCCTTTTCCTCTTAGGGACTGATGACTAGGC
Rott CAGCCCCACAACCTTTCCCTTTTCCTCTTAGGGACTGATGACTAGGC
Koer CAGCCCGACAACCTTTTCCTCTCCCTCCCAGGGACCGATGACTAGGC

B

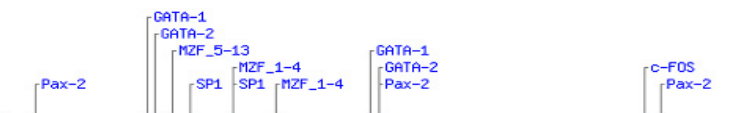


Joonis 20. *BDNF* I promootori konserveerunud piirkond -318 kuni -272 bp enne I eksonit. A. Joondatud inimese, hiire, roti ja koera -318 kuni -272 bp piirkonna järjestused *BDNF*-i I eksoni eest. ([kasutades UCSC Genome Browser'it](#)). B. Graafiliselt esitus transkriptsioonifaktorite seondumiskohtadele piirkonnas -318 kuni -272 bp enne *BDNF* I eksonit, kasutades programmi ConSite (TFscore cutoff 90% võrdluses inimene/hiir/rott).

A

Inimene ATCATGAC-TAAGGGTCTCCAGCCGATGAGGTCGTGAGTGAT-GATCAAA
Hiir ACCATGAC-TAAGGGTCTCCAGCGGACGTGGTCGTGAGTGAT-GATCAAA
Rott ACCATGAC-TAAGGGTCTCCAGCGGACGTGGTCGTGAGTGAT-GATCAAA
Koer ATCATGACATAAGGGTCTCCAGCTGATGAGGTCGTGAGTGATGGATCCGG

B



Joonis 21. *BDNF* I promootori konserveerunud piirkond -201 kuni -153 bp enne *BDNF* I eksonit. A. Joondatud inimese, hiire, roti ja koera -201 kuni -153 bp järjestuste piirkond *BDNF*-i I eksoni eest ([kasutades UCSC Genome Browser'it](#)). B. Graafiliselt esitus transkriptsioonifaktorite seondumiskohtadele piirkonnas -201 kuni -153 bp enne *BDNF* I eksonit, kasutades programmi ConSite (TFscore cutoff 90% võrdluses inimene/hiir/rott).

A

Inimene	TTAAACAGAGTTCGCGCACTGACCTCTCTAG
Šimpans	TTAAACAGAGTTCGCGCACTGACCTCTCTAG
Hiir	TTAACCAGAGTTTGCGCCCTGACCTCTCCGG
Rott	TTAACCAGAGTTCGCGCCCTGACCTCTCCGG
Kana	TTAAATATCACTCCCGCGCTGACCTCC----

B



Joonis 22. *BDNF* V promootori konserveerunud piirkond -615 kuni -583 bp enne V eksoni mazooret alguskohta. A. Joondatud inimese, hiire, roti ja koera -615 kuni -583 bp järjestuste piirkond *BDNF*-i V eksoni eest ([kasutades UCSC Genome Browser'it](#)). **B.** Graafiliselt esitus transkriptsioonifaktorite seondumiskohtadele piirkonnas -201 kuni -153 bp enne *BDNF* I eksonit, kasutades programmi ConSite (TFscore cutoff 90% võrdluses inimene/hiir/rott).

A

Inimene	GGGTCAGACATTAT-
Šimpans	-GGTCAGACA-----
Hiir	GGGTCAGACATTAT-
Rott	GGGTCAGACATTAT-

B



Joonis 23. *BDNF* V promootori konserveerunud piirkond -23 kuni -9 bp *BDNF* V eksoni mažoorest algusest. A. Joondatud inimese, hiire, roti ja koera -23 kuni -9 bp järjestuste piirkond *BDNF* V eksoni mažoorest algusest ([kasutades UCSC Genome Browser'it](#)). **B.** Graafiliselt esitus transkriptsioonifaktorite seondumiskohtadele piirkonnas -23 kuni -9 bp *BDNF* V eksoni mažoorest algusest, kasutades programmi ConSite (TFscore cutoff 90% võrdluses inimene/hiir/rott).

ARUTELU

Viimastel aastatel on hakatud üha enam tähelepanu pöörama neurotrofiinide osatähtsusele PNS-s. KNS-s moodustavad müeliinkatte ümber närvirakujätkete oligodendrotsüüdid. PNS-s moodustavad müeliinkatte Schwanni rakud. Schwanni rakkudel arvatakse PNS-i närvifunktsiooni taastamisel olevat eriline roll, kuna KNS-i oligodendrotsüüdid ei suuda tagada närviraku regenereerumist. Neuron ja Schwanni raku omavahelises suhtlemises osalevad teiste seas neurotrofiinid ja nende retseptorid, mis võivad olla ekspresseeritud nii närviraku kui Schwanni raku poolt. Troofilised faktorid osalevad närviraku ja Schwanni raku vastastikkuses signaliseerimises, aidates kaasa perifeerse närvi arengule ja regenereerumisele. Neurotrofiine on nimetatud PNS-i müeliniseerimisprotsessi võtmeregulaatoriteks (Chan et al., 2001)

Schwanni rakkude arengu uurimiseks on võetud kasutusele peamiselt kaks *in vitro* meetodit. Üks võimalus on uurida PNS-i gliia ja närviraku vahelist signaliseerimist Schwanni rakkude ja spinaalganglionite (DRG) kooskultuuris, mis annab võimaluse jälgida Schwanni rakkude poolt müeliini moodustamist ümber aksoni *in vitro* ja uurida sellega seotud mehhanisme. Samas võib närvirakust tulenevat signaali imiteerida ka cAMP taset tõstvate kemikaalidega, antud töös kasutati selleks forskoliini. cAMP tõstmine indutseerib Schwanni rakkude kultuuri müeliniseerivat fenotüüpi (Morgan et al., 1991). Teise süsteemi kasutamine võimaldab uurida ka *BDNF*-i Schwanni rakkude spetsiifilist ekspressiooni, sest Schwanni rakkude/DRG kooskultuuri puhul on raske detekteerida, kas geeni avaldumine ja valgu ekspressioon tuleneb närvirakust või seda ümbritsevast Schwanni rakust.

Meie poolt uuritud kolmes eritüüpi Schwanni rakkude kultuuris avaldusid mRNA tasemel *BDNF*-i I, IV ja V promootoritelt indutseeritud transkriptid. *BDNF* I ja IV promootori transkriptid ekspresseerusid kasvuaresti viidud Schwanni rakkudes. *BDNF* V promootori transkript avaldus lisaks ka prolifereeruvates ja diferentseeruvates Schwanni rakkudes.

