

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

**Transkriptsioonifaktori TCF4 lateraliseeritus hiire ja inimese ajus**

Magistritöö

30 EAP

Carolin Kuuskmäe

Juhendajad PhD Mari-Anne Philips

PhD Kersti Lilleväli

PhD Tambet Tõnissoo

TARTU 2022

# INFOLEHT

## Transkriptsioonifaktori TCF4 lateraliseeritus hiire ja inimese ajus

*TCF4* (inimesel)/ *Tcf4* (hiirel) on eluks vajalik geen (Zhuang *et al.*, 1996), mis kodeerib põhiheeliks-silmus-heeliks domeeniga transkriptsioonifaktorit TCF4 (Sepp *et al.*, 2011). TCF4 osaleb erinevates arengulistest protsessides, rakutsükli regulatsioonis ja keskkonna signaalidele reageerimises (Jones, 2004; Massari & Murre, 2000; Skinner *et al.*, 2010). Varasemalt on näidatud, et *Tcf4*<sup>+/-</sup> hiirtel esineb parema esikäpa nõrkus (Kennedy *et al.*, 2016; Welniarz *et al.*, 2015). Samuti on leitud *Tcf4*<sup>+/-</sup> hiirte vasakus hipokampuses rohkem düsreguleeritud ekspressiooniga gene kui paremas hipokampuses (Gogliettino, 2017). See viitab, et TCF4 võib omada spetsiifilist rolli vasakus ajupoolkeras. Antud uurimistöö raames analüüsiti *TCF4/Tcf4* geeni ja TCF4 valgu ekspressiooni erinevusi parema ja vasaku ajupoolkera vahel.

Märksõnad: TCF4, lateraliseeritus, ajupoolkerad, hiir, inimene

CERCS kood: B790 Kliiniline geneetika

## The lateralisation of transcription factor TCF4 in mouse and human brain

*TCF4* (human)/ *Tcf4* (mouse) is a vital gene (Zhuang *et al.*, 1996) that codes a transcription factor with the basic helix-loop-helix domain TCF4 (Sepp *et al.*, 2011). TCF4 participates in different developmental processes, regulation of the cell cycle and reacting to environmental signals (Jones, 2004; Massari & Murre, 2000; Skinner *et al.*, 2010). *Tcf4*<sup>+/-</sup> mice have previously been shown to have weakness in the right forepaw (Kennedy *et al.*, 2016; Welniarz *et al.*, 2015). Also more genes with dysregulated expression have been found in the left hippocampus of *Tcf4*<sup>+/-</sup> mice than in the right hippocampus (Gogliettino, 2017). This indicates that TCF4 may have a specific role in the left brain hemisphere. The differences in *TCF4/Tcf4* gene and TCF4 protein expression between the right and left hemispheres were analysed in this study.

Keywords: TCF4, lateralisation, brain hemispheres, mouse, human

CERCS code: B790 Clinical genetics

# SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID .....	5
SISSEJUHATUS .....	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	8
1.1 Suurajukoore ehitus ja funktsioon imetajatel.....	8
1.2 Aju lateraliseeritus .....	10
1.3 <i>TCF4</i> geen ja selle ekspressioon.....	12
1.4 Transkriptsioonifaktor 4 valgu üldisloomustus.....	14
1.5 <i>TCF4</i> geeni funktsionaalne lateraliseeritus ajupoolkerades .....	15
2. EKSPERIMENTAALOSA .....	17
2.1 Töö eesmärgid.....	17
2.2 Materjalid ja meetodika .....	17
2.2.1 Eksperimendis osalenud hiired ja inimesed .....	17
2.2.2 Kasutatud praimerite disain ja põhjendus .....	18
2.2.3 <i>Tcf4</i> ekspressiooni analüüs hiire ajus qPCR-iga .....	21
2.2.3.1 RNA eraldamine .....	21
2.2.3.2 cDNA süntees .....	23
2.2.3.3 qPCR.....	23
2.2.3.4 qPCR tulemuste analüüs .....	25
2.2.4 <i>TCF4</i> geeni ekspressiooni analüüs inimese ajus qPCR-iga .....	25
2.2.5 Hiirte ajalõikude immunohistokeemiline analüüs.....	26
2.2.6 Mikroskoopimine ja pildistamine.....	27
2.3 Tulemused.....	28
2.3.1 <i>Tcf4</i> ekspressiooni analüüsi tulemused hiirel.....	28
2.3.2 <i>TCF4</i> ekspressiooni analüüsi tulemused inimesel .....	37
2.3.3 Hiire immunohistokeemilise analüüsi tulemused .....	46
ARUTELU.....	49
KOKKUVÕTE .....	53
RESÜMEE.....	54

TÄNUSÕNAD .....	56
KASUTATUD KIRJANDUS.....	57
LIHTLITSENTS.....	72

## KASUTATUD LÜHENDID

*ActB* – beeta aktiin hiire geen

*ACTB* – beeta aktiin inimese geen

*ARRB2* – arrestiin beeta 2 geen

bHLH – põhiheeliks-silmus-heeliks valk (ingl. *basic helix-loop-helix protein*)

bHLHb19 – klaad „b“ põhiheeliks-silmus-heeliks valk (ingl. *clade „b“ Basic helix-loop-helix protein 19*)

BSA – veise seerumi albumiin (ingl. *bovine serum albumin*)

CA – ammoni sarv (lad. *Cornu ammonis*)

Ct – lävetsükkel (ingl. *threshold cycle*), tuntud ka kui Cq (ingl. *quantification cycle*)

CTGF – sidekoe kasvufaktor

dNTP – deoksünukleotiid

DTT – ditiotreitol

*E2-2* – *E-box protein E2-2 gene* (alternatiivne nimi *TCF4* geenile)

*FEZ1* – fastikulatsiooni ja pikenemise valk zeta-1 geen

*FGF1* – fibroplasti kasvufaktor 1 geen

*GAP43* – kasvuga seotud valk 43 geen

*Gapdh* – glütseraalaldehüüd-3-fosfaat dehüdrogenaas hiire geen

*GAPDH* – glütseraalaldehüüd-3-fosfaat dehüdrogenaas inimese geen

GM – hallollus (ingl. *grey matter*)

GWAS – ülegenoomne assotsiatsiooniuuring (ingl. *genome wide association study*)

*Hprt* – hüpoksantiin guaniin fosforibosüültransferaas hiire geen

*HPRT* – hüpoksantiin guaniin fosforibosüültransferaas inimese geen

*ITF2* – immunoglobuliini transkriptsioonifaktor 2 geen (alternatiivne nimi *TCF4* geenile)

NGS – normaalse kodukitse seerum (ingl. *normal goat serum*)

PBS – fosfaatpuhverdatud soolalahus (ingl. *phosphate buffered saline*)

RFU – suhtelised fluorestsentsühikud (ingl. *relative fluorescence units*)

Rn – normaliseeritud reporter

rpm – pööret minutis (ingl. *revolutions per minute*)

*SEF2* – põhiheeliks-silmus-heeliks transkriptsioonifaktori geen (alternatiivne nimi *TCF4* geenile)

SEM – standardviga keskmisest

SNP – üksiku nukleotiidi polümorfism (ingl. *single-nucleotide polymorphism*)

*SSTR2* – somatostatiini retseptor 2 geen  
*TBP* – *TATA-boxi* siduva valgu inimese geen  
*Tcf4* – transkriptsioonifaktor 4 hiire geen  
*TCF4* – transkriptsioonifaktor 4 inimese geen  
TCF4 – transkriptsioonifaktor 4 valk  
*TH* – türosiini hüdroksülaasi geen  
WM – valgeollus (ingl. *white matter*)  
wt – metsiktüüp (ingl. *wild type*)

## SISSEJUHATUS

Aju on hea näide organite vasak-parem asümmeetriast ehk lateraliseeritusest. Aju lateraalsus tähendab, et parem ja vasak ajupoolkera on erinevad struktuurselt ja neil esineb kalduvus vastutada erinevate ülesannete eest (Amunts, 2010, *Chang et al.*, 2015). Teada on, et kõrvalekalded tüüpilisest asümmeetriast võivad viia erinevate kognitiivsete häireteni nagu näiteks autism ja skisofreenia (Floris *et al.*, 2016; Kienast *et al.*, 2021; Ribolsi *et al.*, 2014; Shaw *et al.*, 2009). Selline ajupoolkerade funktsionaalne asümmeetria eeldab lateraliseeritust juba molekulaarsel tasandil, kuid hetkel ei ole selle kohta imetajate puhul väga palju teada.

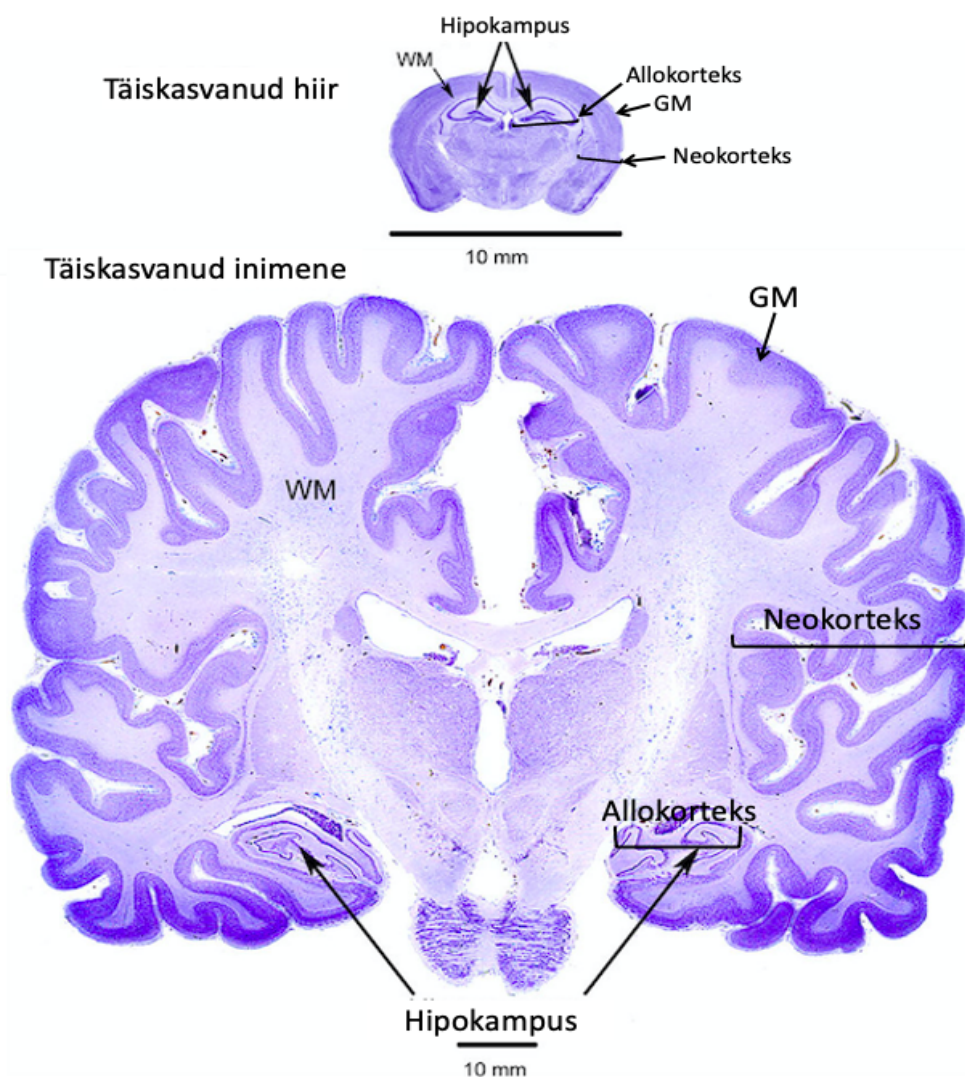
Käesolevas uurimistöös uuriti transkriptsioonifaktor TCF4 lateraliseeritust hiire ja inimese ajus. TCF4 osaleb erinevates arengulistest protsessides, rakutsükli regulatsioonis ja keskkonna signaalidele reageerimises (Jones, 2004; Massari & Murre, 2000; Skinner *et al.*, 2010). See on kodeeritud *TCF4* (inimesel)/ *Tcf4* (hiirel) poolt, mis on organismi arenguks ülioluline geen (Zhuang *et al.*, 1996). Varasemalt on näidatud, et *Tcf4*<sup>+/-</sup> hiirtel esineb parema esikäpa nõrkus (Kennedy *et al.*, 2016; Welniarz *et al.*, 2015). Samuti on leitud *Tcf4*<sup>+/-</sup> hiirte vasakus hipokampuses rohkem düsreguleeritud ekspressiooniga gene kui paremas hipokampuses (Gogliettino, 2017). See viitab, et TCF4 võib omada spetsiifilist rolli vasakus ajupoolkeras, mistõttu püstitati eesmärk analüüsida *TCF4*/*Tcf4* geeni ekspressiooni võrdlevalt vasakus ja paremas ajupoolkeras.

Transkriptsioonifaktor TCF4-1 on potentsiaal omada suurt hulka ülesandeid, kuna see omab 10 604 seondumiskohta 5437 geeni läheduses. On ka viited sellele, et TCF4 võiks olla kuidagi seotud *LEFTY1* geeniga (Meno *et al.*, 1997; Kennedy *et al.*, 2016), mis on teadaolevalt väga lateraliseerunud geen (Kennedy *et al.*, 2016). Seetõttu sai püstitatud teine eesmärk, milleks oli uurida TCF4 lokaliseeritud lateralisatsiooni hiire ajus.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

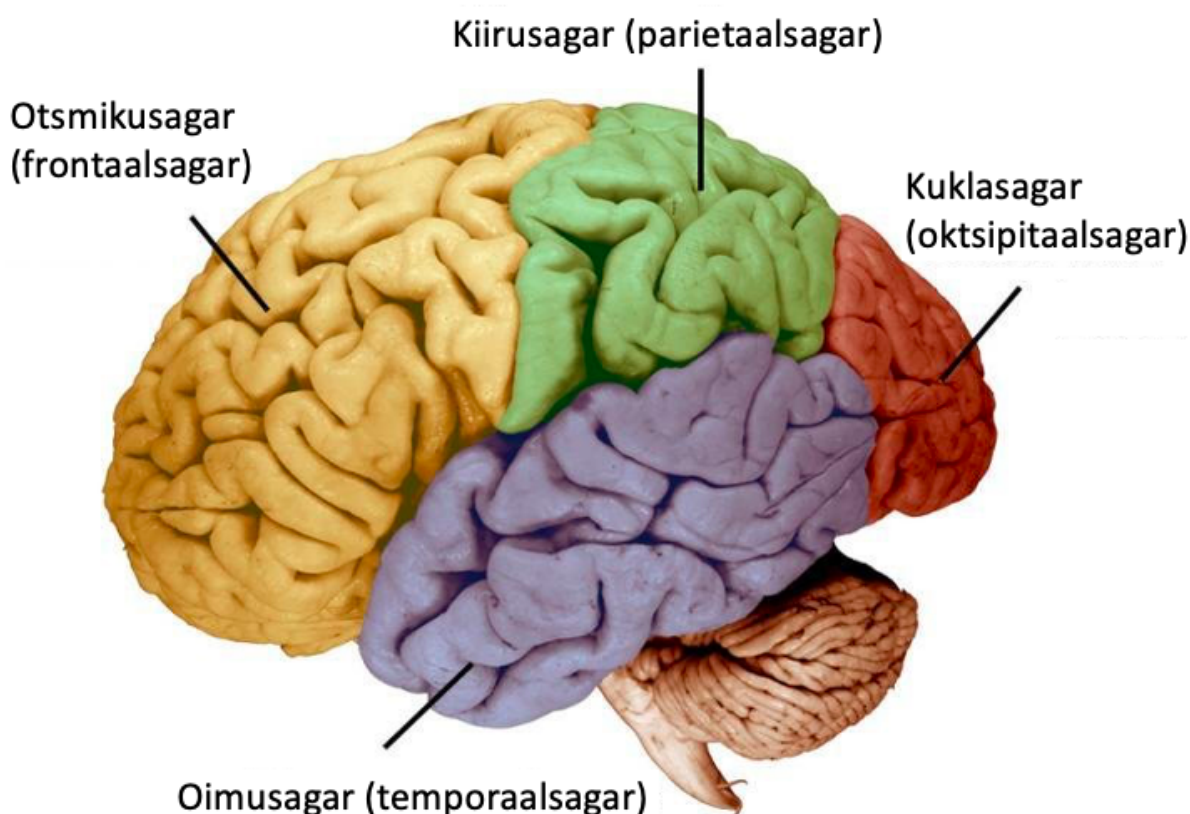
## 1.1 Suurajukoore ehitus ja funktsioon imetajatel

Suurajukoore jaguneb kõigil imetajatel paremaks ja vasakuks poolkeraks, mille vaheline infotöötlus käib kahte poolkera ühendava mõhnkeha (ingl. *corpus callosum*) kaudu (Wahl *et al.*, 2007). Suurema osa suurajukoorest (90%) moodustab neokorteks, mis on kuuest kihist koosnev väljapoole jääv osa suurajukoorest (Cadwell *et al.*, 2019; Strominger *et al.*, 2012) (Joonis 1). Ülejäänud osa (10%) kutsutakse allokorteksiks (Cadwell *et al.*, 2019; Strominger *et al.*, 2012). See paikneb suurajukoore sissepoole jäävas osas, koosneb kolmest kuni neljast kihist ja sinna alla kuulub osaliselt ka limbiline süsteem (Cadwell *et al.*, 2019; Strominger *et al.*, 2012) (Joonis 1).



**Joonis 1. Hiire ja inimese peaju võrdlus.** Kujutatud on täiskasvanud hiire (lad. *Mus musculus*) ja inimese aju ning nende suuremad ühised piirkonnad. Kuigi suuruselt on ajud erinevad, on nad ülesehituselt sarnased. WM – valgeollus (ingl. *white matter*). GM – hallollus (ingl. *grey matter*). (Modifitseeritud Schwerin *et al.*, 2017 järgi.)

Nii hiirel kui ka inimesel saab suurajukoore neokorteksi jagada neljaks suureks osaks: otsmikusagar (frontaalsagar), kiirusagar (parietaalsagar), oimusagar (temporaalsagar) ja kuklasagar (okspitaalsagar) (Joonis 2). Otsmikusagar paikneb aju eesotsas ja vastutab peamiselt mootorsete reaktsioonide ja liigutuste vahendamise eest (Chayer & Freedman, 2001; Kolb & Milner, 1981; Leonard *et al.*, 1988; Sreenivasan *et al.*, 2016). See on muuhulgas oluline ka käitumise planeerimisel (Carlin *et al.*, 2000), tähelepanuga seotud protsessides (Rueckert & Grafman, 1996) ning töömälu hoidmises (Chayer & Freedman, 2001; D'Esposito, 2000). Kiirusagar paikneb kiiruloo all ja omab olulist rolli ümbritseva keskkonna tajumisel ja selles orienteerumisel (Gitton *et al.*, 1999; Mańkowska *et al.*, 2018; Wolpert *et al.*, 1998). Oimusagar paikneb kiirusagara all ja on vastutav kuulmise (Jerger *et al.*, 1972) ning mälu eest (Gabrieli *et al.*, 1997; Hammond *et al.*, 2004). Kuklasagar paikneb suuraju tagaosas ja tegeleb peamiselt nägemisega (Williamson *et al.*, 1992).



**Joonis 2. Inimese suurajukoore neokorteksi osade paiknemine.** Kujutatud on otsmikusagar (frontaalsagar), kiirusagar (parietaalsagar), oimusagar (temporaalsagar) ja kuklasagar (okspitaalsagar). (Modifitseeritud Tierney & Simms, 2018 järgi).

Veel üks oluline osa inimese ja hiire ajus, millest ka edaspidi antud uurimistöös räägitakse, on allokorteksi alla kuuluv hipokampus (Joonis 1). See asub oimusagara sees, kuulub aju limbilisse

süsteemi ja on vastutav uute mälestuste loomise, ruumiinfo töötamise ja navigeerimise eest (Cohen *et al.*, 2013; Jarrard, 1995; Olton *et al.*, 1979).

## 1.2 Aju lateraliseeritus

Aju on hea näide organite vasak-parem asümmeetriast ehk lateraliseeritusest. Aju lateraalsus tähendab, et parem ja vasak ajupoolkera on erinevad struktuurselt (näiteks asuvad Wernicke ja Broca alad enamasti vasakul ajupoolkeral) ja neil esineb kalduvus vastutada erinevate ülesannete eest (Amunts, 2010, Chang *et al.*, 2015). Näiteks on rohkem kui 85%-l inimestest vasak ajupoolkera vastutav rääkimise ja jutust arusaamine eest (Mazoyer *et al.*, 2014; Ocklenburg *et al.*, 2016b) ning umbes 90% inimestest on paremakäelised (Peters *et al.*, 2006).

Lateraliseerumine algab juba looteas ja on põhjustatud Nodali raja esilekutsutud molekulaarse asümmetria poolt (Nonaka *et al.*, 1998; Tabin, 2005). Samas, kuna kõigi imetajate ajud ei ole täpselt ühtmoodi lateraliseeritud (näiteks 10% inimestes on vasakukäelised), siis tõenäoliselt omavad ka muud faktorid rolli lateraliseeritud aju arengus, mida veel ei teata (Güntürkün & Ocklenburg, 2017; Tabin, 2005). Mitmed autorid on näidanud, et lateraalsus on oluline aju arengus. Teada on, et kõrvalekalded tüüpilisest asümmeetriast võivad viia erinevate kognitiivsete häireteni nagu näiteks autism ja skisofreenia (Floris *et al.*, 2016; Kienast *et al.*, 2021; Ribolsi *et al.*, 2014; Shaw *et al.*, 2009).

Selline ajupoolkerade funktsionaalne asümmeetria eeldab lateraliseeritust juba molekulaarsel tasandil, kuid hetkel ei ole selle kohta imetajatel (sh ka inimeste puhul) väga palju teada. Suuremas osas teadustöodes, mis on tehtud aju lateraliseeritusest molekulaarsel tasemel, on kasutatud mudelorganismina teisi selgroogseid mudeleid nagu sebrakala (lad. *Danio rerio*) (Horstick *et al.*, 2020; Kienast *et al.*, 2021) või erinevaid linde nagu kanad (lad. *Gallus domesticus*) ja tuvid (lad. *Columba livia*) (Güntürkün & Ocklenburg, 2017).

Liigist olenemata on näidatud, et aju lateraliseeritus molekulaarsel tasemel võib olla avaldunud mitut erinevat moodi. Selleks võib olla nii erinev geeniekspressioon (Chae *et al.*, 2021; Crespi *et al.*, 2018; Ocklenburg *et al.*, 2016a) kui ka erinevad epigeneetilised mehhanismid peaaegu paremal ja vasakul poolel (Schmitz *et al.*, 2018a; b), mis võimaldavad aju erinevate funktsioonide avaldumise või siis probleemide korral mitte avaldumise.

Geeniekspressiooni erinevused parema ja vasaku ajupoolkera vahel on täheldatavad inimesel juba looteas (Sun *et al.*, 2005). Kuna inimeste puhul on eetilistel kaalutlustel keeruline hinnata, kas ühe konkreetse geeni ekspressioon on just tingimata vastutav mingi kindla käitumismustri eest, siis on kasutusele võetud erinevad loomudelid. Näiteks on tuvastatud, et geenide *Arrb2*, *Gap43* ja *Fez1* ekspressioon on täiskasvanud hiire ajus lateraliseeritud ehk need on vasakul ajupoolkeras rohkem ekspresseerunud kui paremas (Grabrucker *et al.*, 2018). *Arrb2* kodeerib valku arrestiin beeta 2, *Gap43* kodeerib kasvuga seotud valku 43 ja *Fez1* kodeerib fastsikulatsiooni ja elongatsiooni valku zeta 1 (Grabrucker *et al.*, 2018). Eksperimentides T-labürindi (ingl. *T-maze*) käitumiskatsetega, on näidatud, et lateraliseeritud geeniekspressioon hiire ajus on seotud nende lateraliseeritud käitumisega. T-labürint on nimelt T-tähe kujuline labürint, kus hiir pannakse T-tähe n-ö alumisse otsa ja siis ta saab valida, kas minna paremale või vasakule. Antud katses eelistasid kontrollhiired (*Arrb2*, *Gap43* ja *Fez1* vasakpoolselt lateraliseerunud) keerata paremale poole. Hiired, kellel ei olnud vastavate geenide ekspressioon ajus lateraliseerunud sünnieelse tsingipuuduse tõttu, ei eelistanud ühte poolt teisele (Grabrucker *et al.*, 2018). Varasemalt on näidatud, et metsiktüüpi (ingl. *wild type*) rotid eelistavad paremat poolt vasakule (Andrade *et al.*, 2001), seega mitte poole eelistamine on seotud ebatavalise ajukeemiaga. Samuti pakuvad sünnieelse tsingipuudusega hiiri uurinud teadlased välja, et ebatüüpiline poolte valimine võib viidata ebatavalisele juttkeha lateraliseeritusele, mida inimeste puhul peetakse üheks autismispektri häire näitajaks (Grabrucker *et al.*, 2018, Hollander *et al.*, 2005).

Mitmete teadustööde puhul, mis uurivad aju vasak-parem asümmeetriat geeni ekspressiooni tasemel, ei ole siiski suudetud leida lateraalsust individuaalse geeni tasandil (Lambert *et al.*, 2011; Muntané *et al.*, 2017). See võib tähendada, et geeniekspressiooni asümmeetria on arengust sõltuv ja tuvastatav ainult kindlates arengustaadiumites või siis on see erinevus detekteerimiseks liiga väike (Schmitz *et al.*, 2019). Sellest lähtuvalt on keskendutud funktsionaalsetele geenirühmadele (näiteks keele ja käelisusega seotud geenid), mis tooksid asümmeetrilise ekspressioonimustri ajus paremini esile (Karlebach & Francks, 2015; Muntané *et al.*, 2017; Ocklenburg *et al.*, 2017). On ilmekaid tõendeid, et isegi kui ükski geen ajus iseseisvalt ei ole asümmeetriline, siis funktsionaalse geenirühma tasandil võib erinevus välja tulla (Karlebach & Francks, 2015; Muntané *et al.*, 2017; Ocklenburg *et al.*, 2017).

Nagu eelnevalt mainitud, võivad aju lateraalsust mõjutada ka epigeneetilised faktorid ja keskkond (Schmitz *et al.*, 2018a, b; Sun, T. *et al.*, 2005). Näiteks on leitud, et ka DNA metüülatsioon võib mõjutada inimestel käelisust (Schmitz J. *et al.*, 2018a) ja keeleoskusi

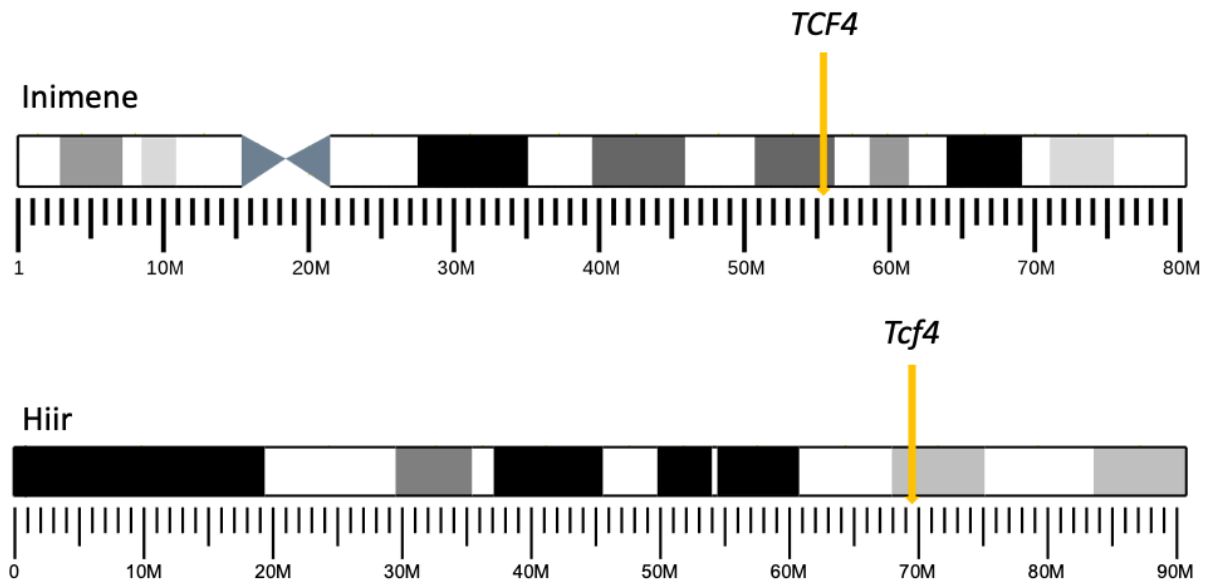
(Schmitz J. *et al.*, 2018b). Samuti on näidatud, et skisofreenia ja bipolaarse häirega inimeste aju on ebanormaalse epigeneetilise regulatsiooni tõttu vähem asümmeetriline/ lateraalne kui terve inimese aju, mis põhjustab haiguse sümptomeid (Abdolmaleky *et al.*, 2019).

Ka hiirte puhul on leitud, et ebatavaline ekspressiooni sümmeetria teatavate geenide puhul ajus võib olla seotud vaimsete häiretega. Näiteks kui teadlased üleekspresseerisid hiire ajus lateraliseerunud sidekoe kasvufaktori (CTGF) geeni, siis see kutsus paremas prefrontaalkoores esile sotsiaalse vältimise, vasakul prefrontaalkoores aga hoidis ära stressi põhjustatud sotsiaalse vältimise (Chae *et al.*, 2021). Seega antud geeni olemasolu avaldab rohkem mõju paremale ajupoolkerale. Samas lateraliseeritus ilmneb ainult stressi korral ja ei ole märgatav tavatingimustes, kuid annab mõista, miks osadel hiirtel tekib stress ja teistel mitte (Chae *et al.*, 2021). Lisaks leiti samas uuringus, et stressis hiirtel on palju rohkem lateraliseerunud gene, kui hiirtel, kes olid stressile resistentsed. Samuti oli näha emaste hiirte ajupoolkerade vahel suuremat lateraliseeritust kui isastel hiirtel (Chae *et al.*, 2021). Neid tulemusi saaks üldistada ka inimestele, et paremini selgitada stressi tekkimise mehhanisme.

Aju lateraliseeritus võib olla erinev ka meeste ja naiste vahel (Sutterer *et al.*, 2015), mis võiks selgitada, miks naised on rohkem haavatavad depressiooni ja posttraumaatilise stressihäire suhtes (Bangasser & Wiersielis, 2018; Breslau, 2002). On leitud, et naiste prefrontaalkorteks on tundlikum stressi suhtes (Bangasser & Wiersielis, 2018). Samuti on välja toodud, et meestel vastutab parem ajupoolkera otsuste tegemise eest ebaselgetes ja riskantsetes olukordades, aga naistel vasak ajupoolkera (Sutterer *et al.*, 2015).

### 1.3 *TCF4* geen ja selle ekspressioon

*TCF4* (transkriptsioonifaktor 4), tuntud ka kui *E2-2* (Cisse *et al.*, 2008), *SEF-2* (Pscherer *et al.*, 1996) ja *ITF2* (immunoglobuliini transkriptsioonifaktor 2) (Furumura *et al.*, 2001), on geen, mis paikneb 18 kromosoomi q õlas nii inimesel kui ka hiirel (Brockschmidt *et al.*, 2007) (Joonis 3). Homosügootsed *Tcf4*<sup>-/-</sup> hiired sünnivad väga harva ega ole võimelised üle nädala vanaks elama, mis näitab, et see geen on arenguks ülioluline (Zhuang *et al.*, 1996). Samas haplodefitsiitsed *Tcf4*<sup>+/-</sup> hiired on eluvõimelised (Flora *et al.*, 2007; Zhuang *et al.*, 1996).



**Joonis 3. *TCF4* geeni paiknemine inimese ja hiire 18 kromosoomil.** Joonisel on kujutatud G-riba ideogrammid, kus valgega on kujutatud geenirikkad ja CG rikkad alad. Halli ja mustaga on kujutatud AT rikkad ja geenivaesed alad. Sinakashall osa inimese 18 kromosoomil tähistab tsentromeeri. Kollane nool tähistab *TCF4/ Tcf4* geeni asukohta kromosoomil. M = aluspaaride arv miljonites. (Põhineb *Ensembl*-i ideogrammidel ja on internetis vabakasutuses.)

*TCF4/ Tcf4* on erakordselt suure transkriptide arvuga geen. See on võimeline ekspresseerima erinevaid *TCF4* valgu isovorme, mis erinevad üksteisest peamiselt pikkuse poolest. Neil kõigil on olemas põhiheeliks-silmus-heeliks ja transkriptsiooni aktiveeriv domeen AD2. *TCF4-B-1*, mis on kõige pikem, on lisaks veel ka AD1 domeen. *TCF4-A-1* on N-terminuses 23 unikaalset aminohapet. (Sepp *et al.*, 2011)

Imetajate embrüonaalses arengus on *TCF4/ Tcf4* väga tugevalt ekspresseeritud, hiirtel eriti vanuses E8.5-E13.5 (Murakami *et al.*, 2004; Sobrado *et al.*, 2009), inimestel embrüonaalses vanuses c13-c18 (de Pontual *et al.*, 2009). Täiskasvanud inimese kudes võib *TCF4* valku leida ajust, südamest, kopsudest, skeletilihastest, maost ja platsentast (de Pontual *et al.*, 2009; Jung *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2004; Meinhardt *et al.*, 2005; Pscherer, *et al.*, 1996). Hiire puhul on *TCF4* ekspresseeritud ajus, südames, kopsudes, maksas, skeletilihastes, platsentas ja piimanäärmetes (Itahana *et al.*, 2008; Jung *et al.*, 2018; Pscherer, *et al.*, 1996; Scott *et al.*, 2000; Skerjanc *et al.*, 1996). Kõrgemat *TCF4/ Tcf4* geeni ekspressiooni on täheldatud peaju piirkondades, mis on seotud neuronaaalse plastilisusega, nagu näiteks hipokampus, ajukoor, haistmissibul ja väikeaju (Brzózka *et al.*, 2010; Jung *et al.*, 2018; Dörflinger *et al.*, 1999; Soosaar *et al.*, 1994).

*TCF4* geeni haplopuudulikkus põhjustab inimestel Pitt-Hopkinsi sündroomi. Tegemist on haruldase häirega, mille sümptomiteks on intellektuaalne ja arenguline mahajäämine ning hingamisraskused. (Amiel *et al.*, 2007, Brockschmidt *et al.*, 2007, Zweier *et al.*, 2007)

Erinevad ülegenoomsed assotsiatsiooniuuringud (ingl. *genome wide association study*, GWAS) on näidanud, et mitmed üksiku nukleotiidi polümorfismid (ingl. *single-nucleotide polymorphism*, SNP) *TCF4* geenis on seotud psühhiaatriliste häiretega, nagu depressioon (Howard *et al.*, 2019) skisofreenia, autismi ning bipolaarne häire (Li *et al.*, 2019; Yao *et al.*, 2021). Samuti näitab *TCF4* olulisust aju arengus see, et GWAS uuringutes on polümorfismid *TCF4* geenis seostunud ka vaimse võimekusega - nii üldise kognitiivse võimekuse kui matemaatiliste võimetega (Lee *et al.*, 2018).

#### **1.4 Transkriptsioonifaktor 4 valgu üldisloomustus**

*TCF4* valgu alternatiivne nimi on bHLHb19 (ingl. *clade „b“ Basic helix-loop-helix protein 19*), mis tuleneb tema fülogeneetilise analüüsi põhjal kuuluvusest põhiheeliks-silmus-heeliks (bHLH) superperekonda (Skinner *et al.*, 2010). *TCF4* transkriptsioonifaktorit ei tasuks sealjuures segamini ajada T raku faktor 4-ga, mille puhul kehtib sama akronüüm (Costa *et al.*, 2013).

Oma DNA-d siduva domeeni alusel kuulub *TCF4* eükarüootide transkriptsioonifaktorite bHLP superperekonda. Antud domeen koosneb DNA-d siduvast põhiregioonist ja kahest dimerisatsiooni vahendavast  $\alpha$ -heeliksist, mis on üksteistest eraldatud silmusega (Massari & Murre, 2000). *TCF4*, nagu ka teiste mitmerakuliste organismide bHLP domeenidega transkriptsioonifaktorid, osaleb erinevates arengulistes protsessides, rakutsükli regulatsioonis ja keskkonna signaalidele reageerimises (Jones, 2004; Massari & Murre, 2000; Skinner *et al.*, 2010).