BDNF vahendab oma positiivset efekti müeliniseerimisele arvatavasti läbi retseptori *NGFR* (Cosgaya et al., 2002). *NGFR* oli kõrgelt ekspresseerunud kolmes uuritavas Schwanni rakupopulatsioonis. Närvirakkudes on laialdaselt ekspresseerunud *BDNF*-i retseptor *TrkB* (Cabelli, 1996). Schwanni rakkudes täispikk *TrkB* ei avaldunud, küll aga ekspresseerus prolifereeruvates ja diferentseeruvates Schwanni rakkudes selle lühendatud isovorm *TrkB-T1*. *TrkB-T1* l puudub rakusisene kinaasne domään. *BDNF* ja *TrkB-T1* omasid vastupidist ekspressioonimustrit kolmes Schwanni rakupopulatsioonis. *BDNF* oli kõrgel tasemel

kasvuaresti rakkudes ja *TrkB-T1* prolifereeruvates ja diferentseeruvates Schwanni rakkudes. TrkB-T1 käitub tihtipeale kui dominant negatiivne retseptor, sidudes rakupinnal BDNF-i, kuid ei vahenda selle signaali raku sisse. TrkB-T1 võib takistada BDNF-i autoregulaatorset tagasisidet prolifereeruvates ja diferentseeruvates Schwanni rakkudes. *BDNF*-i ja *TrkB-T1* vastupidine avaldumismuster Schwanni rakkudes viitab, et BDNF-i ekspressioon on suunatud närvirakkudele.

Palju on viidatud BDNF-i ja GDNF-i koekspressioonile PNS-is (Zhao et al., 2004; Toyomoto et al., 2005). Näiteks on närvikahjustuse distaalses osas Schwanni rakkude poolt ekspresseeritud GDNF ja BDNF olulised motoorse aksoni regeneratsiooniks ning just nende kombineeritud ekspressioon tagab efektiivsema motoorse närvi regeneratsiooni PNS-s (Boyd and Gordon, 2003). Seega oli huvitav uurida, kas ja kuidas on GDNF ja teised selle perekonna kasvufaktorid ning retseptorid uuritavas kolmes erinevas Schwanni rakupopulatsioonis avaldunud. *GDNF* omab Schwanni rakkudes *BDNF*-le sarnast avaldumismustrit, olles kõrgemal tasemel ekspresseerunud kasvuarestis ning veidi madalamal tasemel nii prolifereeruvates kui ka diferentseeruvates Schwanni rakkudes. Veelgi huvitavamalt ekspressioonimustrit omab aga *PSPN*, millel ekspresseerub Schwanni rakkudes kaks splaissvarianti. Neist pikem on mRNA tasemel tugevamalt ekspresseeritud diferentseeruvates ja lühem on kõrgema avaldumisega prolifereeruvates Schwanni rakkudes.

Käesolevas töös on kirjeldatud esimest korda endogeense *BDNF*-i ja selle retseptorite ekspressiooni roti istmikunärvi arengus *in vivo* alates E17. Varem on uuritud eksogeense BDNF-i efekti müeliini formeerumisele vastündinud hiire istmikunärvis (Chan et al., 2001). BDNF-i subkutaanne süstimine hiire istmikunärvi lähedusse tõstis müeliinivalkude MAG ja P0 ekspressiooni rohkem kui 50%. BDNF suurendab müeliniseeritud aksonite arvu ning samuti müeliinkihi paksenemist ümber aksoni. Cosagaya ja kolleegid (Cosagaya et al., 2002) kirjeldasid neurotrofiinide retseptorite *NGFR*, *TrkB-T1* ning *TrkC* mRNA ekspressiooni Schwanni rakkudes ja spinaalganglionites (DRG) ning nende kooskultuuris, samuti täiskasvanud istmikunärvis. *NGFR* ekspresseerub mRNA tasemel Schwanni rakkudes, madalamalt DRG-s, kõrgelt nende kooskultuuris. *TrkB-T1* ekspresseerub Schwanni rakkudes ja kooskultuuris DRG-ga. *TrkC* mRNA avaldub nii Schwanni rakkudes kui ka DRG-s ning kõrgemalt nende kooskultuuris. Western blot`ga kontrolliti *NGFR*, *TrkB-T1* ning *TrkC* retseptorite valguekspressiooni hiire istmikunärvi arengus (Cosagaya et al., 2002). Hiire istmikunärvi esimestel postnataalsetel päevadel on kõrge *NGFR* ja *TrkB*-

T1 valgu ekspressioon. NGFR ekspressioon langeb järk-järgult, jäädes madalale tasemele täiskasvanud hiire istmikunärvis. Trk-T1 ekspressioon tõuseb 5. päeval järsu piigina ning 10. päeval on selle ekspressioon vähenenud pea kolm korda (Cosgaya et al., 2002).

Käesoleva töö tulemused näitavad *BDNF*-i ja *NGFR* sarnast arengulist ekspresseerumist roti istmikunärvis. *BDNF* ja *NGFR* on mRNA tasemel kõrgelt ekspresseerunud roti embrüonaalses istmikunärvis ning peale sünni nende avaldumine langeb. *BDNF*-i ekspressioon kaob varajases postnataalses arengus, taastudes nõrgal tasemel täiskasvanud roti istmikunärvis. *NGFR*-i ekspressioon on postnataalses arengus mRNA tasemel vaevudetekteeritav. *TrkB-T1*-e mRNA ekspresseerub roti istmikunärvi arengus ühtlasel tasemel. Meie poolt tuvastatud *TrkB-T1*-e ekspresseerimismuster roti istmikunärvis erineb eelnevatest andmetest hiire istmikunärvis (Cosgaya et al., 2002). Erinevus võib olla tingitud sellest, et Cosgaya ja kolleegid tegid istmikunärvi arengus kindlaks NGFR ja Trk-T1 valgu hulga, kuid käesolevas töös uuriti nende retseptorite ekspresseerumise mRNA tasemel. Antud töö tulemused näitavad, et *TrkB-T1* ekspresseerimine roti istmikunärvi arengus mRNA tasemel ei muutu. Uuritud istmikunärvi osas võib üldjuhul detekteerida ainult Schwanni rakkude (või ka fibroblastide) mRNA-d, aksonaalselt transporditava mRNA hulk on suhteliselt väike. Samas valgu tasemel võib aksonis leida märkimisväärset valgu kogust. Cosgaya ja kolleegide katsetest tuvastatud TrkB-T1 valgu järsk tõus hiire istmikunärvis viiendal postnataalsel arengupäeval on meie tulemustest lähtuvalt hoopis neuraalse päritoluga.

Cosgaya ja kolleegid kirjeldasid eelnevalt TrkB väga madalat ekspresseerumist võrreldes TrkB-T1 isovormiga hiire istmikunärvis. Roti istmikunärvi arengus võisime detekteerida täispika *TrkB* mRNA ekspresseerumise E17, edasises arengus polnud *TrkB* detekteeritav, kuid ekspresseerimine taastus madalal tasemel täiskasvanud roti istmikunärvis. Täiskasvanud roti istmikunärvis avaldusid nii *BDNF*-i kui ka *TrkB* mRNA madalal tasemel

BDNF omab kompleksset geenistruktuuri. *BDNF*-i ekspresseerumise koopesiifika on tagatud mittetransleeritavate 5'eksonitega, mis koos nende ees olevate aladega käituvad kui alternatiivsed promootorid (Timmusk et al., 1993).