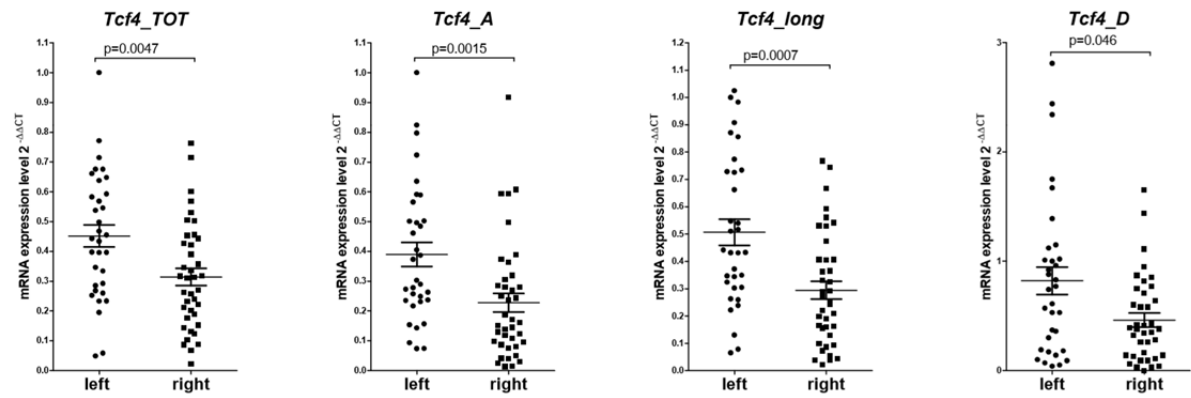
*TCF4* valgu rolle ei ole siiani väga hästi kirjeldatud. On teada, et *TCF4* aitab kaasa immuunsüsteemi rakkude (Bergqvist *et al.*, 2000; Cisse *et al.*, 2008; Zhuang *et al.*, 1996), neuronite (Flora *et al.*, 2007; Persson *et al.*, 2000), melanotsüütide (Furumura *et al.*, 2001) ja paljude muude rakutüüpide arengule ja funktsioneerimisele. Närvisüsteemis vastutab *TCF4* geeniregulatsiooni eest. Mõned näited sihtmärk geenidest on *FGF1* (fibroplasti kasvufaktor 1) (Liu *et al.*, 1998), *TH* (türosiini hüdroksülaas) (Yoon & Chikaraishi, 1994) ja *SSTR2* (somatostatiini retseptor 2) (Pscherer *et al.*, 1996).

Kuna TCF4 moodustab heterodimeere teiste bHLH faktoritega ja interakteerub teiste valkudega, mis on seotud transkriptsiooni regulatsiooniga (Forrest *et al.*, 2018), siis on TCF4-l potentsiaal omada suurt hulka ülesandeid, mis on seotud erinevate geenide regulatsiooniga. Inimgenoomis on identifitseeritud 10 604 TCF4 seondumiskohta, mis paiknevad 5437 geeni läheduses (Forrest *et al.*, 2018). Enamik TCF4 seondumissaite sisaldab vähemalt ühte E-Box järjestust (5'-CA<sub>n</sub>TG) (Forrest *et al.*, 2018).

## 1.5 TCF4 geeni funktsionaalne lateraliseeritus ajupoolkerades

Katsed haplodefitsiitsete *Tcf4*<sup>+/-</sup> (aktiivne ainult üks alleel) hiirtega on näidanud, et neil esinevad häired sotsiaalses suhtluses, mälu ning õppimisega seotud ülesannete lahendamisel (Kennedy *et al.*, 2016). Lisaks esineb nendel samadel hiirtel parema esikäpa nõrkus (Kennedy *et al.*, 2016; Welniarz *et al.*, 2015). Samuti on leitud, et *Tcf4*<sup>+/-</sup> hiirte vasakus hipokampuses on rohkem düsreguleeritud ekspressiooniga geene kui paremas hipokampuses (Gogliettino, 2017). See uuring viitab, et TCF4 võib omada spetsiifilist rolli vasakus poolkeras. *Tcf4* on tuvastatud 64 geeni seas, mis on seotud funktsionaalse lateraliseerituse fenotüübiga (Rouillard *et al.*, 2016). Transkriptsioonifaktor TCF4 on oluline ka ajupoolkerasid ühendava mõhnkeha (ingl. *corpus callosum*) arengus (Wittmann *et al.*, 2021), mis võib viidata, et TCF4 osaleb poolkeradevahelise kommunikatsiooni koordineerimises.

Eelpool toodut toetavad ka Tartu Ülikooli füsioloogia osakonna esialgsed andmed, mis näitavad, et *TCF4* geeni ekspressioon võib olla inimese vasakus ajupoolkeras kõrgem (Joonis 4, avaldamata andmed). Kuna TCF4 on seotud mitmete häirete ja Pitt-Hopkinsi sündroomiga (Amiel *et al.*, 2007, Brockschmidt *et al.*, 2007, Zweier *et al.*, 2007), on seda geeni väga palju uuritud, kuid ekspressiooni erinevust poolkerade vahel ei ole varasemalt näidatud.



**Joonis 4. *TCF4* ekspressioon dorsolateraalses prefrontaalkoores Austraalia päritolu uurimisgrupil.** Inimeste dorsolateraalse prefrontaalkoores koeproovid ( $n=72$ ) pärinevad New South Walesi ajupankade ühenduselt (ingl. *New South Wales Brain Bank Network*, (<https://nswbrainbank.org.au/>)). Uuringus kasutatud kohordi detailse kliinilise ja demograafilise kirjelduse on avaldanud Weicker *et al.* (2010). 33 isiku puhul oli *TCF4* ekspressioon mõõdetud vasakust poolkerast ning 39 isiku puhul mõõdeti ekspressioon paremast poolkerast. Joonisel näidatud andmed on Tartu Ülikooli füsioloogia osakonna ja professor Tõnis Timmuski koostööprojekti esialgsed avaldamata tulemused.

Tähelepanuväärne on see, et kahes sõltumatus uuringus on näidatud *TCF4* allareguleerituse korral *LEFTY1/Lefty1* geeni ekspressiooni olulist langust (Meno *et al.*, 1997; Kennedy *et al.*, 2016). *LEFTY1* puhul on näidatud kõrgemat ekspressioonitaset vasakus poolkeras ning olulisust aju arengus ning lateraliseerituse kujunemisel (Meno *et al.*, 1997; Kennedy *et al.*, 2016). *Tcf4<sup>+/-</sup>* hiirte hipokampuses on *Lefty1* üks enim allareguleeritud geen (isegi rohkem kui *Tcf4* ise) (Kennedy *et al.*, 2016). Sama efekti on varem näidatud inimese rakukultuuris: *TCF4 knockdown* põhjustab *LEFTY1* ekspressiooni langust (ligi 2x) (Forrest *et al.*, 2013). *TCF4* seondumiskohtade ( $n=10\,604$ ) esmane analüüs viitab, et lähim tuvastatud *TCF4* seondumissait (ingl. *peak significance rank 3969*) asub *LEFTY1* geenist siiski enam kui 10 000 bp eemal (Forrest *et al.*, 2018). Seega sellise analüüsiga ei saa kindlalt väita, et *TCF4* võiks olla *LEFTY1* otsene regulaator (Forrest *et al.*, 2018).

## 2. EKSPERIMENTAALOSA

### 2.1 Töö eesmärgid

Käesoleva töö üldiseks eesmärgiks on leida vastus küsimusele, kas ja mil määral erineb transkriptsioonifaktor TCF4 tase erinevate ajupoolkerade vahel.

Katsed haplodefitsiitsete  $Tcf4^{+/-}$  hiirtega on näidanud, et neil esineb parema esikäpa nõrkus (Kennedy *et al.*, 2016; Welniarz *et al.*, 2015). Samuti on leitud  $Tcf4^{+/-}$  hiirte vasakus hipokampuses rohkem düsreguleeritud ekspressiooniga gene kui paremas hipokampuses (Gogliettino, 2017). Ka Tartu Ülikooli füsioloogia osakonna esialgsed andmed näitavad, et *TCF4* geeni ekspressioon võib olla inimese vasakus ajupoolkeras kõrgem (Joonis 4). Selle põhjal püstitati eesmärk analüüsida *TCF4/ Tcf4* geeni ekspressiooni võrdlevalt vasakus ja paremas ajupoolkeras.

Transkriptsioonifaktor TCF4-1 on potentsiaal omada suurt hulka ülesandeid, kuna see omab 10 604 seondumiskohta 5437 geeni läheduses. On ka viited sellele, et TCF4 võiks olla kuidagi seotud *LEFTY1* geeniga (Meno *et al.*, 1997; Kennedy *et al.*, 2016), mis on teadaolevalt väga lateraliseerunud geen (Kennedy *et al.*, 2016). Seetõttu sai püstitatud teine eesmärk, milleks oli uurida TCF4 lokaliseeritud lateralisatsiooni hiire ajus.

### 2.2 Materjalid ja meetodika

#### 2.2.1 Eksperimendis osalenud hiired ja inimesed

Uurimuse läbiviimiseks kasutati metsiktüüpi (ingl. *wild type*, wt), kuid geneetilises segataustas teise põlvkonna hübriid [(129S5/SvEvBrd x C57BL/6) x (129S5/SvEvBrd x C57BL/6)] hiiri. Kvantitatiivse qPCR katsete jaoks kasutati 4-5 kuu vanuseid isaseid hiiri (n = 7-11) ning immuunohistokeemia värvinguteks kasutati ~5 kuu vanuseid emaseid hiiri (n = 5). Katseloomad elasid standardsetes loomapuurides (42,5 x 26,6 x 15,5 cm), maksimaalne hiirte arv puuris oli 8. Puurides kasutati haavapuidust allapanu (2 cm kiht) ning haavapuidust pesamaterjali (0,5 l). Allapanu ja pesamaterjali vahetati iga nädal. Loomi hoiti temperatuuril  $22 \pm 1$  °C ja 12/12 valguse-pimeduse režiimil (kell 19.00 kustutati tuled). Toit ja vesi olid loomadele vabalt kättesaadavad. Kõik loomkatsed viidi läbi vastavalt Euroopa Ühenduste direktiivile (2010/63/EL). Ajukudede dissekteerimiseks uinutati emased hiired (n = 5) intraperitoneaalse (kõhuõõne)

süstiga: ketamiin/dexmedetomidine lahust füsioloogilises lahuses (ketamiin 150 mg/kg, dexmedetomidine 0.5 mg/kg, süstemaht 0.1 ml 100 g kohta). Veri pesti välja (1x PBS-ga, 50 ml/min) ning fikseeriti (4% formaldehüüd/ 1x PBS lahusega, 50 ml/min). Katseloomade perfuseerimist viis läbi vastavat sertifikaati omav spetsialist. Hiirte peaju eraldati koljust, nii vasakust kui ka paremast ajupoolkerast, dissekteeriti hipokampused, parietaalsagarad, temporaalsagarad ja frontaalsagarad ning külmutati koheselt vedelas lämmastikus, kust koguti pikemaajaliseks hoiustamiseks -80 °C ultrakülmikusse. Dissekteerimist viis samuti läbi vastavat sertifikaati omav spetsialist.

Inimese ajupoolkerade uuringuks koguti *post mortem* koeproovid tervelt isikutelt (n = 19), kelle keskmine vanus oli  $50,85 \pm 8,27$  aastat. Proovid kogusid Tartu Ülikooli patoloogilise anatoomia ja kohtuarstiteaduste osakond ning Eesti Kohtuekspertiisi Instituut. Dorsolateraalsete prefrontaalkoorte ja hipokampuste proovid dissekteeriti kvalifitseeritud patoloogide poolt Tartu Ülikooli inimuuringute eetika komitee nõusolekul (223/T-4).

### 2.2.2 Kasutatud praimerite disain ja põhjendus

Antud töös uuriti *TCF4/ Tcf4* mRNA suhtelist ekspressiooni vasakus ja paremas ajupoolkeras kasutades reaalaaja kvantitatiivset PCR meetodit. Antud uurimistöös kasutatud praimerite informatsioon on välja toodud tabelis 1 (hiir) ja tabelis 2 (inimene).

*TCF4* geeni jaoks kasutati kahte paari praimereid nii inimese (*Homo sapiens* - hs) kui ka hiire (*Mus musculus* - mm) puhul, et saada võimalikult täpseid tulemusi ning veenduda tulemuste õigsuses. Hiire *Tcf4* esimene praimerite paar (Tabel 1) on disainitud professor Tõnis Timmuski laboris inimese *TCF4* praimerite alusel. Äraspidine (R-*reverse*) praimer on peaaegu täielikult sama, edaspidises (F-*forward*) praimeris on rohkem muudatusi läbi viidud selleks, et sobituks hiirel sama homoloogilise piirkonna peale. Teine *Tcf4* praimerite paar (*TCF4\_tot*) oli disainitud Wedel *et al.* artikli järgi (Wedel *et al.*, 2020). Uurimistööks valiti just need paarid, kuna nende eesmärk on amplifitseerida võimalikult palju *TCF4* transkripte. Neid praimeripaare kasutades jõudis qPCR-i katsete tegemise käigus amplifikatsioonikõver määratud lävendini hiirel 18-26 tsükli vahel ja inimesel 22-28 tsükli vahel. (qPCR katsete ülesehitus on täpsemalt kirjeldatud peatükis 2.2.3.)

Selleks, et võrrelda *TCF4/ Tcf4* ekspressiooni parema ja vasaku ajupoolkera vahel võeti kasutusele neli erinevat koduhoidja geeni. Koduhoidja geenid on geenid, mille poolt ekspresseeritud valke kasutavad kõik rakud normaalses elutingimustes funktsioneerimiseks (Butte *et al.*, 2001). Hiire puhul kasutati neist kolme: *ActB*, *Hprt* ja *Gapdh*. Inimese puhul lisandus nendele veel *TBP* geen. Nii mitu erinevat koduhoidjad sai valitud selleks, et saada võimalikult täpsed tulemused ja et oleks võimalik näha ka väiksemaid erinevusi parema ja vasaku ajupoolkera *TCF4/ Tcf4* ekspressioonis.

Beeta aktiini kodeeriv geen (*ACTB/ ActB*) on väga konserveerunud (Ng *et al.*, 1985) ja seda kasutatakse sageli qPCR-is standardse koduhoidja geenina (sh aju uurimiseks) (Röhn *et al.*, 2018; Søes *et al.*, 2013). Beeta aktiin on raku kontraktiilse aparatuuri peamine koostisosa ja üks kahest mittelihase tsütoskeleti aktiinist, mis on ekspresseeritud igal pool (Bunnell *et al.*, 2011; Ng *et al.*, 1985). *ACTB/ ActB* amplifikatsioonikõver jõudis qPCR-is määratud lävendini hiire puhul 16-23 tsükli vahel ja inimese puhul 20-24 tsükli vahel.

*HPRT/ Hprt* geeni kasutakse samuti koduhoidjana, kuna see on rakkudes pidevalt ekspresseerunud sarnaselt nii hiirel kui inimesel (Kim *et al.*, 1986). Lisaks on leitud, et see ekspresseerub ajus stabiilselt (Otto *et al.*, 2020), mis teeb *HPRT/ Hprt*-st hea koduhoidja antud uurimistöö jaoks. Antud geen kodeerib ensüümi nimega hüpoksantiin guaniin fosforibosüültransferaas (ingl. *hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase*) (Silver *et al.*, 2008). See ensüüm võimaldab rakkudel taaskasutada puriine (guaniin ja adeniin), tehes sellega rakkude energiakasutuse efektiivsemaks, sest puriinide tootmine on energia- ja ajakulukam, kui nende taaskasutamine (Kim *et al.*, 1986; Silver *et al.*, 2008). Antud töös jõudis qPCR-i katsete käigus *HPRT/ Hprt* amplifikatsioonikõver määratud lävendini hiirel 23-28 ja inimesel 25-30 tsükli vahel.

*GAPDH/ Gapdh* kodeerib valku glütseraalaldehüüd-3-fosfaat dehüdrogenaas (ingl. *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*), mis on tuntud kui mitme erineva funktsiooniga valk (ingl. *moonlighting protein*) (Jung *et al.*, 2014). Sellel on roll nii glükolüüsis kui ka rakutuuma funktsioonides (Jung *et al.*, 2014; Silver *et al.*, 2008). Näiteks osaleb *GAPDH* RNA transpordis, DNA replikatsioonis (Carujo *et al.*, 2006) ja apoptoosis (Jung *et al.*, 2014). On leitud, et see on ka sobilik koduhoidja ajuproovide uurimiseks (Röhn *et al.*, 2018). *GAPDH/ Gapdh* amplifikatsioonikõver jõudis lävendini qPCR-is hiirel 15-21 ja inimesel 19-23 tsükli vahel.

*TBP* geen kodeerib *TATA-boxi* siduvat valku (ingl. *TATA-box binding protein*) ja osaleb RNA polümeraas II tegevuste koordineerimisel koostöös endaga seonduvate faktoritega (*TAF – TBP-associated factors*) (Demény *et al.*, 2007; Søes *et al.*, 2013). Seda on kasutatud ka varasemalt koduhoidjana ajuproovide uurimisel (Søes *et al.*, 2013). Antud geeni amplifikatsioonikõver jõudis qPCR-is lävendini inimesel 28-32 tsükli vahel.

**Tabel 1. Uurimistöös kasutatud praimerid (hiir).**

<b>Geen</b>	<b>Praimeri nimi</b> ( <i>forward (F)</i> , <i>reverse (R)</i> )	<b>Praimeri järjestus</b>	<b>Päritolu</b>
<i>Tcf4</i>	TCF4_mm_F TCF4_mm_R	TACGCTCCTTCAGCCAGCACTG TGGATGCAGGCTACAGTAGCTG	Prof T. Timmuski labori kollektsoon
<i>Tcf4_tot</i>	Tcf4_tot2_mm_F Tcf4_tot2_mm_R	GACCACACGAACAACAGCTT TCTTCGATTCGGCTTTGCAG	Wedel <i>et al.</i> , 2020
<i>ActB</i>	ActB_mm_F ActB_mm_R	ACCATGTACCCAGGCATTGC AGCCACCGATCCACACAGAG	Labori kollektsoon
<i>Hprt</i>	Hprt_mouse_F Hprt_mouse_R	GCAGTACAGCCCCAAAATGG AACAAAGTCTGGCCTGTATCCAA	Labori kollektsoon
<i>Gapdh</i>	Gapdh_mm_F Gapdh_mm_R	TCACCACCATGGAGAAGGC GCTAAGCAGTTGGTGGTGCA	Mustachio <i>et al.</i> , 2019

**Tabel 2. Uurimistöös kasutatud praimerid (inimene).**

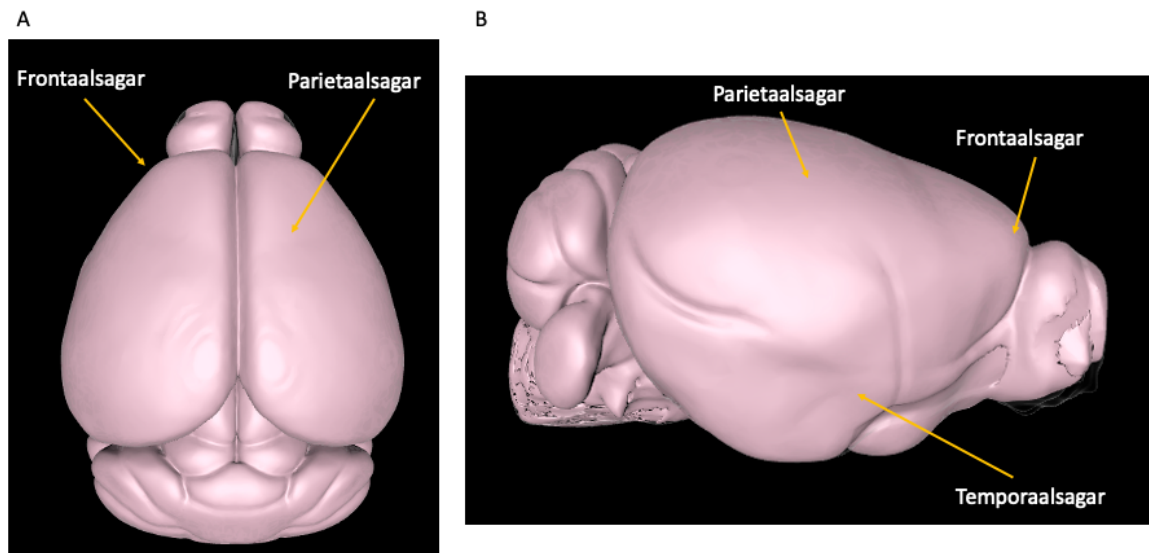
<b>Geen</b>	<b>Praimeri nimi</b> ( <i>forward (F)</i> , <i>reverse (R)</i> )	<b>Praimeri järjestus</b>	<b>Päritolu</b>
<i>TCF4_long</i>	TCF4_long_4F TCF4_long_7R	AGAAGACAGAAGTAGCTCAGGGTC GTTTGGTGGGCGAAAGGGTTCC	Prof T. Timmuski labori kollektsoon
<i>TCF4_tot</i>	TCF4_tot_hs_10F TCF4_tot_hs_11R	TATGCTCCATCAGCAAGCACTG TGGATGCAGGCTACAGTAGCTG	Prof T. Timmuski labori kollektsoon

<i>ACTB</i>	ACTB_hs_F ACTB_hs_R	CTGGGAGTGGGTGGAGGC TCAACTGGTCTCAAGTCAGTG	Prof T. Timmuski labori kolleksioon
<i>HPRT</i>	HPRT1_Hs_ex_ 6 HPRT1_Hs_ex_ 7	GACTTTGCTTTCCTTGGTCAGG AGTCTGGCTTATATCCAACACTTCG	Labori kolleksioon
<i>GAPDH</i>	GAPDH_hs_F GAPDH_hs_R	CCACCCATGGCAAATTCC GATGGGATTTCCATTGATGACA	Prof T. Timmuski labori kolleksioon
<i>TBP</i>	TBP_hs_F TBP_hs_R	TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA CACATCACAGCTCCCCACCA	Prof T. Timmuski labori kolleksioon

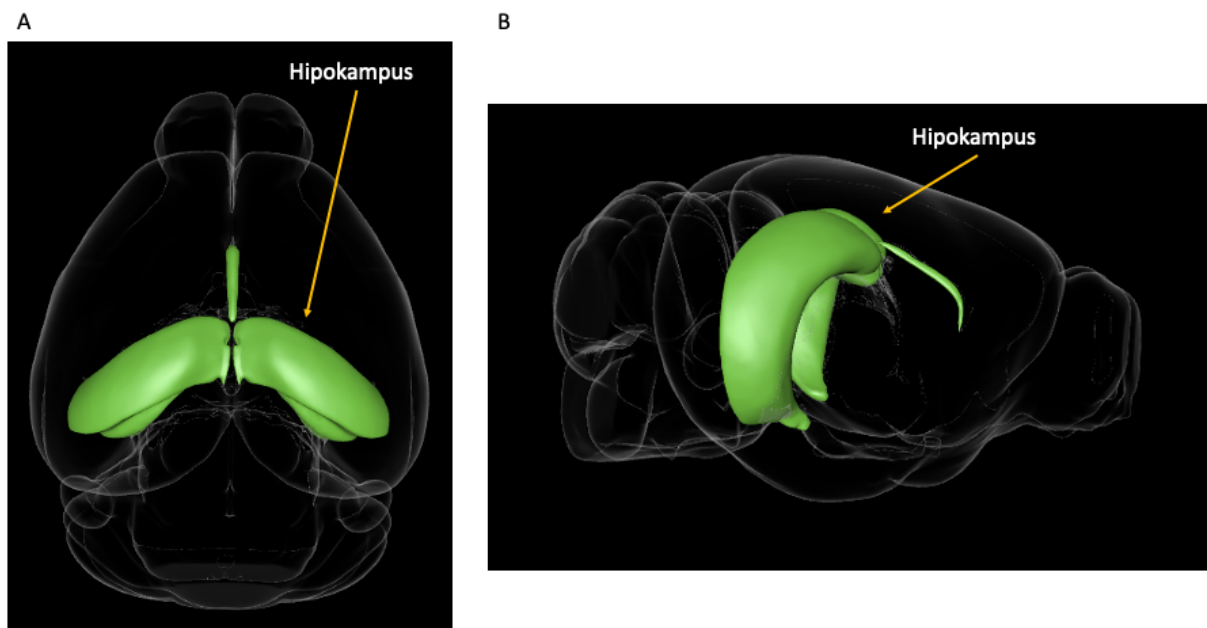
### 2.2.3 *Tcf4* ekspressiooni analüüs hiire ajus qPCR-iga

#### 2.2.3.1 RNA eraldamine

Analüüsi jaoks kasutati metsiktüüpi hiirte ajudest dissekteeritud ajuosasid (hipokampus, parietaalsagar, temporaalsagar ja frontaalsagar) mõlemast ajupoolkerast (Joonis 5 ja Joonis 6). Hipokampus oli valitud, kuna seal on teadaolevalt *TCF4* väga kõrgelt ekspresseeritud (Braun *et al.*, 2020). Hipokampus omakorda kuulub temporaalsagara alla ja parietaalsagar on paljudes ülesannetes hipokampusega seotud (Holmes *et al.*, 2014; Robinson *et al.*, 2015), mistõttu kaasati ka need ajuosad analüüsi. Lisaks analüüsiti ka frontaalsagarat, kuna sellest piirkonnast pärinevat koematerjali kasutati Tartu Ülikooli füsioloogia osakonnas esialgsete andmete saamiseks (Joonis 4).



**Joonis 5. Uurimistöös kasutatud hiire (*Mus musculus*) väljapoole jäävad peaaju piirkonnad.** Joonisel A on hiire peaaju pealtvaates (horisontaalvaade) ja joonisel B külgvaates (sagitaalvaade). Joonised A ja B on tehtud kasutades *Allen Brain Atlas* tööriista *Allen Mouse Common Coordinate Framework v.3*, kus loodi hiire aju 3D kujutis ja lisati põhilised ajupiirkonnad (Lein *et al.*, 2007).



**Joonis 6. Uurimistöös kasutatud hiire (*Mus musculus*) sissepoole jääv hipokampuse piirkond.** Joonisel A on hiire aju pealtvaates (horisontaalvaade) ja joonisel B külgvaates (sagitaalvaade). Joonised A ja B on tehtud kasutades *Allen Brain Atlas* tööriista *Allen Mouse Common Coordinate Framework v.3*, kus loodi hiire aju 3D kujutis ja lisati hipokampuse piirkond (märgitud rohelisega) (Lein *et al.*, 2007).

Kudedest RNA eraldamiseks lisati 50 µl - 100 µl trisooli (TRIzol® *Reagent*, Thermo Fisher scientific) (olenevalt tüki suuruselt, mis varieerus 50 mg - 100 mg vahel). Seejärel koematerjal homogeniseeriti homogeniseerimisplulgaga ja lisati juurde 500 µl - 900 µl trisooli (olenevalt

tüki suurusel). Lahust inkubeeriti 5 min toatemperatuuril. Peale seda lisati 100 µl - 200 µl kloroformi (1/5 trisooli kogusest) ja pöörati tuubi käes üles-alla 15 sekundit. Lahust inkubeeriti 2 min toatemperatuuril, seejärel tsentrifuugiti (*Thermo Scientific Heraeus Fresco™ 17* mikrotsentrifuug, 24 x 1,5/2,0 ml rootor *ClickSeal* kaanega) 15 min 12 000 rpm, +4 °C juures. Tekkis kolm kihti, millest kõige ülemine, RNA-d sisaldav kiht, pipeteeriti ettevaatlikult uude 1,5 ml tuubi. Järgnevalt lisati 300 µl - 500 µl isopropanooli (1/2 trisooli kogusest) ja taaskord segati pöörates tuubi käes üles-alla. Lahust inkubeeriti 10 min toatemperatuuril. Seejärel tsentrifuugiti (*Thermo Scientific Heraeus Fresco™ 17* mikrotsentrifuug, 24 x 1,5/2,0 ml rootor *ClickSeal* kaanega) lahust 10 min 12 000 rpm, +4 °C juures, eemaldati supernatant ja lisati 1 ml jääkülma etanooli (75%). Peale seda lahust tsentrifuugiti (*Thermo Scientific Heraeus Fresco™ 17* mikrotsentrifuug, 24 x 1,5/2,0 ml rootor *ClickSeal* kaanega) 5 min 7500 rpm, +4 °C juures. Supernatant eemaldati ja RNA-le lisati 50 µl steriilset vett. RNA kontsentratsioon mõõdeti spektrofotomeetriga (*NanoDrop 1000™ Spectrophotometer*).

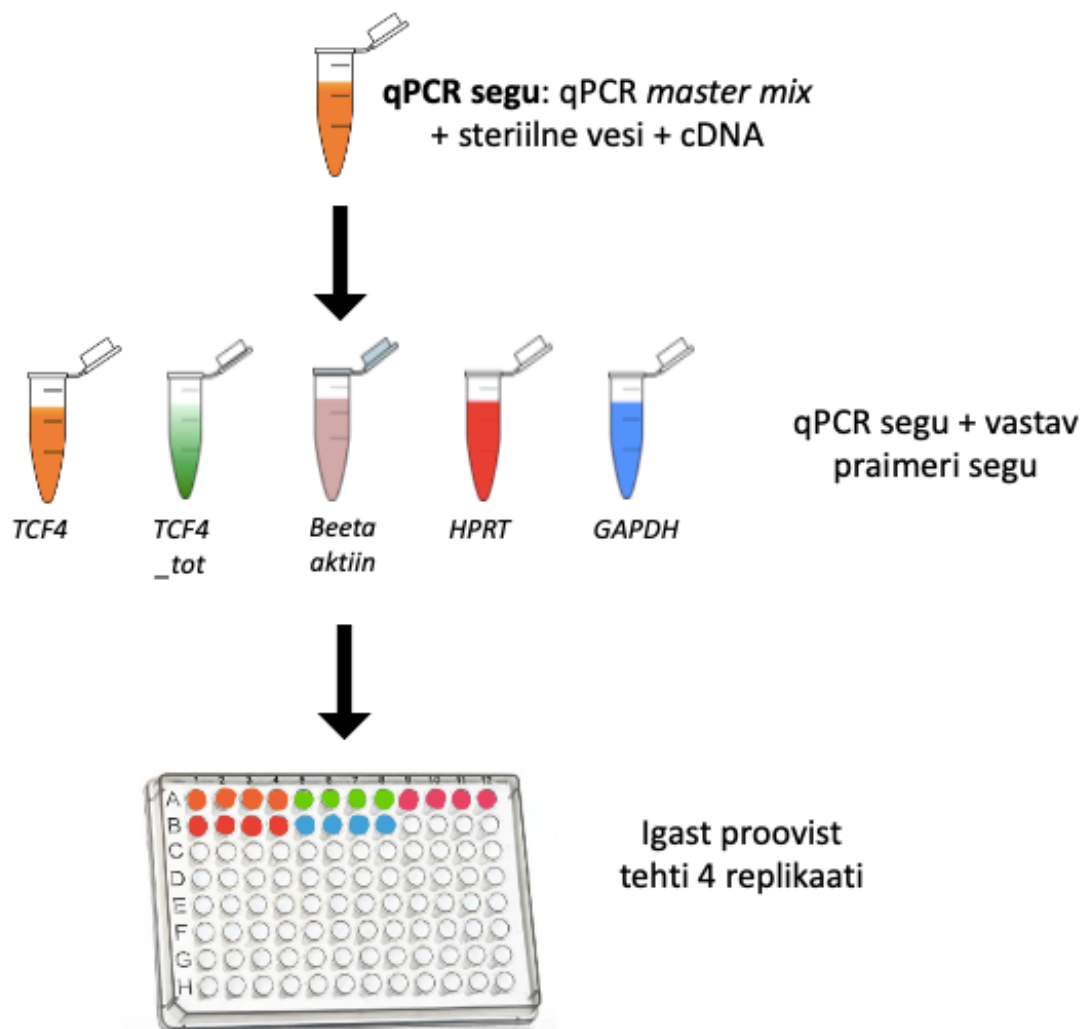
### 2.2.3.2 cDNA süntees

Kudedest eraldatud RNA pealt sünteesiti vastav cDNA. Selle jaoks tehti kõige pealt segu, mis sisaldas 1 µl dNTP (10 mM), 1 µl oligoribonuklotiide (*Random Hexamer*, Invitrogen), RNA-d (~500 ng/ µl) ja steriilset vett (kogus olenes RNA kontsentratsioonist). Kokku valmistati 13 µl segu proovi kohta. Vastavad proovid asetati 65 °C juurde kuumaplokki (*Techne® Dri-Block®* kuumuti, mudel DB-2D) 5 min, et praimerid saaksid seonduda RNA-ga. Peale seda pandi proov jääle 1 min, et lõpetada reaktsioon. Järgnevalt valmistati teine segu, mis sisaldas ühe proovi kohta 4 µl 5x reaktsioonipuhvrit (*5x SSIV Buffer*, Invitrogen), 1 µl DTT-d (Invitrogen), 1,5 µl steriilset vett ja 0,5 µl pöördtranskriptaasi (*Superscript™ IV*, Invitrogen). Teise segu koostisosad segati esimese omadega õrnalt suspenderides. Seejärel proovid inkubeeriti 10 min toatemperatuuril, 20 min 55 °C juures ja lõpuks toimus inaktivatsioon 15 min 80 °C juures.

### 2.2.3.3 qPCR

*TCF4/ Tcf4* mRNA suhtelise ekspressiooni analüüsimiseks kasutati reaalaja qPCR-i (Joonis 7). Hiire cDNA-de analüüsimiseks kasutati kolme erinevat koduhoidjat (*ActB*, *Hprt*, *Gapdh*) ja kahte praimeripaari (*Tcf4*, *Tcf4\_tot*) *Tcf4* ekspressioonitaseme määramiseks. qPCR läbiviimiseks tehti segu, mis sisaldas 108 µl *PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix-i*

(Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) (Joonis 7), 84 µl steriilset vett ja 8 µl cDNA-d (cDNA-le lisati enne 30 µl steriilset vett). Kõik segati omavahel korralikult kokku. Seejärel tõsteti segu 38 µl kaupa laiali, et jagada võrdselt kõigi viie uuritava transkripti (*Tcf4*, *Tcf4\_tot*, *ActB*, *Hprt*, *Gapdh*) vahel. Peale seda tehti vastav segu, mis sisaldas edaspidiseid praimereid (*forward strand*, TAG Copenhagen), äraspidised praimereid (*reverse strand*, TAG Copenhagen) ja steriilset vett suhtega 1:1:20. Igasse tuubi, kuhu qPCR segu sai pandud, lisati juurde 4 µl vastavat praimerimiksi (Joonis 7). Kõik tuubis segati omavahel korralikult kokku ja seejärel pandi segu qPCR plaadile. Igast proovist tehti neli 10 µl replikaati. Plaat suleti ja tsentrifuugiti 2 min 1500 rpm, toatemp (*Eppendorf® Centrifuge 5810R*, *Eppendorf A-4-62 Microplate Swing Bucket rotor*). Peale seda sisestati plaat qPCR masinasse (*QuantStudio 12K Flex*) ja mõõdeti uuritavate geenide ekspressiooni reaajas.



**Joonis 7. qPCR-i katseplaani illustreeriv joonis.** Esmalt valmistati qPCR segu. Hiire cDNA puhul kasutati kolme erinevat koduhoidjat (*ActB*, *Hprt*, *Gapdh*) ja kahte *Tcf4* praimeripaari (*Tcf4* ja *Tcf4\_tot*). qPCR segu jaotati võrdselt kõigi viie uuritava transkripti vahel. Igasse tuubi lisati juurde transkriptile vastavat praimerimiksi. Kõik komponendid segati omavahel korralikult kokku ja seejärel pandi segu qPCR plaadile. Igast proovist tehti neli replikaati.