Antud töös uurisime Schwanni rakkudes aktiivsete *BDNF*-i I, IV ja V promootorite reguleerimise piirkondi EMSA-ga. Tähelepanu pöörasime just kolmes rakupopulatsioonis erinevaid mobiilsusnihkeid omavatele *BDNF*-i geeni promootorite piirkondadele. *BDNF*-i I ja V promootoris leiti mitu piirkonda, mis andsid uuritavates tingimustes erinevaid mobiilsusnihkeid, viidates *BDNF*-i erinevale reguleerimisele Schwanni rakkude arengus. Ka

terve *BDNF*-i IV promootor analüüsiti EMSA-ga, kuid seal ei täheldatud kolmes Schwanni rakukultuuri tingimustest tulenevaid varieeruvaid mobiilsusnihkeid. Teadaolevalt on *BDNF*-i IV promootor (endise nimega III promootor) väga neuraalse ekspressiooniga ja see ehk selgitabki Schwanni rakkudest pärit transkriptsioonifaktori mittespetsiifilisust selle promootori suhtes. *BDNF* I promootoris leidsime kaks piirkonda, mis andsid roti Schwanni rakkude tuumaekstraktidega varieeruvaid mobiilsusnihkeid. Esimene 93 bp pikkune ala asub -318 kuni -225 bp ja teine 85 bp pikkune piirkond -238 kuni -152 bp *BDNF* I eksonist. Intensiivsemat mobiilsusnihet võis täheldada nimetatud piirkondadega prolifereeruvate roti Schwanni rakkude tuumaekstraktidega. RT-PCR-ga näitasime eelnevalt, et *BDNF* on mRNA tasemel ekspresseerunud kasvuarestis roti Schwanni rakkudes. EMSA-ga detekteeritud intensiivsemad mobiilsusnihked võivad olla tekitatud mõne repressorelemendi poolt, mis takistavad *BDNF*-i ekspressiooni prolifereeruvates Schwanni rakkudes.

Bioinformaatiline analüüs *BDNF* I promootori mobiilsusnihkeid tekitanud piirkondadele näitas antud alade kõrget konserveerumist evolutsioonis. Erinevad transkriptsioonifaktorite ennustusprogrammid leidsid mitmeid võimalikke cis-regulaatorseid elemente vastavates *BDNF* I promootoralades, teiste seas GATA, Sp1 ja Myt faktorite seondumiskohti. EMSA konkureerivate külmade Sp1 ja MYT konsensusjärjestustega kaotas erinevuse detekteeritud DNA/valk kompleksi osas *BDNF* I promootori -318 -225 bp piirkonnas prolifereeruvate Schwanni rakkude tuumaekstraktide ning inimese astrotsüütide ekstraktide vahel. Sp1 ja MYT konsensusjärjestused asuvad *BDNF* I promootori -318 -225 bp piirkonnas üsna lähestikku. Antud katsetest eeldame võimalikku on Sp1 ja MYT kompleksi seondumist *BDNF* I promootori -318 -225 piirkonda ning osalust *BDNF*-i ekspressiooni alla surumine prolifereeruvates Schwanni rakkudes. Ka *BDNF* I promootori -238 -152 piirkond sisaldas teiste seas GATA ja Sp1 seondumiskohti, kuid EMSA väljatõrjumiskatsed nende märkimata konsensusjärjestusega ei kaotanud visuaalset kompleksi *BDNF* I -238 -152 piirkonna ja Schwanni prolifereeruvate ja inimese astrotsüütide rakuekstraktide vahel. Arvatavasti ei mõjuta GATA ja Sp1 *BDNF* I promootori transkriptsiooni regulatsiooni -238 -152 piirkonna kaudu.

BDNF V promootori uuringud EMSA-ga viitasid kahele piirkonnale, mis võivad eritüübilistes roti Schwanni rakkudes osaleda erinevalt reguleeritud geeni avaldumises. Nii eelkatsed *Alu* I restriiktaasiga lõigatud kui ka spetsiifiliste praimeritega sünteesitud *BDNF* I promootori fragmentidega näitasid kolmes rakutüübis sarnase iseloomuga varieeruvaid mobiilsusnihkeid. Esimene 48 bp piirkond asub -631 kuni -583 bp *BDNF* V eksonist ja

teine piirkond paikneb -23 bp ülalpool V eksoni mažoorsest alguskohast. Mõlemad piirkonnad tekitavad sarnase iseloomuga mobiilsusnihkeid roti Schwanni rakkude tuumaekstraktidega, mis on intensiivsemad proliferuivate ja diferentseeruvate Schwanni rakkude tuumaekstraktidega. Sellest järeldame nende võimalikku osalisust *BDNF* I promotori regulatsioonis Schwanni rakkude arengus.

KOKKUVÕTE

Käesolevas töös kirjeldatakse perifeerse närvisüsteemi (PNS-i) arengu molekulaarset külge ja troofilise faktori BDNF-i osatähtsust selles. Perifeerse närvisüsteemi kujunemisel ja regenereerumisprotsessis on väga oluline närvirakkude ja seda ümbritseva gliia omavaheline vastastikkune signaalide vahetus, mis tagab kogu süsteemi terviklikkuse.

Kuigi närvirakk on informatsiooni edasikandjaks, ei funktsioneeriks närvisüsteem ilma gliia normaalselt. PNS-is on närvirakku ümbritsevateks gliia rakkudeks Schwanni rakud. Närviraku ja Schwanni raku omavahelises suhtlemises mängivad võtmerolli troofilised faktorid. Neurotrofiin BDNF on PNS-i arengu jooksul avaldunud nii närvirakus kui Schwanni rakus. Kahjuks on tänaseni üsna vähe veel teada *BDNF*-i geeniregulatsioonist. Selle üheks põhjuseks on ka *BDNF*-le omane kompleksne geenistruktuur ja tema aja- ja koespetsiifiline avaldumine, mis on reguleeritud keeruka alternatiivsete promootorite kompleksi poolt. Schwanni rakkude arengus on aktiivsed *BDNF*-i I, IV ja V promootor. Antud töös uurisime, kuidas on reguleeritud Schwanni rakkudes aktiivsed promootorid. EMSA meetodiga leidsime mitu reguleeritud piirkonda *BDNF*-i I ja V promootoris, mis olid kolmes eritüübilises Schwanni rakukultuuris erinevalt seotud geeni avaldumisega. Lähtuvalt meie andmetest võivad *BDNF*-i I promootori aktiivsust mõjutada transkriptsioonifaktorid Sp1 ja Myt1, mis omavad seondumiskohti *BDNF*-i I promootoris.

Esmakordselt näitasime *BDNF*-i ja tema retseptorite avaldumist roti istmikunärvis pre- ja postnataalses arengus *in vivo*. Roti istmikunärvis avaldub mRNA tasemel *BDNF*-i V promootorilt sünteesitud transkript. *BDNF* ja tema madala afiinusega retseptor *NGFR* omavad embrüonaalses roti istmikunärvis sarnast langevat avaldumismustrit. Täiskasvanud roti istmikunärvis on madalal tasemel ekspresseerunud *BDNF* ja tema retseptor *TrkB*. Lühendatud *TrkB-T1* isovormi avaldumine on roti istmikunärvi arengus muutumatu.

Kokkuvõttes on BDNF-il PNS-i arengus oluline rolli, olles erinevalt reguleeritud eritüübilistes Schwanni rakupopulatsioonides ning omades dünaamilist avaldumismustrit roti istmikunärvi arengus.

SUMMARY

The role of the neurotrophic factor BDNF in the development of the peripheral nervous system (PNS) has been investigated in this work. This trophic factor seems to play a critical role in the development and regeneration of the PNS. Trophic factors are important in the reciprocal signalling between neurons and glial cells. Schwann cells are glial cells of the PNS, which wrap around the axon making the myelin sheath. BDNF is expressed both in neurons and in Schwann cells during the development of the PNS. The regulation of the *BDNF* gene activity is poorly understood because of its complex gene structure. The rat *BDNF* gene consists of six 5'-nontranslated exons and one 3'-exon encoding the entire mature BDNF protein. Each of the 5'-exons has an alternative promoter which direct tissue-specific expression of the *BDNF* gene. During, Schwann cell development, *BDNF* promoters I, IV and V are activated.

We investigated how these promoters are regulated during Schwann cell differentiation. We found several regions upstream *BDNF* I and V exons, which act differently during the Schwann cell differentiation *in vitro*. Based on our results it is possible that transcription factors Sp1 and Myt1, which have binding sites in *BDNF* promoter I, could affect the transcription of the *BDNF* gene in Schwann cells.

We have also described the expression of *BDNF* and its receptors during the pre- and postnatal development of rat sciatic nerve. During the development of the rat sciatic nerve *BDNF* mRNA is transcribed from promoter V. *BDNF* and its low affinity receptor *NGFR* have similar diminishing expression patterns in the embryonic sciatic nerve. In adult rat sciatic nerves, *BDNF* and its receptor *TrkB* mRNA are expressed at low levels. Expression of TrkB-T1 isoform does not change in the peripheral nerve during development.

In summary the BDNF has a important role during the development of PNS. BDNF is differently regulated in Schwann cell development *in vitro* and with dynamic expression pattern over the period of development of the rat sciatic nerve.

TÄNUAVALDUSED

Seoses käesoleva töö valmimisega tahan tänada häid ja abivalmis inimesi enda ümber.

Kõige suuremad tänud võlgnen oma peamisele juhendajale Marko Piirsoole, kes õpetas mind töötama ja tekitas minus suure huvi antud teema vastu.

Tänan Professor Tõnis Timmuskit suurepärase võimaluse eest töötada tema neurogrupis.

Tänu Professor Jüri Kärnerile vastutulelikkuse ja hea suhtumise eest.

Tänan Madis Metsist õpetuste ja silmaavardamise eest bioinformaatikas.

Tänu fantastilistele laborikaaslastele ja ühtlasi headele sõpradele KBFI-s ja TTÜ-s, ekstratänu pinginaaber Priidule!

Tänu Epp Välile keelelise korrektuuri eest!

Tänan Juhan Tenissoni abi eest töö vormistamisel!

Perekonnale ja lähedastele, kes on mind toetanud ja julgustanud!

KASUTATUD KIRJANDUS

Acheson, A., Conover, J. C., Fandl, J. P., DeChiara, T. M., Russell, M., Thadani, A., Squinto, S. P., Yancopoulos, G. D., and Lindsay, R. M. (1995). A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death. *Nature* *374*, 450-453.

Airaksinen, M. S., Titievsky, A., and Saarma, M. (1999). GDNF family neurotrophic factor signaling: four masters, one servant? *Mol Cell Neurosci* *13*, 313-325.

Altar, C. A., Boylan, C. B., Jackson, C., Hershenson, S., Miller, J., Wiegand, S. J., Lindsay, R. M., and Hyman, C. (1992). Brain-derived neurotrophic factor augments rotational behavior and nigrostriatal dopamine turnover in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* *89*, 11347-11351.

Bamji, S. X., Majdan, M., Pozniak, C. D., Belliveau, D. J., Aloyz, R., Kohn, J., Causing, C. G., and Miller, F. D. (1998). The p75 neurotrophin receptor mediates neuronal apoptosis and is essential for naturally occurring sympathetic neuron death. *J Cell Biol* *140*, 911-923.

Barde, Y. A., Edgar, D., and Thoenen, H. (1982). Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *Embo J* *1*, 549-553.

Bennett, D. L., Michael, G. J., Ramachandran, N., Munson, J. B., Averill, S., Yan, Q., McMahon, S. B., and Priestley, J. V. (1998). A distinct subgroup of small DRG cells express GDNF receptor components and GDNF is protective for these neurons after nerve injury. *J Neurosci* *18*, 3059-3072.

Berkemeier, L. R., Winslow, J. W., Kaplan, D. R., Nikolics, K., Goeddel, D. V., and Rosenthal, A. (1991). Neurotrophin-5: a novel neurotrophic factor that activates trk and trkB. *Neuron* *7*, 857-866.

Blanchard, A. D., Sinanan, A., Parmantier, E., Zwart, R., Broos, L., Meijer, D., Meier, C., Jessen, K. R., and Mirsky, R. (1996). Oct-6 (SCIP/Tst-1) is expressed in Schwann cell precursors, embryonic Schwann cells, and postnatal myelinating Schwann cells: comparison with Oct-1, Krox-20, and Pax-3. *J Neurosci Res* *46*, 630-640.

Britsch, S., Li, L., Kirchhoff, S., Theuring, F., Brinkmann, V., Birchmeier, C., and Riethmacher, D. (1998). The ErbB2 and ErbB3 receptors and their ligand, neuregulin-1, are essential for development of the sympathetic nervous system. *Genes Dev* *12*, 1825-1836.

- Boyd, J. G., and Gordon, T. (2003). Glial cell line-derived neurotrophic factor and brain-derived neurotrophic factor sustain the axonal regeneration of chronically axotomized motoneurons in vivo. *Exp Neurol* 183, 610-619.
- Buj-Bello, A., Buchman, V. L., Horton, A., Rosenthal, A., and Davies, A. M. (1995). GDNF is an age-specific survival factor for sensory and autonomic neurons. *Neuron* 15, 821-828.
- Bunge, M. B., Wood, P. M., Tynan, L. B., Bates, M. L., and Sanes, J. R. (1989). Perineurium originates from fibroblasts: demonstration in vitro with a retroviral marker. *Science* 243, 229-231.
- Bunge, R. P. (1993). Expanding roles for the Schwann cell: ensheathment, myelination, trophism and regeneration. *Curr Opin Neurobiol* 3, 805-809.
- Bunge, R. P. (1994). The role of the Schwann cell in trophic support and regeneration. *J Neurol* 242, S19-21.
- Burden, S., and Yarden, Y. (1997). Neuregulins and their receptors: a versatile signaling module in organogenesis and oncogenesis. *Neuron* 18, 847-855.
- Castren, E., Pitkanen, M., Sirvio, J., Parsadanian, A., Lindholm, D., Thoenen, H., and Riekkinen, P. J. (1993). The induction of LTP increases BDNF and NGF mRNA but decreases NT-3 mRNA in the dentate gyrus. *Neuroreport* 4, 895-898.
- Chan, J. R., Cosgaya, J. M., Wu, Y. J., and Shooter, E. M. (2001). Neurotrophins are key mediators of the myelination program in the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 14661-14668.
- Chao, M., Casaccia-Bonnel, P., Carter, B., Chittka, A., Kong, H., and Yoon, S. O. (1998). Neurotrophin receptors: mediators of life and death. *Brain Res Brain Res Rev* 26, 295-301.
- Cohen, S., and Levi-Montalcini, R. (1957). Purification and properties of a nerve growth-promoting factor isolated from mouse sarcoma 180. *Cancer Res* 17, 15-20.
- Cosgaya, J. M., Chan, J. R., and Shooter, E. M. (2002). The neurotrophin receptor p75NTR as a positive modulator of myelination. *Science* 298, 1245-1248.
- Crowley, C., Spencer, S. D., Nishimura, M. C., Chen, K. S., Pitts-Meek, S., Armanini, M. P., Ling, L. H., MacMahon, S. B., Shelton, D. L., Levinson, A. D., and et al. (1994). Mice

lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop basal forebrain cholinergic neurons. *Cell* 76, 1001-1011.