#### 2.2.3.4 qPCR tulemuste analüüs

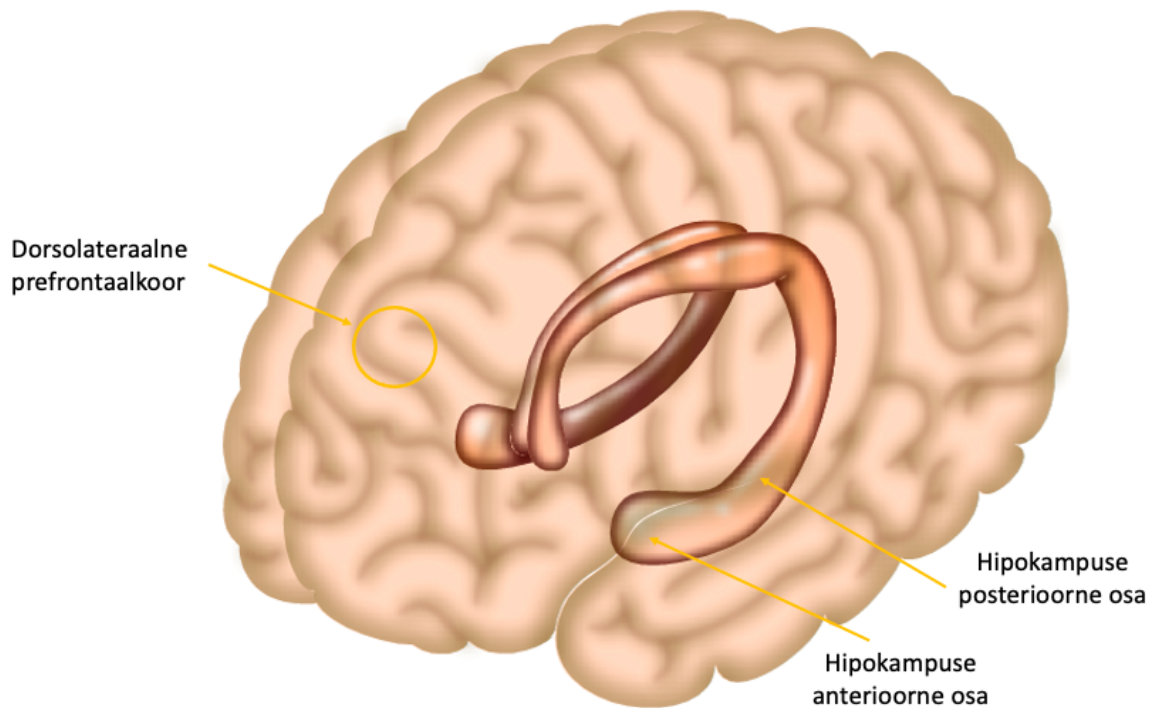
qPCR masinast (*QuantStudio 12K Flex*) võeti välja Ct (*threshold cycle*)/ Cq (*quantification cycle*) väärtused ehk lävetsükli väärtused. Lävetsükkel saabub, kui on kogunenud piisavalt kaheaheelalist DNA-d, et fluorestsents oleks kõrgem taustast. Ct väärtust kasutatakse proovis oleva sihtmärk-DNA koguse kvantifitseerimiseks – mida madalam on Ct väärtus/ tase, seda suurem on sihtmärk-DNA kogus proovis (Scheffe *et al.*, 2006). Uurimistööks oli lävendiks valitud  $\Delta Rn = 0,15$  RFU (suhtelist fluorestsentsühikut).

Arvutuste tegemiseks kasutati *MS Excelit*. qPCR masinast saadud Ct väärtuste põhjal arvutati keskmine Ct väärtus proovi kohta (vähemalt kolme replikaadi keskmine). Enne seda leiti replikaatide vaheline standardhälve, mille alusel eemaldati liiga suure kõrvalekaldega ( $p > 0,16$ ) tulemused. Seejärel leiti Ct-de vahed ( $\Delta Ct$ ) *Tcf4* praimeripaaride ja koduhoidja geenide (*ActB*, *Hprt*, *Gapdh*) tulemuste vahel:  $\Delta Ct = Tcf4$  geen - koduhoidja geen. Siis arvutati  $2^{-\Delta Ct}$ , et leida *Tcf4* geeni ekspressiooni tase proovides.

Viimaks võrreldi omavahel parema ja vasaku ajupoolkera ekspressiooni taset, et teha lõplikud järeldused. Selleks kasutati GraphPad Prism (versioon 9.0.1 (128)) rakendust. Toorandmeid analüüsiti Mann-Whitney testiga ja kui vasaku ajupoolkera tulemused oli üheks kalibreeritud teostati analüüs Wilcoxon testiga.

#### 2.2.4 *TCF4* geeni ekspressiooni analüüs inimese ajus qPCR-iga

*TCF4* geeni ekspressiooni analüüs inimese ajukudedest pärinevast materjalist oli metoodiliselt sarnane peatükis 2.2.3 kirjeldatuga. RNA eraldamiseks valiti vastavalt peaaju parema ajupoolkera hipokampuse anteriorne ja posterioorne osa ning vasaku ajupoolkera hipokampuse anteriorne ja posterioorne osa (Joonis 8). Hipokampus osutus valituks seetõttu, et seal piirkonnas on teadaolevalt *TCF4* ekspressiooni tase kõrgeim, mis täheldatud peaajus (Braun *et al.*, 2020).



**Joonis 8. Uurimistöös kasutatud inimese aju hipokampuse ja frontaalsagara piirkonnad.**  
(Modifitseeritud Packham, 2015 artikli järgi.)

RNA eraldamine inimese ajust ja cDNA süntees saadud RNA-st toimus sarnaselt, nagu mainitud peatükkides 2.2.3.1 ja 2.2.3.2. qPCR puhul kasutati lisaks kolmele 2.2.3.3 peatükis märgitud koduhoidja geenile veel lisaks *TBP* (ingl. *TATA-box binding protein*) geeni. Samuti valiti välja kaks võimalikult paljuid *TCF4* isovorme hõlmavat praimeripaari (*TCF4\_long* ja *TCF4\_tot*). qPCR segu kogused arvutati ümber vastavalt kuue transkripti jaoks. Tulemuste analüüs toimus täpselt nagu hiire puhulgi, mis on välja toodud peatükis 2.2.3.4.

### 2.2.5 Hiirte ajulõikude immunohistokeemiline analüüs

*TCF4* lokalisatsiooni uurimiseks hiire vasaku ja parema ajupoolkera regioonidest kasutati immunohistokeemilist analüüsi. Eksperimentides kasutati emastelt viiekuustelt hiirtelt pärinevaid ajulõike (täpsemalt kirjeldatud peatükis 2.2.1). Eelnevalt dissekteeritud ja fikseeritud ajud, mida säilitati -80 °C juures, lõigati -20 °C juures 30 µm paksusteks lõikudeks kasutades krüomikrotoomi (Leica CM1850-*Cryostat*) koos Leica madala profiiliga ühekordselt kasutatavate teradega (DB80LS, Leica) ja asetati 1xPBS-i (fosfaatpuhverdatud soolalahus, ingl. *phosphate buffered saline*, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,01% NaN<sub>3</sub>, pH 7,4).

Järgnevalt teostati koelõikude immunohistokeemia. Esialgu pesti ajulõigud 1x PBS-is 3 x 5 min loksutil. Seejärel hoiti lõike 30 min 95 °C juures 50 mM naatriumtsitraadi puhvril (0,1% Tween-20 (Naxo OÜ), 1x PBS, pH 6.0), et fiksaator eemaldada. Peale seda eemaldati puhver ja permeabiliseeriti ajulõigud pannes need permeabiliseerimispuhvrilisse (1x PBS, 0,3% Triton-100% (Naxo OÜ)) ning inkubeeriti 30 min toatemperatuuril loksutil (järgnevate etappide puhul hoiti samuti lõike alati loksutil). Aja möödudes puhver eemaldati ja lõikudele lisati blokeerimispuhver (0,3 M glütsiin (Applichem), 5% NGS (normaalse kodukitse seerum, ingl. *normal goat serum*, (Abcam)), 1% BSA (veise seerum albumiin, ingl. *Bovine serum albumin* (Sigma Aldrich)) kaheks tunniks, et ei toimuks mittespetsiifilist antikeha seondumist. Peale bloki maha võtmist lisati lõikudele primaarse antikeha lahus (1x PBS, 1% BSA (Sigma Aldrich), 0,1% Tween-20 (Naxo OÜ), 1:500 *rabbit anti-TCF4* antikeha (Abcam Cat# ab130014, RRID:N/A)) ja hoiti 4 °C juures 2 päeva. Tehti ka negatiivne kontroll, mille puhul primaarse antikeha lahuse asemel pandi ajulõigud 1x PBS-i. Kahe päeva möödudes pesti ajulõigud 1x PBS-is 3 x 10 min ja lisati sekundaarse antikeha lahus (1x PBS, 1% BSA (Sigma Aldrich), 0,1% Tween-20 (Naxo OÜ), 1:500 *goat anti-rabbit* antikeha, (Alexa Fluor 488) (Jackson ImmunoResearch Labs Cat#111-545-045, RRID:AB\_2338049)) ajulõikudele. Sekundaarse antikeha lahusega inkubatsioon toimus 2h pimedas. Seejärel pesti lõigud 1x PBS-is 3 x 5 min. Rakutuumade nägemiseks visualiseeriti DNA kasutades bisbensimiid H 33258 lahust (Hoechst 33258, Sigma Aldrich) lahjendusega 1:2500 1xPBS-is, mis pandi lõikudele 5 minutiks peale ja pesti maha 1x PBS-ga 2 x 5 min.

Kui immunohistokeemia oli tehtud, siis asetati lõigud alusklaasile 0,5% želatiinilahusesse (steriilne vesi, želantiin). Peale pandi sulundusvedelik (1 osa 1x PBS, 9 osa glütseriin) ja kaeti katteklaasiga, mille servad pitseeriti kuivamise vältimiseks kinni küünelakiga.

## 2.2.6 Mikroskoopimine ja pildistamine

Immunohistokeemilised preparaadid skaneeriti Leica Aperio VERSA 1.0.4.125-ga (10x suurendus). Saadud kujutised analüüsiti ImageJ (versioon 1.53r) programmi kasutades (Schneider, C. *et al.*, 2012), mis mõõtis TCF4 valgust ekspresseerivaid rakkusid nii paremas kui ka vasakus ajupoolkeras fluorestsentsi intensiivsuse alusel.

## 2.3 Tulemused

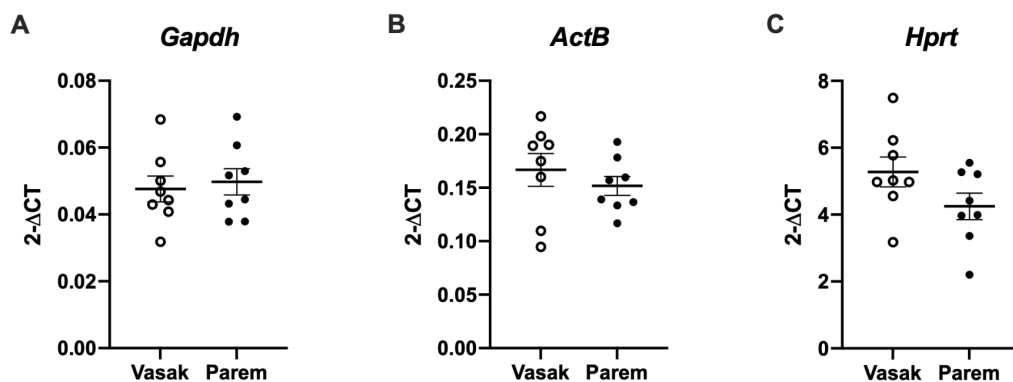
### 2.3.1 *Tcf4* ekspressiooni analüüsi tulemused hiirel

Üheks uurimistöö eesmärgiks oli analüüsida *Tcf4* ekspressiooni taset hiire paremas ja vasakus ajupoolkeras, et välja selgitada, kas ja mil määral erineb transkriptsioonifaktor TCF4 tase erinevate ajupoolkerade vahel. Selle jaoks teostati qPCR analüüs erinevatest hiire aju osadest, kasutades kolme erinevat koduhoidja geeni (*Gapdh*, *ActB*, *Hprt*) ja *Tcf4* geeni (*Tcf4* ja *Tcf4\_tot*) peatükis 2.2.3 kirjeldatud meetodite järgi. Proovid võeti uuritavate hiirte paremast ja vasakust ajupoolkerast, täpsemalt parietaalsagarast, temporaalsagarast, frontaalsagarast ja hipokampusest.

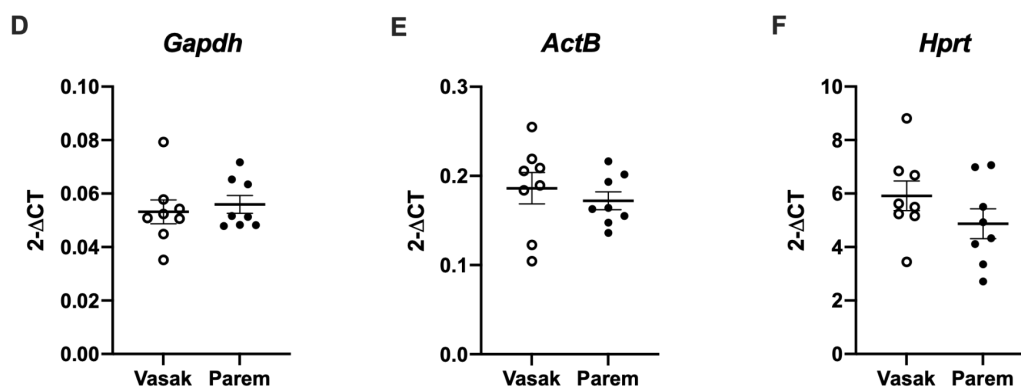
#### *Frontaalsagar*

Hiire frontaalsagara qPCR-i tulemusi analüüsid selgus, et *Tcf4* tase *Gapdh* suhtes oli paremal ajupoolkeral  $0,050 \pm 0,004$  ja vasakul ajupoolkeral  $0,048 \pm 0,004$  (Joonis 13A). *Tcf4\_tot* tase *Gapdh* suhtes oli paremal ajupoolkeral  $0,056 \pm 0,003$  ja vasakul ajupoolkeral  $0,053 \pm 0,004$  (Joonis 13D). *Tcf4* tase *ActB* suhtes oli paremal ajupoolkeral  $0,152 \pm 0,009$  vasakul ajupoolkeral  $0,167 \pm 0,015$  (Joonis 13B). *Tcf4\_tot* tase *ActB* suhtes oli paremal ajupoolkeral  $0,172 \pm 0,010$  ja vasakul ajupoolkeral  $0,186 \pm 0,018$  (Joonis 13E). *Tcf4* tase *Hprt* suhtes oli paremal ajupoolkeral  $4,247 \pm 0,396$  ja vasakul ajupoolkeral  $5,275 \pm 0,447$  (Joonis 13C). *Tcf4\_tot* tase *Hprt* suhtes oli paremal ajupoolkeral  $4,874 \pm 0,559$  ja vasakul ajupoolkeral  $5,915 \pm 0,555$  (Joonis 13F). Mann-Whitney testiga ei leitud ühtegi statistiliselt olulist erinevust *Tcf4* ega *Tcf4\_tot* ekspressioonis parema ja vasaku ajupoolkera vahel ( $p > 0,05$ ).

## Tcf4



## Tcf4\_tot

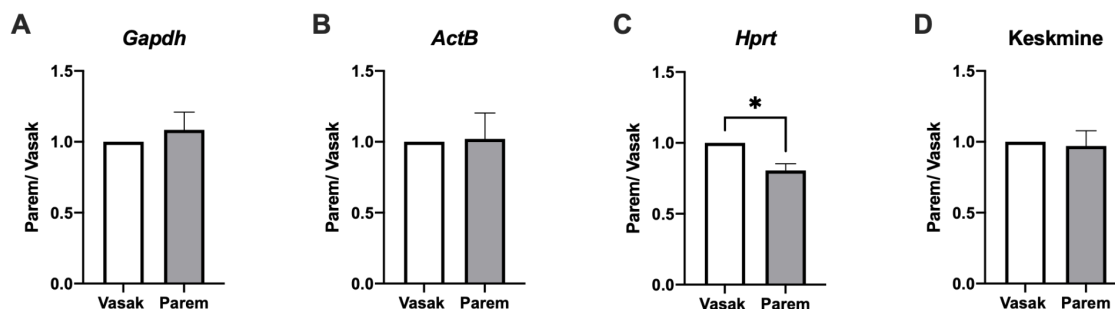


**Joonis 13.** Hiire *Tcf4* ekspressiooni tasemed parema ja vasaku ajupoolkera frontaalsagaras vastavate koduhoidjate suhtes. *Gapdh* (A, D), *ActB* (B, E) ja *Hprt* (C, F). *Tcf4* ekspressiooni võrdlemiseks parema ja vasaku ajupoolkera vahel arvutati qPCR-st saadud ct väärtuste põhjal  $2^{-\Delta CT}$ . Joonisel on näidatud iga hiire aju  $2^{-\Delta CT}$  tulemused vastava koduhoidja suhtes (n = 8 hiirt), tulemuste keskmine ja SEM. Ühtegi statistiliselt olulist erinevust parema ja vasaku ajupoolkera vahel ei leitud ( $p > 0,05$ ).

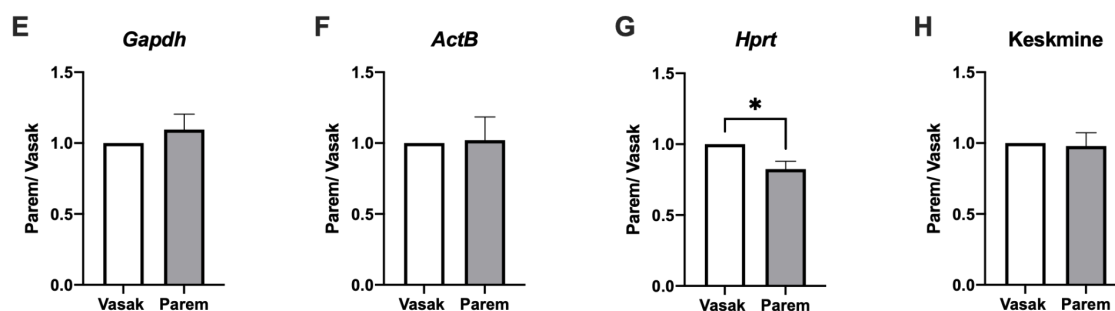
Kui hiire vasaku ajupoolkera frontaalsagar võrdsustati ühega, saadi järgnevad tulemused. *Tcf4* tase *Gapdh* suhtes paremas ajupoolkeras moodustas ~109% *Tcf4* tasemest vasakus ajupoolkeras (Joonis 14A). *Tcf4\_tot* tase *Gapdh* suhtes paremas ajupoolkeras moodustas ~110% *Tcf4\_tot* tasemest vasakus ajupoolkeras (Joonis 14E). *Tcf4* tase *ActB* suhtes paremas ajupoolkeras moodustas 102% *Tcf4* tasemest vasakus ajupoolkeras (Joonis 14B). *Tcf4\_tot* tase *ActB* suhtes paremas ajupoolkeras moodustas ~102% *Tcf4\_tot* tasemest vasakus ajupoolkeras (Joonis 14F). *Tcf4* tase *Hprt* suhtes paremas ajupoolkeras moodustas ~81% *Tcf4* tasemest vasakus ajupoolkeras (Joonis 14C). *Tcf4\_tot* tase *Hprt* suhtes paremas ajupoolkeras moodustas ~82% *Tcf4\_tot* tasemest vasakus ajupoolkeras (Joonis 14G). Keskmiselt *Tcf4* tase kõigi koduhoidjate suhtes paremas ajupoolkeras moodustas ~97% *Tcf4* tasemest vasakus ajupoolkeras (Joonis 14D). *Tcf4\_tot* tase kõigi koduhoidjate suhtes paremas ajupoolkeras moodustas ~98% *Tcf4\_tot*

tasemest vasakus ajupoolkeras (Joonis 14H). Wilcoxon'i testiga, mis tehti kõigile joonisel 14 välja toodud tulemustele, saadi statistiliselt olulised tulemused *Hprt*-ga – *Tcf4* korral  $p = 0,016$  ja *Tcf4\_tot* korral  $p = 0,039$ , mis näitasid, *Tcf4* on rohkem ekspresseerunud vasakul ajupoolkeral. Teiste koduhoidjatega ei saadud ühtegi statistiliselt olulist tulemust ( $p > 0,05$ ).

### ***Tcf4***



### ***Tcf4\_tot***



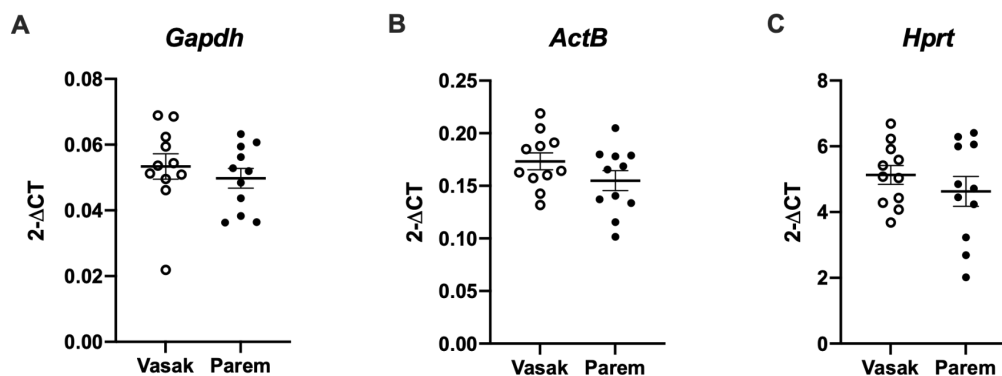
**Joonis 14. Hiire *Tcf4* ekspressiooni tasemete erinevus ajupoolkerade frontaalsagarates vastavate koduhoidjate suhtes, kui vasaku ajupoolkera tulemused võrdsustati ühega.** Joonisel on proovide ( $n = 8$  hiirt) keskmine vastava koduhoidja suhtes *Gapdh* (A, E), *ActB* (B, F) ja *Hprt* (C, G), kui vasak pool on võrdsustatud ühega ja võetud on parema poole suhe vasakusse. Lisaks on näidatud kolme praimerite keskmised tulemused (D, H). Välja on toodud SEM piirid. *Hprt*-ga saadi statistiliselt olulised tulemused ( $* p < 0,05$ ). Teiste koduhoidjatega ühtegi statistiliselt olulist erinevust parema ja vasaku ajupoolkera vahel ei leitud ( $p > 0,05$ ). Samuti ei olnud näha statistilist erinevust keskmiste tulemuste vahel.

### *Parietaalsagar*

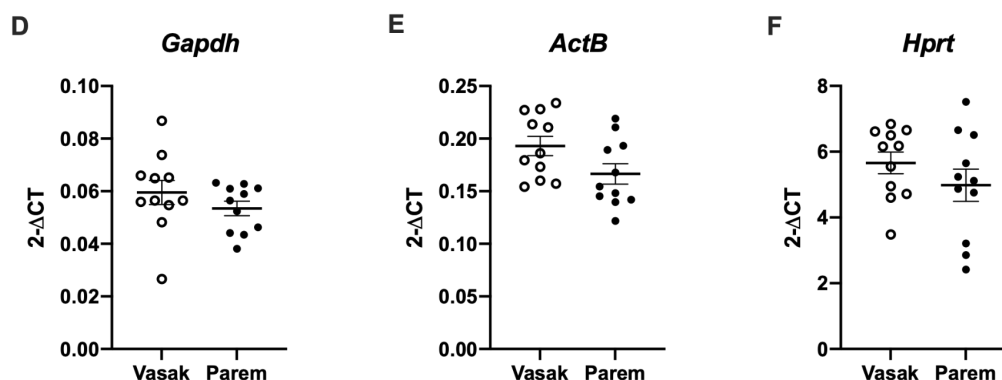
Esimesena analüüsiti hiire parietaalsagara qPCR tulemusi. *Tcf4* tase *Gapdh* suhtes oli paremal ajupoolkeral  $0,050 \pm 0,003$  SEM ja vasakul ajupoolkeral  $0,053 \pm 0,004$  (Joonis 9A). *Tcf4\_tot* tase *Gapdh* suhtes oli paremal ajupoolkeral  $0,054 \pm 0,003$  ja vasakul ajupoolkeral  $0,060 \pm 0,005$  (Joonis 9D). *Tcf4* tase *ActB* suhtes oli paremal ajupoolkeral  $0,155 \pm 0,009$  vasakul ajupoolkeral  $0,173 \pm 0,008$  (Joonis 9B). *Tcf4\_tot* tase *ActB* suhtes oli paremal ajupoolkeral  $0,167 \pm 0,010$  ja vasakul ajupoolkeral  $0,193 \pm 0,009$  (Joonis 9E). *Tcf4* tase *Hprt* suhtes oli paremal ajupoolkeral

4,630 ± 0,453 ja vasakul ajupoolkeral 5,130 ± 0,286 (Joonis 9C). *Tcf4\_tot* tase *Hprt* suhtes oli paremal ajupoolkeral 4,981 ± 0,490 ja vasakul ajupoolkeral 5,660 ± 0,327 (Joonis 9F). Mann-Whitney testiga ei leitud ühtegi statistiliselt olulist erinevust *Tcf4* ega *Tcf4\_tot* ekspressioonis parema ja vasaku ajupoolkera vahel ( $p > 0,05$ ).

### ***Tcf4***



### ***Tcf4\_tot***

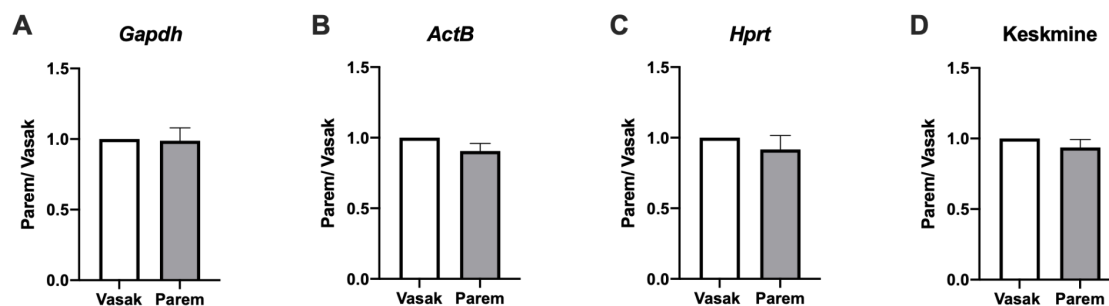


**Joonis 9. Hiire *Tcf4* ekspressiooni tasemed parema ja vasaku ajupoolkera parietaalsagaras vastavate koduhoidjate suhtes.** *Gapdh* (A, D), *ActB* (B, E) ja *Hprt* (C, F). *Tcf4* ekspressiooni võrdlemiseks parema ja vasaku ajupoolkera vahel arvutati qPCR-st saadud ct väärtuste põhjal  $2^{-\Delta CT}$ . Joonisel on näidatud iga hiire aju  $2^{-\Delta CT}$  tulemused vastava koduhoidja suhtes (n = 11 hiirt), tulemuste keskmine ja SEM. Ühtegi statistiliselt olulist erinevust parema ja vasaku ajupoolkera vahel ei leitud ( $p > 0,05$ ).

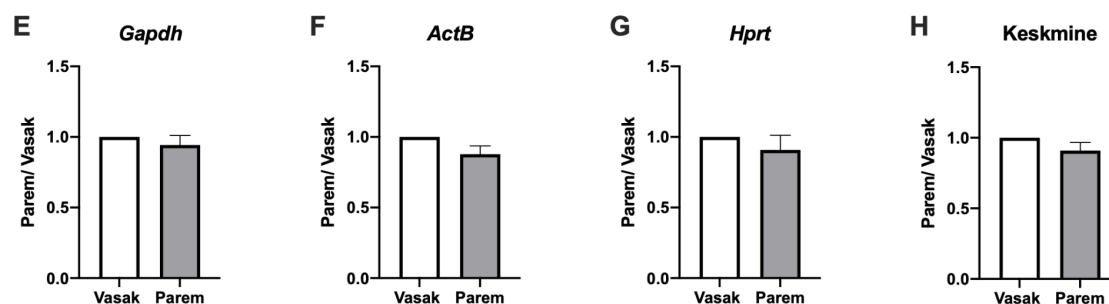
Kui hiire vasak ajupoolkera võrdsustati ühega, saadi järgnevad tulemused. *Tcf4* tase *Gapdh* suhtes paremas ajupoolkeras moodustas ~99% *Tcf4* tasemest vasakus ajupoolkeras (Joonis 10A). *Tcf4\_tot* tase *Gapdh* suhtes paremas ajupoolkeras moodustas ~94% *Tcf4\_tot* tasemest vasakus ajupoolkeras (Joonis 10E). *Tcf4* tase *ActB* suhtes paremas ajupoolkeras moodustas 91% *Tcf4* tasemest vasakus ajupoolkeras (Joonis 10B). *Tcf4\_tot* tase *ActB* suhtes paremas ajupoolkeras moodustas ~88% *Tcf4\_tot* tasemest vasakus ajupoolkeras (Joonis 10F). *Tcf4* tase *Hprt* suhtes paremas ajupoolkeras moodustas ~92% *Tcf4* tasemest vasakus ajupoolkeras (Joonis

10C). *Tcf4\_tot* tase *Hprt* suhtes paremas ajupoolkeras moodustas ~91% *Tcf4\_tot* tasemest vasakus ajupoolkeras (Joonis 10G). Keskmiselt *Tcf4* tase kõigi koduhoidjate suhtes paremas ajupoolkeras moodustas ~94% *Tcf4* tasemest vasakus ajupoolkeras (Joonis 10D). *Tcf4\_tot* tase kõigi koduhoidjate suhtes paremas ajupoolkeras moodustas ~91% *Tcf4\_tot* tasemest vasakus ajupoolkeras (Joonis 10H). Ka Wilcoxon'i testiga, mis tehti kõigile joonisel 10 välja toodud tulemustele, ei saadud ühtegi statistiliselt olulist tulemust ( $p > 0,05$ ).

### ***Tcf4***



### ***Tcf4\_tot***



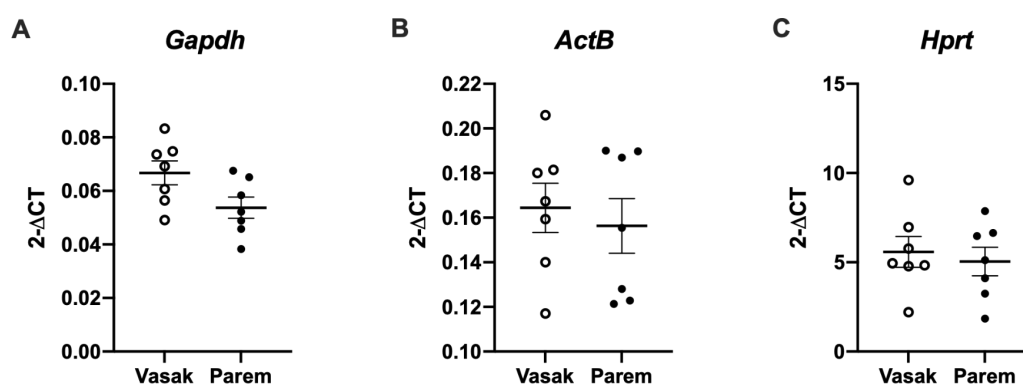
**Joonis 10. Hiire *Tcf4* ekspressiooni tasemete erinevus ajupoolkerade parietaalsagarates vastavate koduhoidjate suhtes, kui vasaku ajupoolkera tulemused võrdsustati ühega.** Joonisel on proovide ( $n = 11$  hiirt) keskmine vastava koduhoidja suhtes *Gapdh* (A, E), *ActB* (B, F) ja *Hprt* (C, G), kui vasak pool on võrdsustatud ühega ja võetud on parema poole suhe vasakusse. Lisaks on näidatud kolme praimerite keskmised tulemused (D, H). Välja on toodud SEM piirid. Ühtegi statistiliselt olulist erinevust parema ja vasaku ajupoolkera vahel ei leitud ( $p > 0,05$ ).

### *Temporaalsagar*

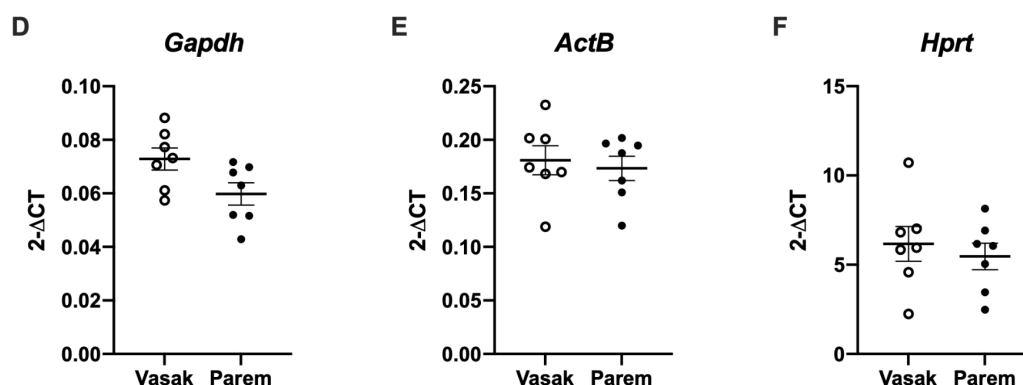
Järgmisena analüüsiti hiire temporaalsagara qPCR tulemusi. *Tcf4* tase *Gapdh* suhtes oli paremal ajupoolkeral  $0,054 \pm 0,004$  ja vasakul ajupoolkeral  $0,067 \pm 0,004$  (Joonis 11A). *Tcf4\_tot* tase *Gapdh* suhtes oli paremal ajupoolkeral  $0,060 \pm 0,004$  ja vasakul ajupoolkeral  $0,073 \pm 0,004$  (Joonis 11D). *Tcf4* tase *ActB* suhtes oli paremal ajupoolkeral  $0,156 \pm 0,012$  vasakul ajupoolkeral

0,164 ± 0,011 (Joonis 11B). *Tcf4\_tot* tase *ActB* suhtes oli paremal ajupoolkeral 0,173 ± 0,011 ja vasakul ajupoolkeral 0,181 ± 0,014 (Joonis 11E). *Tcf4* tase *Hprt* suhtes oli paremal ajupoolkeral 5,041 ± 0,801 ja vasakul ajupoolkeral 5,587 ± 0,862 (Joonis 11C). *Tcf4\_tot* tase *Hprt* suhtes oli paremal ajupoolkeral 5,465 ± 0,744 ja vasakul ajupoolkeral 6,170 ± 0,976 (Joonis 11F). Nagu ka teiste uuritud saagarate puhul ei leitud Mann-Whitney testiga ühtegi statistiliselt olulist erinevust *Tcf4* ega *Tcf4\_tot* ekspressioonis parema ja vasaku temporaalsagara vahel ( $p > 0,05$ ).

### *Tcf4*



### *Tcf4\_tot*

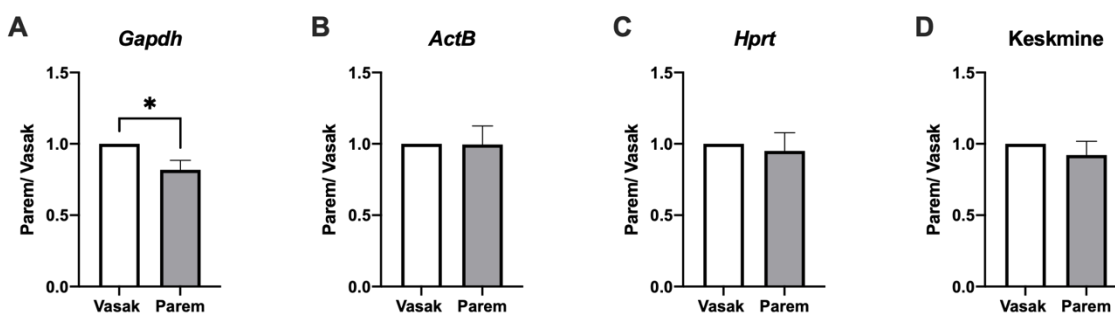


**Joonis 11. Hiire *Tcf4* ekspressiooni tasemed parema ja vasaku ajupoolkera temporaalsagaras vastavate koduhoidjate suhtes.** *Gapdh* (A, D), *ActB* (B, E) ja *Hprt* (C, F). *Tcf4* ekspressiooni võrdlemiseks parema ja vasaku ajupoolkera vahel arvutati qPCR-st saadud ct väärtuste põhjal  $2^{-\Delta CT}$ . Joonisel on näidatud iga hiire aju  $2^{-\Delta CT}$  tulemused vastava koduhoidja suhtes ( $n = 7$ ), tulemuste keskmine ja SEM. Ühtegi statistiliselt olulist erinevust parema ja vasaku ajupoolkera vahel ei leitud ( $p > 0,05$ ).