Ernfors, P., Bengzon, J., Kokaia, Z., Persson, H., and Lindvall, O. (1991). Increased levels of messenger RNAs for neurotrophic factors in the brain during kindling epileptogenesis. *Neuron* 7, 165-176.

Ernfors, P., Ibanez, C. F., Ebendal, T., Olson, L., and Persson, H. (1990). Molecular cloning and neurotrophic activities of a protein with structural similarities to nerve growth factor: developmental and topographical expression in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 5454-5458.

Ernfors, P., Lee, K. F., Kucera, J., and Jaenisch, R. (1994). Lack of neurotrophin-3 leads to deficiencies in the peripheral nervous system and loss of limb proprioceptive afferents. *Cell* 77, 503-512.

Fahnestock, M., Garzon, D., Holsinger, R. M., and Michalski, B. (2002). Neurotrophic factors and Alzheimer's disease: are we focusing on the wrong molecule? *J Neural Transm Suppl*, 241-252.

Fannon, A. M., Sherman, D. L., Ilyina-Gragerova, G., Brophy, P. J., Friedrich, V. L., Jr., and Colman, D. R. (1995). Novel E-cadherin-mediated adhesion in peripheral nerve: Schwann cell architecture is stabilized by autotypic adherens junctions. *J Cell Biol* 129, 189-202.

Finkbeiner, S. (2000). Calcium regulation of the brain-derived neurotrophic factor gene. *Cell Mol Life Sci* 57, 394-401.

Funakoshi, H., Frisen, J., Barbany, G., Timmusk, T., Zachrisson, O., Verge, V. M., and Persson, H. (1993). Differential expression of mRNAs for neurotrophins and their receptors after axotomy of the sciatic nerve. *J Cell Biol* 123, 455-465.

Gage, F. H. (2002). Neurogenesis in the adult brain. *J Neurosci* 22, 612-613.

Garratt, A. N., Britsch, S., and Birchmeier, C. (2000). Neuregulin, a factor with many functions in the life of a schwann cell. *Bioessays* 22, 987-996.

Gibbs, R. B. (1999). Treatment with estrogen and progesterone affects relative levels of brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein in different regions of the adult rat brain. *Brain Res* 844, 20-27.

- Gotz, R., Raulf, F., and Schartl, M. (1992). Brain-derived neurotrophic factor is more highly conserved in structure and function than nerve growth factor during vertebrate evolution. *J Neurochem* 59, 432-442.
- Gould, E., and Tanapat, P. (1999). Stress and hippocampal neurogenesis. *Biol Psychiatry* 46, 1472-1479.
- Hall, J., Thomas, K. L., and Everitt, B. J. (2000). Rapid and selective induction of BDNF expression in the hippocampus during contextual learning. *Nat Neurosci* 3, 533-535.
- Hallbook, F., Ibanez, C. F., and Persson, H. (1991). Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in *Xenopus* ovary. *Neuron* 6, 845-858.
- Hammarberg, H., Piehl, F., Cullheim, S., Fjell, J., Hokfelt, T., and Fried, K. (1996). GDNF mRNA in Schwann cells and DRG satellite cells after chronic sciatic nerve injury. *Neuroreport* 7, 857-860.
- Hariri, A. R., Goldberg, T. E., Mattay, V. S., Kolachana, B. S., Callicott, J. H., Egan, M. F., and Weinberger, D. R. (2003). Brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism affects human memory-related hippocampal activity and predicts memory performance. *J Neurosci* 23, 6690-6694.
- Hayes, V. Y., Towner, M. D., and Isackson, P. J. (1997). Organization, sequence and functional analysis of a mouse BDNF promoter. *Brain Res Mol Brain Res* 45, 189-198.
- Heinrich, G. (2003). A novel BDNF gene promoter directs expression to skeletal muscle. *BMC Neurosci* 4, 11.
- Henderson, C. E., Phillips, H. S., Pollock, R. A., Davies, A. M., Lemeulle, C., Armanini, M., Simmons, L., Moffet, B., Vandlen, R. A., Simpson, L. C., and et al. (1994). GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle. *Science* 266, 1062-1064.
- Hohn, A., Leibrock, J., Bailey, K., and Barde, Y. A. (1990). Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature* 344, 339-341.
- Huang, E. J., and Reichardt, L. F. (2001). Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 24, 677-736.

- Ibanez, C. F. (1994). Structure-function relationships in the neurotrophin family. *J Neurobiol* 25, 1349-1361.
- Ibanez, C. F. (1998). Emerging themes in structural biology of neurotrophic factors. *Trends Neurosci* 21, 438-444.
- Ip, F. C., Fu, A. K., Tsim, K. W., and Ip, N. Y. (1996). Differential expression of ciliary neurotrophic factor receptor in skeletal muscle of chick and rat after nerve injury. *J Neurochem* 67, 1607-1612.
- Ip, N. Y., Ibanez, C. F., Nye, S. H., McClain, J., Jones, P. F., Gies, D. R., Belluscio, L., Le Beau, M. M., Espinosa, R., 3rd, Squinto, S. P., and et al. (1992). Mammalian neurotrophin-4: structure, chromosomal localization, tissue distribution, and receptor specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 3060-3064.
- Jessen, K. R., Brennan, A., Morgan, L., Mirsky, R., Kent, A., Hashimoto, Y., and Gavrilovic, J. (1994). The Schwann cell precursor and its fate: a study of cell death and differentiation during gliogenesis in rat embryonic nerves. *Neuron* 12, 509-527.
- Jessen, K. R., and Mirsky, R. (1991). Schwann cell precursors and their development. *Glia* 4, 185-194.
- Jessen, K. R., and Mirsky, R. (1994). Neural development. Fate diverted. *Curr Biol* 4, 824-827.
- Jessen, K. R., and Mirsky, R. (1999). Schwann cells and their precursors emerge as major regulators of nerve development. *Trends Neurosci* 22, 402-410.
- Joseph, N. M., Mukoyama, Y. S., Mosher, J. T., Jaegle, M., Crone, S. A., Dormand, E. L., Lee, K. F., Meijer, D., Anderson, D. J., and Morrison, S. J. (2004). Neural crest stem cells undergo multilineage differentiation in developing peripheral nerves to generate endoneurial fibroblasts in addition to Schwann cells. *Development* 131, 5599-5612.
- Kernie, S. G., Liebl, D. J., and Parada, L. F. (2000). BDNF regulates eating behavior and locomotor activity in mice. *Embo J* 19, 1290-1300.
- Kioussi, C., Gross, M. K., and Gruss, P. (1995). Pax3: a paired domain gene as a regulator in PNS myelination. *Neuron* 15, 553-562.
- Knecht, A. K., and Bronner-Fraser, M. (2002). Induction of the neural crest: a multigene process. *Nat Rev Genet* 3, 453-461.