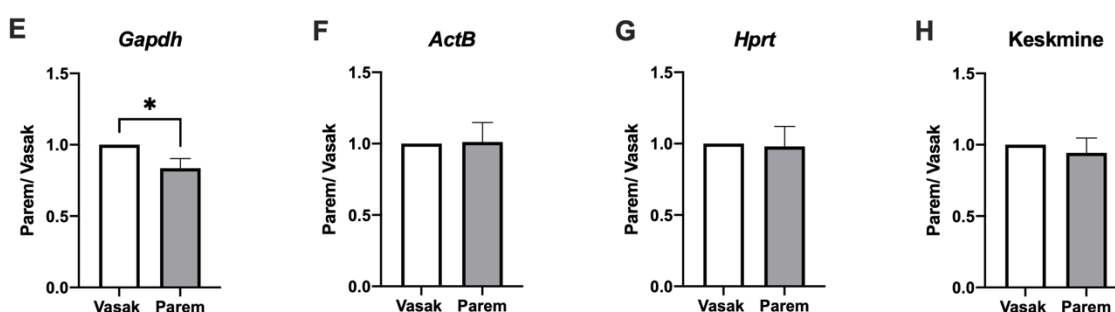
Kui hiire vasak ajupoolkera võrdsustati ühega, saadi järgnevad tulemused. *Tcf4* tase *Gapdh* suhtes paremas ajupoolkeras moodustas ~82% *Tcf4* tasemest vasakus ajupoolkeras (Joonis 12A). *Tcf4\_tot* tase *Gapdh* suhtes paremas ajupoolkeras moodustas ~84% *Tcf4\_tot* tasemest

vasakus ajupoolkeras (Joonis 12E). *Tcf4* tase *ActB* suhtes paremas ajupoolkeras moodustas ~99,5% *Tcf4* tasemest vasakus ajupoolkeras (Joonis 12B). *Tcf4\_tot* tase *ActB* suhtes paremas ajupoolkeras moodustas ~101% *Tcf4\_tot* tasemest vasakus ajupoolkeras (Joonis 12F). *Tcf4* tase *Hprt* suhtes paremas ajupoolkeras moodustas ~95% *Tcf4* tasemest vasakus ajupoolkeras (Joonis 12C). *Tcf4\_tot* tase *Hprt* suhtes paremas ajupoolkeras moodustas ~98% *Tcf4\_tot* tasemest vasakus ajupoolkeras (Joonis 12G). Keskmiselt *Tcf4* tase kõigi koduhoidjate suhtes paremas ajupoolkeras moodustas ~92% *Tcf4* tasemest vasakus ajupoolkeras (Joonis 12D). *Tcf4\_tot* tase kõigi koduhoidjate suhtes paremas ajupoolkeras moodustas ~94% *Tcf4\_tot* tasemest vasakus ajupoolkeras (Joonis 12H). Wilcoxon'i testiga, mis tehti kõigile joonisel 12 välja toodud tulemustele, saadi statistiliselt olulised tulemused *Gapdh*-ga – *Tcf4* korral  $p = 0,047$  ja *Tcf4\_tot* korral  $p = 0,031$ , mis näitavad, *Tcf4* on rohkem ekspresseerunud vasakul ajupoolkeral. Samas teiste koduhoidjatega ei saadud ühtegi statistiliselt olulist tulemust ( $p > 0,05$ ).

### ***Tcf4***



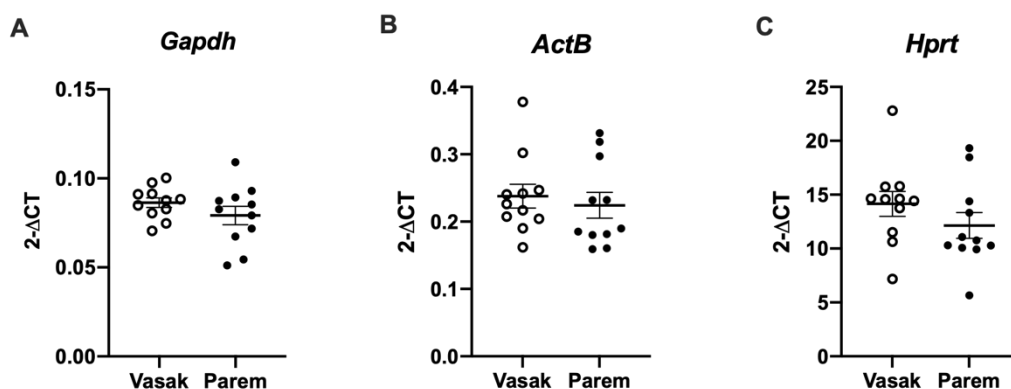
### ***Tcf4\_tot***



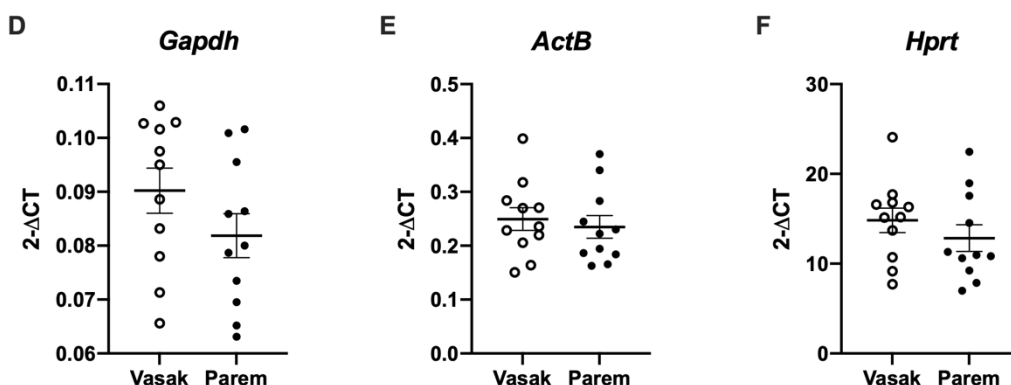
**Joonis 12. Hiire *Tcf4* ekspressiooni tasemete erinevus ajupoolkerade temporaalsagarates vastavate koduhoidjate suhtes, kui vasaku ajupoolkera tulemused võrdsustati ühega.** Joonisel on proovide ( $n = 7$ ) keskmine vastava koduhoidja suhtes *Gapdh* (A, E), *ActB* (B, F) ja *Hprt* (C, G), kui vasak pool on võrdsustatud ühega ja võetud on parema poole suhe vasakusse. Lisaks on näidatud kolme praimerit keskmised tulemused (D, H). Välja on toodud SEM piirid. *Gapdh*-ga saadi statistiliselt olulised tulemused (\*  $p < 0,05$ ). Teiste koduhoidjatega ühtegi statistiliselt olulist erinevust parema ja vasaku ajupoolkera vahel ei leitud ( $p > 0,05$ ). Samuti ei olnud näha statistilist erinevust keskmiste tulemuste vahel.

Hiire hipokampuse qPCR-i tulemusi analüüsid selgus, et *Tcf4* tase *Gapdh* suhtes oli paremal ajupoolkeral  $0,080 \pm 0,005$  ja vasakul ajupoolkeral  $0,086 \pm 0,003$  (Joonis 15A). *Tcf4\_tot* tase *Gapdh* suhtes oli paremal ajupoolkeral  $0,082 \pm 0,004$  ja vasakul ajupoolkeral  $0,090 \pm 0,004$  (Joonis 15D). *Tcf4* tase *ActB* suhtes oli paremal ajupoolkeral  $0,225 \pm 0,019$  vasakul ajupoolkeral  $0,238 \pm 0,018$  (Joonis 15B). *Tcf4\_tot* tase *ActB* suhtes oli paremal ajupoolkeral  $0,234 \pm 0,021$  ja vasakul ajupoolkeral  $0,250 \pm 0,021$  (Joonis 15E). *Tcf4* tase *Hprt* suhtes oli paremal ajupoolkeral  $12,379 \pm 1,203$  ja vasakul ajupoolkeral  $14,148 \pm 1,164$  (Joonis 15C). *Tcf4\_tot* tase *Hprt* suhtes oli paremal ajupoolkeral  $12,986 \pm 1,484$  ja vasakul ajupoolkeral  $14,830 \pm 1,363$  (Joonis 15F). Mann-Whitney testiga ei leitud ühtegi statistiliselt olulist erinevust *Tcf4* ega *Tcf4\_tot* ekspressioonis parema ja vasaku ajupoolkera vahel ( $p > 0,05$ ).

### *Tcf4*



### *Tcf4\_tot*

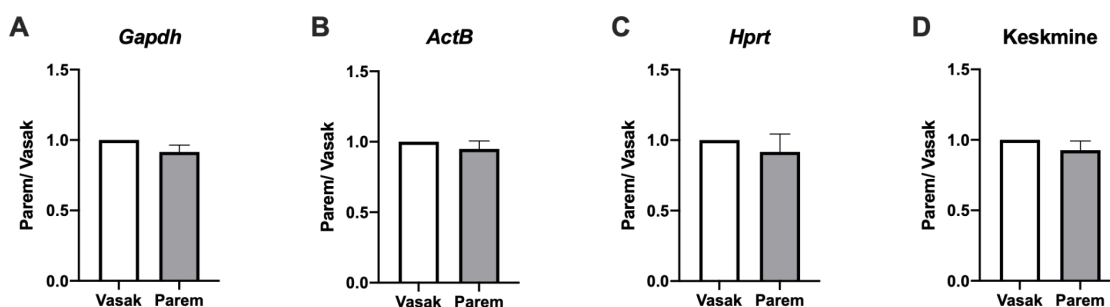


**Joonis 15.** Hiire *Tcf4* ekspressiooni tasemed parema ja vasaku ajupoolkera hipokampuses vastavate koduhoidjate suhtes. *Gapdh* (A, D), *ActB* (B, E) ja *Hprt* (C, F). *Tcf4* ekspressiooni võrdlemiseks parema ja vasaku ajupoolkera vahel arvutati qPCR-st saadud ct väärtuste põhjal  $2^{-\Delta CT}$ . Joonisel on näidatud iga hiire aju  $2^{-\Delta CT}$  tulemused vastava koduhoidja suhtes (n = 11),

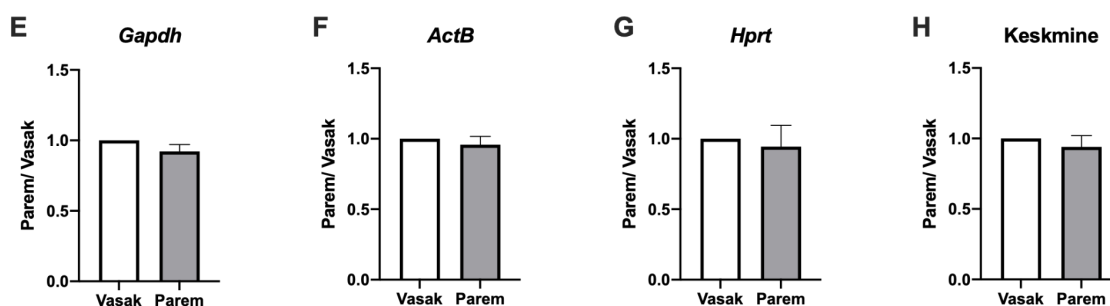
tulemuste keskmine ja SEM. Ühtegi statistiliselt olulist erinevust parema ja vasaku ajupoolkera vahel ei leitud ( $p > 0,05$ ).

Kui hiire vasak ajupoolkera võrdsustati ühega, saadi järgnevad tulemused. *Tcf4* tase *Gapdh* suhtes paremas ajupoolkeras moodustas ~92% *Tcf4* tasemest vasakus ajupoolkeras (Joonis 16A). *Tcf4\_tot* tase *Gapdh* suhtes paremas ajupoolkeras moodustas ~92% *Tcf4\_tot* tasemest vasakus ajupoolkeras (Joonis 16E). *Tcf4* tase *ActB* suhtes paremas ajupoolkeras moodustas ~95% *Tcf4* tasemest vasakus ajupoolkeras (Joonis 16B). *Tcf4\_tot* tase *ActB* suhtes paremas ajupoolkeras moodustas ~96% *Tcf4\_tot* tasemest vasakus ajupoolkeras (Joonis 16F). *Tcf4* tase *Hprt* suhtes paremas ajupoolkeras moodustas ~92% *Tcf4* tasemest vasakus ajupoolkeras (Joonis 16C). *Tcf4\_tot* tase *Hprt* suhtes paremas ajupoolkeras moodustas ~94% *Tcf4\_tot* tasemest vasakus ajupoolkeras (Joonis 16G). Keskmiselt *Tcf4* tase kõigi koduhoidjate suhtes paremas ajupoolkeras moodustas ~93% *Tcf4* tasemest vasakus ajupoolkeras (Joonis 16D). *Tcf4\_tot* tase kõigi koduhoidjate suhtes paremas ajupoolkeras moodustas ~94% *Tcf4\_tot* tasemest vasakus ajupoolkeras (Joonis 16H). Ka Wilcoxon'i testiga, mis tehti kõigile joonisel 15 välja toodud tulemustele, ei saadud ühtegi statistiliselt olulist tulemust ( $p > 0,05$ ).

### ***Tcf4***



### ***Tcf4\_tot***



**Joonis 16. Hiire *Tcf4* ekspressiooni tasemete erinevus ajupoolkerade hipokampustes vastavate koduhoidjate suhtes, kui vasaku ajupoolkera tulemused võrdsustati ühega.** Joonisel on proovide ( $n = 11$ ) keskmine vastava koduhoidja suhtes *Gapdh* (A, E), *ActB* (B, F) ja *Hprt* (C, G), kui vasak pool on võrdsustatud ühega ja võetud on parema poole suhe vasakusse.

Lisaks on näidatud kolme praimerite keskmised tulemused (D, H). Välja on toodud SEM piirid. Ühtegi statistiliselt olulist erinevust parema ja vasaku ajupoolkera vahel ei leitud ( $p > 0,05$ ).

Kirjeldavas tabelis 3 on ülevahtlikult näha hiirte qPCR tulemuste jaotumine *Tcf4* ekspressiooni alusel.

**Tabel 3. Kirjeldav tabel qPCR tulemustest hiirel.**

Ajupiirkond	n	Koduhoidja	Vasakul kõrgem <i>Tcf4</i> ekspressioon (n)	Paremal kõrgem <i>Tcf4</i> ekspressioon (n)	Vasakul kõrgem <i>Tcf4</i> ekspressioon kõigist (%)	Vasakul kõrgem <i>Tcf4_tot</i> ekspressioon (n)	Paremal kõrgem <i>Tcf4_tot</i> ekspressioon (n)	Vasakul kõrgem <i>Tcf4_tot</i> ekspressioon kõigist (%)
Frontaalsagar (hiir)	8	<i>Gapdh</i>	1	7	12,5	2	6	25
		<i>ActB</i>	3	5	37,5	3	5	37,5
		<i>Hprt*</i>	4	4	50	4	4	50
Parietaalsagar (hiir)	11	<i>Gapdh</i>	8	3	73	8	3	73
		<i>ActB</i>	7	4	64	8	3	73
		<i>Hprt</i>	6	5	55	5	6	45
Temporaalsagar (hiir)	7	<i>Gapdh*</i>	6	1	86	6	1	86
		<i>ActB</i>	3	4	43	4	3	57
		<i>Hprt</i>	4	3	57	3	4	43
Hipokampus (hiir)	11	<i>Gapdh</i>	8	3	73	6	5	55
		<i>ActB</i>	9	2	82	8	3	73
		<i>Hprt</i>	9	2	82	8	3	73

Tabel näitab katseloomade (hiirte) arvu igas uuritud ajupiirkonnas ja toob välja, kui suure osakaalu moodustavad hiired, kellel oli *Tcf4* tase kõrgem vasakus ajupoolkeras. Tärniga on tähistatud koduhoidjad, mille puhul esines statistiliselt oluline erinevus parema ja vasaku ajupoolkera *Tcf4* ekspressioonis.

### 2.3.2 *TCF4* ekspressiooni analüüsi tulemused inimesel

Lisaks hiirele mõõdeti ka inimesel *TCF4* suhtelist mRNA ekspressiooni paremas ja vasakus ajupoolkeras, et teada saada, kas ja mil määral erineb transkriptsioonifaktor TCF4 tase erinevate ajupoolkerade piirkondade (frontaalsagar, hipokampus) vahel. qPCR analüüsil kasutati nelja erinevat koduhoidja geeni (*GAPDH*, *ACTB*, *HPRT*, *TBP*) ja kahte erinevat *TCF4* geeni praimeripaari (*TCF4\_long*, *TCF4\_tot*) peatükis 2.2.3 ja 2.2.4 kirjeldatud meetodite järgi.