- Kokaia, Z., Zhao, Q., Kokaia, M., Elmer, E., Metsis, M., Smith, M. L., Siesjo, B. K., and Lindvall, O. (1995). Regulation of brain-derived neurotrophic factor gene expression after transient middle cerebral artery occlusion with and without brain damage. *Exp Neurol* 136, 73-88.
- Korte, M., Carroll, P., Wolf, E., Brem, G., Thoenen, H., and Bonhoeffer, T. (1995). Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 8856-8860.
- Kuhlbrodt, K., Schmidt, C., Sock, E., Pingault, V., Bondurand, N., Goossens, M., and Wegner, M. (1998). Functional analysis of Sox10 mutations found in human Waardenburg-Hirschsprung patients. *J Biol Chem* 273, 23033-23038.
- Le Douarin, N. (1980). Migration and differentiation of neural crest cells. *Curr Top Dev Biol* 16, 31-85.
- Le Douarin, N. M., Creuzet, S., Couly, G., and Dupin, E. (2004). Neural crest cell plasticity and its limits. *Development* 131, 4637-4650.
- Levi-Montalcini, R. (1987). The nerve growth factor 35 years later. *Science* 237, 1154-1162.
- Levi-Montalcini, R. (2004). The nerve growth factor and the neuroscience chess board. *Prog Brain Res* 146, 525-527.
- Levi-Montalcini, R., Meyer, H., and Hamburger, V. (1954). In vitro experiments on the effects of mouse sarcomas 180 and 37 on the spinal and sympathetic ganglia of the chick embryo. *Cancer Res* 14, 49-57.
- Li, C., Tropak, M. B., Gerlai, R., Clapoff, S., Abramow-Newerly, W., Trapp, B., Peterson, A., and Roder, J. (1994). Myelination in the absence of myelin-associated glycoprotein. *Nature* 369, 747-750.
- Lindholm, D., Castren, E., Berzaghi, M., Blochl, A., and Thoenen, H. (1994). Activity-dependent and hormonal regulation of neurotrophin mRNA levels in the brain--implications for neuronal plasticity. *J Neurobiol* 25, 1362-1372.
- Linnarsson, S., Bjorklund, A., and Ernfors, P. (1997). Learning deficit in BDNF mutant mice. *Eur J Neurosci* 9, 2581-2587.

- Liu, Q. R., Walther, D., Drgon, T., Poleskaya, O., Lesnick, T. G., Strain, K. J., de Andrade, M., Bower, J. H., Maraganore, D. M., and Uhl, G. R. (2005). Human brain derived neurotrophic factor (BDNF) genes, splicing patterns, and assessments of associations with substance abuse and Parkinson's Disease. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* *134*, 93-103.
- Liu, X., Ernfors, P., Wu, H., and Jaenisch, R. (1995). Sensory but not motor neuron deficits in mice lacking NT4 and BDNF. *Nature* *375*, 238-241.
- Lyons, W. E., Mamounas, L. A., Ricaurte, G. A., Coppola, V., Reid, S. W., Bora, S. H., Wihler, C., Koliatsos, V. E., and Tessarollo, L. (1999). Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice develop aggressiveness and hyperphagia in conjunction with brain serotonergic abnormalities. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 15239-15244.
- Mainiero, F., Pepe, A., Yeon, M., Ren, Y., and Giancotti, F. G. (1996). The intracellular functions of alpha6beta4 integrin are regulated by EGF. *J Cell Biol* *134*, 241-253.
- Maisonpierre, P. C., Belluscio, L., Squinto, S., Ip, N. Y., Furth, M. E., Lindsay, R. M., and Yancopoulos, G. D. (1990). Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science* *247*, 1446-1451.
- Malberg, J. E., Eisch, A. J., Nestler, E. J., and Duman, R. S. (2000). Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci* *20*, 9104-9110.
- McAllister, A. K., Katz, L. C., and Lo, D. C. (1999). Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* *22*, 295-318.
- Meier, C., Parmantier, E., Brennan, A., Mirsky, R., and Jessen, K. R. (1999). Developing Schwann cells acquire the ability to survive without axons by establishing an autocrine circuit involving insulin-like growth factor, neurotrophin-3, and platelet-derived growth factor-BB. *J Neurosci* *19*, 3847-3859.
- Metsis, M., Timmusk, T., Arenas, E., and Persson, H. (1993). Differential usage of multiple brain-derived neurotrophic factor promoters in the rat brain following neuronal activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 8802-8806.
- Meyer, M., Matsuoka, I., Wetmore, C., Olson, L., and Thoenen, H. (1992). Enhanced synthesis of brain-derived neurotrophic factor in the lesioned peripheral nerve: different mechanisms are responsible for the regulation of BDNF and NGF mRNA. *J Cell Biol* *119*, 45-54.

- Mirsky, R., and Jessen, K. R. (1999). The neurobiology of Schwann cells. *Brain Pathol* 9, 293-311.
- Mogi, M., Togari, A., Kondo, T., Mizuno, Y., Komure, O., Kuno, S., Ichinose, H., and Nagatsu, T. (1999). Brain-derived growth factor and nerve growth factor concentrations are decreased in the substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 270, 45-48.
- Morgan, L., Jessen, K. R., and Mirsky, R. (1991). The effects of cAMP on differentiation of cultured Schwann cells: progression from an early phenotype (04+) to a myelin phenotype (P0+, GFAP-, N-CAM-, NGF-receptor-) depends on growth inhibition. *J Cell Biol* 112, 457-467.
- Neeper, S. A., Gomez-Pinilla, F., Choi, J., and Cotman, C. (1995). Exercise and brain neurotrophins. *Nature* 373, 109.
- Newman, J. P., Verity, A. N., Hawatmeh, S., Fee, W. E., Jr., and Terris, D. J. (1996). Ciliary neurotrophic factors enhances peripheral nerve regeneration. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 122, 399-403.
- Nickols, J. C., Valentine, W., Kanwal, S., and Carter, B. D. (2003). Activation of the transcription factor NF-kappaB in Schwann cells is required for peripheral myelin formation. *Nat Neurosci* 6, 161-167.
- Patapoutian, A., and Reichardt, L. F. (2001). Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr Opin Neurobiol* 11, 272-280.
- Pei, Y., He, X., and Xie, Z. (2004). Survival and differentiation of dopaminergic neurons can be regulated by soluble factors from cortex in vitro. *Neuroreport* 15, 1847-1850.
- Rabinovsky, E. D., Smith, G. M., Browder, D. P., Shine, H. D., and McManaman, J. L. (1992). Peripheral nerve injury down-regulates CNTF expression in adult rat sciatic nerves. *J Neurosci Res* 31, 188-192.
- Riethmacher, D., Sonnenberg-Riethmacher, E., Brinkmann, V., Yamaai, T., Lewin, G. R., and Birchmeier, C. (1997). Severe neuropathies in mice with targeted mutations in the ErbB3 receptor. *Nature* 389, 725-730.
- Rind, H. B., Butowt, R., and von Bartheld, C. S. (2005). Synaptic targeting of retrogradely transported trophic factors in motoneurons: comparison of glial cell line-derived neurotrophic factor, brain-derived neurotrophic factor, and cardiotrophin-1 with tetanus toxin. *J Neurosci* 25, 539-549.

- Roux, P. P., and Barker, P. A. (2002). Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog Neurobiol* *67*, 203-233.
- Ruberti, F., Capsoni, S., Comparini, A., Di Daniel, E., Franzot, J., Gonfloni, S., Rossi, G., Berardi, N., and Cattaneo, A. (2000). Phenotypic knockout of nerve growth factor in adult transgenic mice reveals severe deficits in basal forebrain cholinergic neurons, cell death in the spleen, and skeletal muscle dystrophy. *J Neurosci* *20*, 2589-2601.
- Saarma, M., and Sariola, H. (1999). Other neurotrophic factors: glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF). *Microsc Res Tech* *45*, 292-302.
- Saika, T., Senba, E., Noguchi, K., Sato, M., Yoshida, S., Kubo, T., Matsunaga, T., and Tohyama, M. (1991). Effects of nerve crush and transection on mRNA levels for nerve growth factor receptor in the rat facial motoneurons. *Brain Res Mol Brain Res* *9*, 157-160.
- Scherer, S. S., Deschenes, S. M., Xu, Y. T., Grinspan, J. B., Fischbeck, K. H., and Paul, D. L. (1995). Connexin32 is a myelin-related protein in the PNS and CNS. *J Neurosci* *15*, 8281-8294.
- Segal, R. A., and Greenberg, M. E. (1996). Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. *Annu Rev Neurosci* *19*, 463-489.
- Shapiro, L., Doyle, J. P., Hensley, P., Colman, D. R., and Hendrickson, W. A. (1996). Crystal structure of the extracellular domain from P0, the major structural protein of peripheral nerve myelin. *Neuron* *17*, 435-449.
- Shieh, P. B., Hu, S. C., Bobb, K., Timmusk, T., and Ghosh, A. (1998). Identification of a signaling pathway involved in calcium regulation of BDNF expression. *Neuron* *20*, 727-740.
- Sohrabji, F., Miranda, R. C., and Toran-Allerand, C. D. (1995). Identification of a putative estrogen response element in the gene encoding brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 11110-11114.
- Staugaitis, S. M., Colman, D. R., and Pedraza, L. (1996). Membrane adhesion and other functions for the myelin basic proteins. *Bioessays* *18*, 13-18.
- Suter, U., and Snipes, G. J. (1995). Peripheral myelin protein 22: facts and hypotheses. *J Neurosci Res* *40*, 145-151.

- Zhao, C., Veltri, K., Li, S., Bain, J. R., and Fahnstock, M. (2004). NGF, BDNF, NT-3, and GDNF mRNA expression in rat skeletal muscle following denervation and sensory protection. *J Neurotrauma* 21, 1468-1478.
- Zuccato, C., Ciammola, A., Rigamonti, D., Leavitt, B. R., Goffredo, D., Conti, L., MacDonald, M. E., Friedlander, R. M., Silani, V., Hayden, M. R., *et al.* (2001). Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science* 293, 493-498.
- Zuccato, C., Tartari, M., Crotti, A., Goffredo, D., Valenza, M., Conti, L., Cataudella, T., Leavitt, B. R., Hayden, M. R., Timmusk, T., *et al.* (2003). Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes. *Nat Genet* 35, 76-83.
- Tabuchi, A., Nakaoka, R., Amano, K., Yukimine, M., Andoh, T., Kuraishi, Y., and Tsuda, M. (2000). Differential activation of brain-derived neurotrophic factor gene promoters I and III by Ca²⁺ signals evoked via L-type voltage-dependent and N-methyl-D-aspartate receptor Ca²⁺ channels. *J Biol Chem* 275, 17269-17275.
- Tabuchi, A., Sakaya, H., Kisukeda, T., Fushiki, H., and Tsuda, M. (2002). Involvement of an upstream stimulatory factor as well as cAMP-responsive element-binding protein in the activation of brain-derived neurotrophic factor gene promoter I. *J Biol Chem* 277, 35920-35931.
- Tao, X., Finkbeiner, S., Arnold, D. B., Shaywitz, A. J., and Greenberg, M. E. (1998). Ca²⁺ influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron* 20, 709-726.
- Tao, X., West, A. E., Chen, W. G., Corfas, G., and Greenberg, M. E. (2002). A calcium-responsive transcription factor, CaRF, that regulates neuronal activity-dependent expression of BDNF. *Neuron* 33, 383-395.
- Tapia-Arancibia, L., Rage, F., Givalois, L., and Arancibia, S. (2004). Physiology of BDNF: focus on hypothalamic function. *Front Neuroendocrinol* 25, 77-107.
- Timmusk, T., Palm, K., Lendahl, U., and Metsis, M. (1999). Brain-derived neurotrophic factor expression in vivo is under the control of neuron-restrictive silencer element. *J Biol Chem* 274, 1078-1084.

- Timmusk, T., Palm, K., Metsis, M., Reintam, T., Paalme, V., Saarma, M., and Persson, H. (1993). Multiple promoters direct tissue-specific expression of the rat BDNF gene. *Neuron* *10*, 475-489.
- Tona, A., Perides, G., Rahemtulla, F., and Dahl, D. (1993). Extracellular matrix in regenerating rat sciatic nerve: a comparative study on the localization of laminin, hyaluronic acid, and chondroitin sulfate proteoglycans, including versican. *J Histochem Cytochem* *41*, 593-599.
- Topilko, P., Levi, G., Merlo, G., Mantero, S., Desmarquet, C., Mancardi, G., and Charnay, P. (1997). Differential regulation of the zinc finger genes Krox-20 and Krox-24 (Egr-1) suggests antagonistic roles in Schwann cells. *J Neurosci Res* *50*, 702-712.
- Topilko, P., Schneider-Maunoury, S., Levi, G., Baron-Van Evercooren, A., Chennoufi, A. B., Seitanidou, T., Babinet, C., and Charnay, P. (1994). Krox-20 controls myelination in the peripheral nervous system. *Nature* *371*, 796-799.
- Woldeyesus, M. T., Britsch, S., Riethmacher, D., Xu, L., Sonnenberg-Riethmacher, E., Abou-Rebyeh, F., Harvey, R., Caroni, P., and Birchmeier, C. (1999). Peripheral nervous system defects in erbB2 mutants following genetic rescue of heart development. *Genes Dev* *13*, 2538-2548.
- Bentley, C. A., and Lee, K. F. (2000). p75 is important for axon growth and schwann cell migration during development. *J Neurosci* *20*, 7706-7715.
- Biffo, S., Offenhauser, N., Carter, B. D., and Barde, Y. A. (1995). Selective binding and internalisation by truncated receptors restrict the availability of BDNF during development. *Development* *121*, 2461-2470.
- Boyd, J. G., and Gordon, T. (2001). The neurotrophin receptors, trkB and p75, differentially regulate motor axonal regeneration. *J Neurobiol* *49*, 314-325.
- Cabelli, R. J., Allendoerfer, K. L., Radeke, M. J., Welcher, A. A., Feinstein, S. C., and Shatz, C. J. (1996). Changing patterns of expression and subcellular localization of TrkB in the developing visual system. *J Neurosci* *16*, 7965-7980.
- Castren, E., Pitkanen, M., Sirvio, J., Parsadanian, A., Lindholm, D., Thoenen, H., and Riekkinen, P. J. (1993). The induction of LTP increases BDNF and NGF mRNA but decreases NT-3 mRNA in the dentate gyrus. *Neuroreport* *4*, 895-898.

- Chao, M., Casaccia-Bonnel, P., Carter, B., Chittka, A., Kong, H., and Yoon, S. O. (1998). Neurotrophin receptors: mediators of life and death. *Brain Res Brain Res Rev* 26, 295-301.
- DeFreitas, M. F., McQuillen, P. S., and Shatz, C. J. (2001). A novel p75NTR signaling pathway promotes survival, not death, of immunopurified neocortical subplate neurons. *J Neurosci* 21, 5121-5129.
- Eide, F. F., Vining, E. R., Eide, B. L., Zang, K., Wang, X. Y., and Reichardt, L. F. (1996). Naturally occurring truncated trkB receptors have dominant inhibitory effects on brain-derived neurotrophic factor signaling. *J Neurosci* 16, 3123-3129.
- Hall, J., Thomas, K. L., and Everitt, B. J. (2000). Rapid and selective induction of BDNF expression in the hippocampus during contextual learning. *Nat Neurosci* 3, 533-535.
- Huang, E. J., and Reichardt, L. F. (2001). Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 24, 677-736.
- Klein, R., Conway, D., Parada, L. F., and Barbacid, M. (1990). The trkB tyrosine protein kinase gene codes for a second neurogenic receptor that lacks the catalytic kinase domain. *Cell* 61, 647-656.
- Klein, R., Nanduri, V., Jing, S. A., Lamballe, F., Tapley, P., Bryant, S., Cordon-Cardo, C., Jones, K. R., Reichardt, L. F., and Barbacid, M. (1991). The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell* 66, 395-403.
- Klein, R., Parada, L. F., Coulier, F., and Barbacid, M. (1989). trkB, a novel tyrosine protein kinase receptor expressed during mouse neural development. *Embo J* 8, 3701-3709.
- Korte, M., Carroll, P., Wolf, E., Brem, G., Thoenen, H., and Bonhoeffer, T. (1995). Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 8856-8860.
- Li, Y. X., Xu, Y., Ju, D., Lester, H. A., Davidson, N., and Schuman, E. M. (1998). Expression of a dominant negative TrkB receptor, T1, reveals a requirement for presynaptic signaling in BDNF-induced synaptic potentiation in cultured hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 10884-10889.
- Lindholm, D., Castren, E., Berzaghi, M., Blochl, A., and Thoenen, H. (1994). Activity-dependent and hormonal regulation of neurotrophin mRNA levels in the brain--implications for neuronal plasticity. *J Neurobiol* 25, 1362-1372.

- Malberg, J. E., Eisch, A. J., Nestler, E. J., and Duman, R. S. (2000). Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci* *20*, 9104-9110.
- Mazella, J. (2001). Sortilin/neurotensin receptor-3: a new tool to investigate neurotensin signaling and cellular trafficking? *Cell Signal* *13*, 1-6.
- McAllister, A. K. (1999). Subplate neurons: a missing link among neurotrophins, activity, and ocular dominance plasticity? *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 13600-13602.
- Metsis, M., Timmusk, T., Arenas, E., and Persson, H. (1993). Differential usage of multiple brain-derived neurotrophic factor promoters in the rat brain following neuronal activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 8802-8806.
- Middlemas, D. S., Lindberg, R. A., and Hunter, T. (1991). trkB, a neural receptor protein-tyrosine kinase: evidence for a full-length and two truncated receptors. *Mol Cell Biol* *11*, 143-153.
- Neeper, S. A., Gomez-Pinilla, F., Choi, J., and Cotman, C. (1995). Exercise and brain neurotrophins. *Nature* *373*, 109.
- Offenhauser, N., Muzio, V., and Biffo, S. (2002). BDNF binding to truncated trkB.T1 does not affect gene expression. *Neuroreport* *13*, 1189-1193.
- Roux, P. P., and Barker, P. A. (2002). Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog Neurobiol* *67*, 203-233.
- Soppet, D., Escandon, E., Maragos, J., Middlemas, D. S., Reid, S. W., Blair, J., Burton, L. E., Stanton, B. R., Kaplan, D. R., Hunter, T., and et al. (1991). The neurotrophic factors brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 are ligands for the trkB tyrosine kinase receptor. *Cell* *65*, 895-903.
- Stoilov, P., Castren, E., and Stamm, S. (2002). Analysis of the human TrkB gene genomic organization reveals novel TrkB isoforms, unusual gene length, and splicing mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* *290*, 1054-1065.
- Tapia-Arancibia, L., Rage, F., Givalois, L., and Arancibia, S. (2004). Physiology of BDNF: focus on hypothalamic function. *Front Neuroendocrinol* *25*, 77-107.
- Troy, C. M., Friedman, J. E., and Friedman, W. J. (2002). Mechanisms of p75-mediated death of hippocampal neurons. Role of caspases. *J Biol Chem* *277*, 34295-34302.

- Wang, X., Shao, Z., Zetoune, F. S., Zeidler, M. G., Gowrishankar, K., and Vincenz, C. (2003). NRADD, a novel membrane protein with a death domain involved in mediating apoptosis in response to ER stress. *Cell Death Differ* *10*, 580-591.
- Wong, S. T., Henley, J. R., Kanning, K. C., Huang, K. H., Bothwell, M., and Poo, M. M. (2002). A p75(NTR) and Nogo receptor complex mediates repulsive signaling by myelin-associated glycoprotein. *Nat Neurosci* *5*, 1302-1308.
- Yamashita, T., Higuchi, H., and Tohyama, M. (2002). The p75 receptor transduces the signal from myelin-associated glycoprotein to Rho. *J Cell Biol* *157*, 565-570.
- Chan, J. R., Cosgaya, J. M., Wu, Y. J., and Shooter, E. M. (2001). Neurotrophins are key mediators of the myelination program in the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 14661-14668.
- Cobrinik, D. (2005). Pocket proteins and cell cycle control. *Oncogene* *24*, 2796-2809.
- Gotz, R., Raulf, F., and Scharl, M. (1992). Brain-derived neurotrophic factor is more highly conserved in structure and function than nerve growth factor during vertebrate evolution. *J Neurochem* *59*, 432-442.
- Hayes, V. Y., Towner, M. D., and Isackson, P. J. (1997). Organization, sequence and functional analysis of a mouse BDNF promoter. *Brain Res Mol Brain Res* *45*, 189-198.
- Heinrich, G. (2003). A novel BDNF gene promoter directs expression to skeletal muscle. *BMC Neurosci* *4*, 11.
- Le Hir, H., Charlet-Berguerand, N., Gimenez-Roqueplo, A., Mannelli, M., Plouin, P., de Franciscis, V., and Thernes, C. (2000). Relative expression of the RET9 and RET51 isoforms in human pheochromocytomas. *Oncology* *58*, 311-318.
- Scherer, S. S., Wang, D. Y., Kuhn, R., Lemke, G., Wrabetz, L., and Kamholz, J. (1994). Axons regulate Schwann cell expression of the POU transcription factor SCIP. *J Neurosci* *14*, 1930-1942.
- Springer, J. E., Mu, X., Bergmann, L. W., and Trojanowski, J. Q. (1994). Expression of GDNF mRNA in rat and human nervous tissue. *Exp Neurol* *127*, 167-170.
- Timmusk, T., Palm, K., Metsis, M., Reintam, T., Paalme, V., Saarma, M., and Persson, H. (1993). Multiple promoters direct tissue-specific expression of the rat BDNF gene. *Neuron* *10*, 475-489.

Tsui-Pierchala, B. A., Ahrens, R. C., Crowder, R. J., Milbrandt, J., and Johnson, E. M., Jr. (2002). The long and short isoforms of Ret function as independent signaling complexes. *J Biol Chem* 277, 34618-34625.

Toyomoto, M., Inoue, S., Ohta, K., Kuno, S., Ohta, M., Hayashi, K., and Ikeda, K. (2005). Production of NGF, BDNF and GDNF in mouse astrocyte cultures is strongly enhanced by a cerebral vasodilator, ifenprodil. *Neurosci Lett* 379, 185-189.

Wang, Z., Wang, D. Z., Hockemeyer, D., McAnally, J., Nordheim, A., and Olson, E. N. (2004). Myocardin and ternary complex factors compete for SRF to control smooth muscle gene expression. *Nature* 428, 185-189.