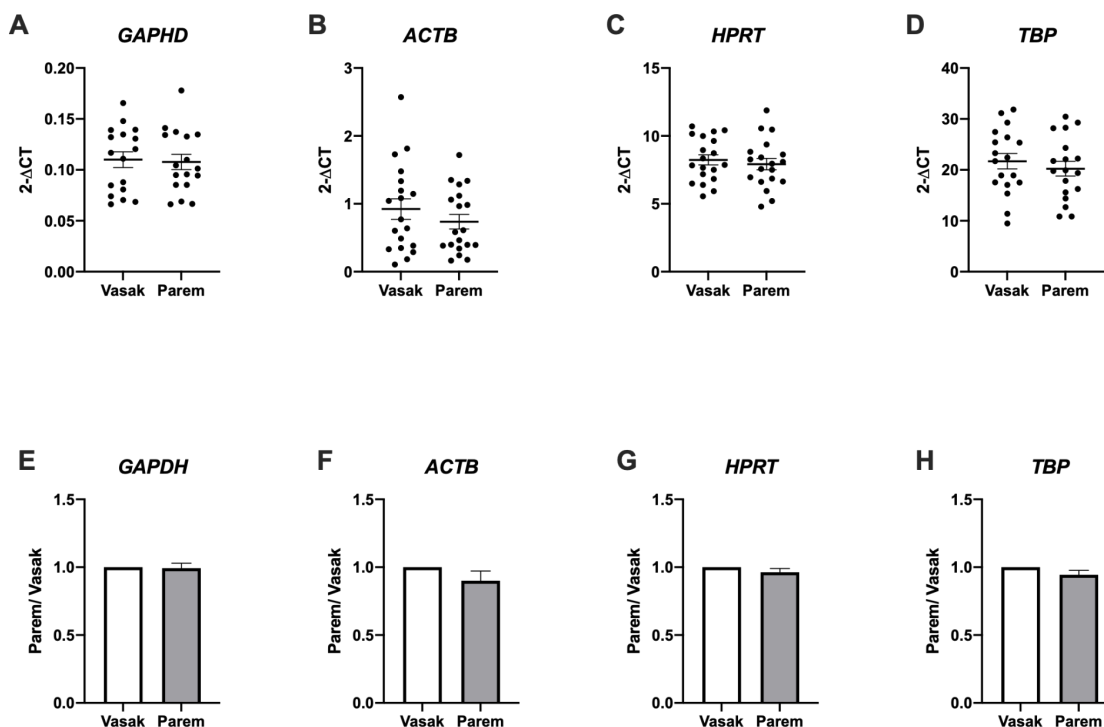
#### *Frontaalsagar*

Tartu Ülikooli füsioloogia osakonnas olid juba varasemast olemas qPCRi andmed frontaalsagarast, mida ei olnud siiani põhjalikult analüüsitud ega publitseeritud. Nende andmete saamiseks kasutati *TCF4\_tot* praimeripaari ning nelja koduhoidjat *GAPDH*, *ACTB*, *HPRT* ja *TBP*. Selle uurimistöo raames tehti nendele qPCRi andmetele põhjalik statistiline analüüs. Toorandmetel kasutati Mann-Whitney testi, üheks kalibreeritud tulemuste korral Wilcoxon testi, et leida, kas parema ja vasaku ajupoolkera tulemuste vahel esineb statistiliselt olulist erinevust.

qPCR tulemuste analüüsil leiti, et *TCF4\_tot* tase *GAPDH* suhtes oli paremal ajupoolkeral  $0,108 \pm 0,008$  ja vasakul ajupoolkeral  $0,110 \pm 0,008$  (Joonis 17A). *TCF4\_tot* tase *ACTB* suhtes oli paremal ajupoolkeral  $0,736 \pm 0,108$  ja vasakul ajupoolkeral  $0,923 \pm 0,151$  (Joonis 17B). *TCF4\_tot* tase *HPRT* suhtes oli paremal ajupoolkeral  $7,925 \pm 0,418$  ja vasakul ajupoolkeral  $8,237 \pm 0,324$  (Joonis 17C). *TCF4\_tot* tase *TBP* suhtes oli paremal ajupoolkeral  $20,228 \pm 1,461$  ja vasakul ajupoolkeral  $21,692 \pm 1,516$  (Joonis 17D). Mann-Whitney testiga ei selgunud ühtegi statistiliselt olulist erinevust *TCF4\_tot* ekspressioonis parema ja vasaku ajupoolkera vahel ( $p > 0,05$ ).

Kui inimese vasaku frontaalsagara tulemused võrdsustati ühega, saadi järgnevad tulemused. *TCF4\_tot* tase *GAPDH* suhtes paremas ajupoolkeras moodustas ~99% *TCF4\_tot* tasemest vasakus ajupoolkeras (Joonis 17E). *TCF4\_tot* tase *ACTB* suhtes paremas ajupoolkeras moodustas ~90% *Tcf4\_tot* tasemest vasakus ajupoolkeras (Joonis 17F). *TCF4\_tot* tase *HPRT* suhtes paremas ajupoolkeras moodustas ~96% *TCF4\_tot* tasemest vasakus ajupoolkeras (Joonis 17G). *TCF4\_tot* tase *TBP* suhtes paremas ajupoolkeras moodustas ~94% *TCF4\_tot* tasemest vasakus ajupoolkeras (Joonis 17H). *TFC4\_tot* tase kõigi koduhoidjate suhtes paremas ajupoolkeras moodustas ~94% *TCF4\_tot* tasemest vasakus ajupoolkeras. Wilcoxon testiga, mis tehti kõigile joonisel 17 (E-H) välja toodud tulemustele, ei saadud ühtegi statistiliselt olulist tulemust ( $p > 0,05$ ).

## TCF4\_tot



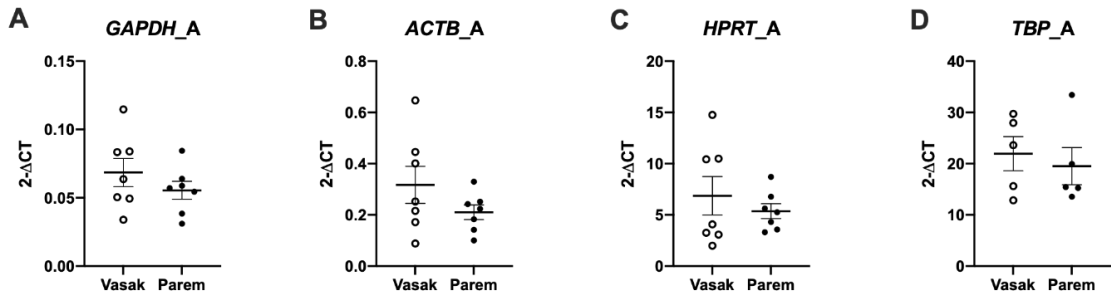
**Joonis 17.** Inimese *TCF4* ekspressiooni tasemed parema ja vasaku ajupoolkera frontaalsagaras vastavate koduhoidjate suhtes ja ekspressiooni tasemete erinevus, kui vasaku ajupoolkera tulemused võrdsustati ühega. *GAPDH* (A, E, n = 17), *ACTB* (B, F, n = 19) ja *HPRT* (C, G, n = 19), *TBP* (D, H, n = 18). *TCF4* ekspressiooni võrdlemiseks parema ja vasaku ajupoolkera vahel arvutati qPCR-st saadud ct väärtuste põhjal  $2^{-\Delta CT}$  (A-D). Seejärel võrdsustati vasaku ajupoolkera tulemused ühega ja võeti parema poole suhe vasakusse (E-H). Joonisel on näidatud iga inimese aju tulemused vastava koduhoidja suhtes, tulemuste keskmine ja SEM. Ühtegi statistiliselt olulist erinevust parema ja vasaku ajupoolkera vahel ei leitud ( $p > 0,05$ ).

### Hipokampus

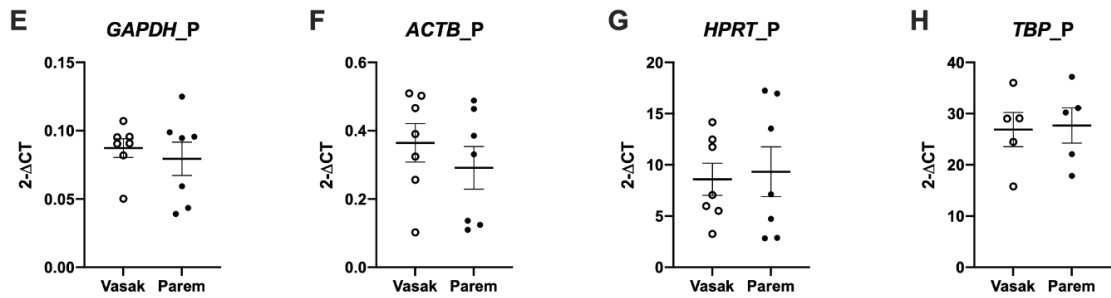
Inimese hipokampuse qPCR oli teostatud alguses lõpuni selle uurimistöö raames. Tulemusi analüüsid selgus, et *TCF4\_long* tase *GAPDH* suhtes oli paremal anterioorsel hipokampusel  $0,055 \pm 0,007$ , vasakul anterioorsel  $0,069 \pm 0,010$  (Joonis 18A) ja paremal posterioorsel hipokampusel  $0,079 \pm 0,012$ , vasakul posterioorsel  $0,087 \pm 0,007$  (Joonis 18E). *TCF4\_tot* tase *GAPDH* suhtes oli paremal anterioorsel hipokampusel  $0,071 \pm 0,008$ , vasakul anterioorsel  $0,078 \pm 0,125$  (Joonis 18I) ja paremal posterioorsel hipokampusel  $0,090 \pm 0,009$ , vasakul posterioorsel  $0,095 \pm 0,125$  (Joonis 18M). *TCF4\_long* tase *ACTB* suhtes oli paremal anterioorsel hipokampusel  $0,210 \pm 0,029$ , vasakul anterioorsel  $0,317 \pm 0,072$  (Joonis 18B) ja paremal posterioorsel hipokampusel  $0,291 \pm 0,062$ , vasakul posterioorsel  $0,364 \pm 0,056$  (Joonis

18F). *TCF4\_tot* tase *ACTB* suhtes oli paremal anterioorsel hipokampusel  $0,265 \pm 0,036$ , vasakul anterioorsel  $0,864 \pm 0,148$  (Joonis 18J) ja paremal posterioorsel hipokampusel  $0,321 \pm 0,054$ , vasakul posterioorsel  $0,848 \pm 0,134$  (Joonis 18N). *TCF4\_long* tase *HPRT* suhtes oli paremal anterioorsel hipokampusel  $5,366 \pm 0,721$ , vasakul anterioorsel  $6,866 \pm 1,871$  (Joonis 18C) ja paremal posterioorsel hipokampusel  $9,326 \pm 2,433$ , vasakul posterioorsel  $8,596 \pm 1,566$  (Joonis 18G). *TCF4\_tot* tase *HPRT* suhtes oli paremal anterioorsel hipokampusel  $6,646 \pm 0,593$  ja vasakul anterioorsel  $7,285 \pm 1,385$  (Joonis 18K) ja paremal posterioorsel hipokampusel  $10,082 \pm 2,193$ , vasakul posterioorsel  $9,208 \pm 1,173$  (Joonis 18O). *TCF4\_long* tase *TBP* suhtes paremal anterioorsel hipokampusel  $19,515 \pm 3,632$  vasakul anterioorsel  $21,945 \pm 3,337$  (Joonis 18D) ja paremal posterioorsel hipokampusel  $27,688 \pm 3,438$  ja vasakul posterioorsel  $26,877 \pm 3,327$  (Joonis 18H). *TCF4\_tot* tase *TBP* suhtes oli paremal anterioorsel hipokampusel  $25,174 \pm 4,593$ , vasakul anterioorsel  $26,266 \pm 2,627$  (Joonis 18L) ja paremal posterioorsel hipokampusel  $32,614 \pm 1,418$ , vasakul posterioorsel  $30,959 \pm 3,507$  (Joonis 18P). Mann-Whitney testiga ei leitud ühtegi statistiliselt olulist erinevust *TCF4\_long* ega *TCF4\_tot* ekspressioonis parema ja vasaku ajupoolkera vahel ( $p > 0,05$ ).

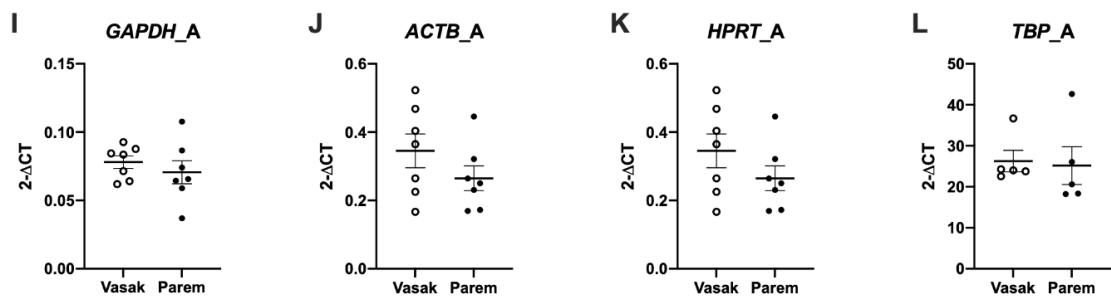
### TCF4\_long



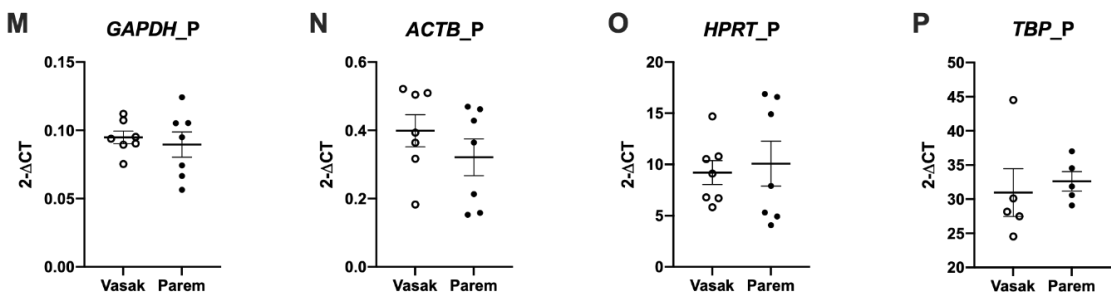
### TCF4\_long



### TCF4\_tot



### TCF4\_tot



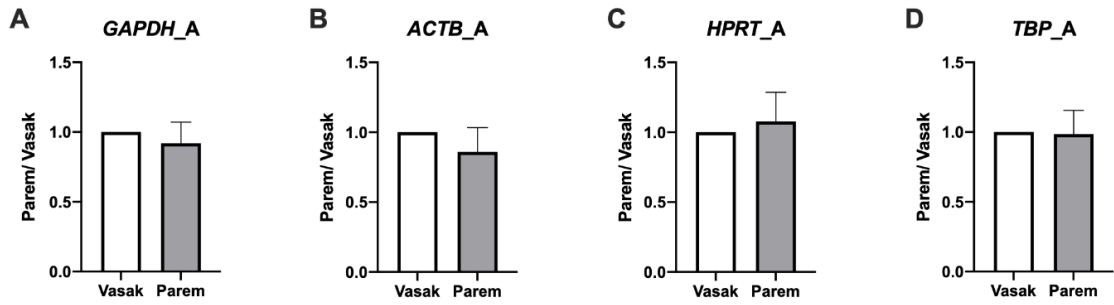
Joonis 18. Inimese *TCF4* ekspressiooni tasemed parema ja vasaku ajupoolkera anterioorsetes ja posterioorsetes hipokampustes vastavate koduhoidjate suhtes. *GAPDH* (A, E, I, M), *ACTB* (B, F, J, N), *HPRT* (C, G, K, O) ja *TBP* (D, H, L, P). *TCF4* ekspressiooni võrdlemiseks parema ja vasaku ajupoolkera vahel arvutati qPCR-st saadud ct väärtuste põhjal

$2^{-\Delta CT}$ . Joonisel on näidatud iga inimese aju  $2^{-\Delta CT}$  tulemused vastava koduhoidja suhtes ( $n = 7$ , *TBP* puhul  $n = 5$ ), tulemuste keskmine ja SEM. Ühtegi statistiliselt olulist erinevust parema ja vasaku ajupoolkera vahel ei leitud ( $p > 0,05$ ).

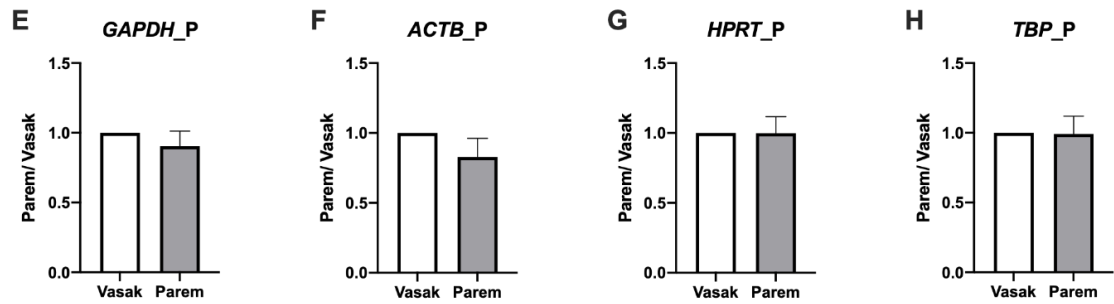
Kui inimese vasaku ajupoolkera hipokampuse tulemused võrdsustati ühega, saadi järgnevad tulemused. *TCF4\_long* tase *GAPDH* suhtes paremas anterioorses hipokampuses moodustas ~92% *TCF4\_long* tasemest vasakus anterioorses hipokampuses (Joonis 19A). *TCF4\_long* tase *GAPDH* suhtes paremas posterioorses hipokampuses moodustas ~90% *TCF4\_long* tasemest vasakus posterioorses hipokampuses (Joonis 19E). *TCF4\_tot* tase *GAPDH* suhtes paremas anterioorses hipokampuses moodustas ~93% *TCF4\_tot* tasemest vasakus anterioorses hipokampuses (Joonis 19I). *TCF4\_tot* tase *GAPDH* suhtes paremas posterioorses hipokampuses moodustas ~97% *TCF4\_tot* tasemest vasakus posterioorses hipokampuses (Joonis 19M). *TCF4\_long* tase *ACTB* suhtes paremas anterioorses hipokampuses moodustas ~86% *TCF4\_long* tasemest vasakus anterioorses hipokampuses (Joonis 19B). *TCF4\_long* tase *ACTB* suhtes paremas posterioorses hipokampuses moodustas ~83% *TCF4\_long* tasemest vasakus posterioorses hipokampuses (Joonis 19F). *TCF4\_tot* tase *ACTB* suhtes paremas anterioorses hipokampuses moodustas ~86% *TCF4\_tot* tasemest vasakus anterioorses hipokampuses (Joonis 19J). *TCF4\_tot* tase *ACTB* suhtes paremas posterioorses hipokampuses moodustas ~85% *TCF4\_tot* tasemest vasakus posterioorses hipokampuses (Joonis 19N). *TCF4\_long* tase *HPRT* suhtes paremas anterioorses hipokampuses moodustas ~108% *TCF4\_long* tasemest vasakus anterioorses hipokampuses (Joonis 19C). *TCF4\_long* tase *HPRT* suhtes paremas posterioorses hipokampuses moodustas ~99,8% *TCF4\_long* tasemest vasakus posterioorses hipokampuses (Joonis 19G). *TCF4\_tot* tase *HPRT* suhtes paremas anterioorses hipokampuses moodustas ~109% *TCF4\_tot* tasemest vasakus anterioorses hipokampuses (Joonis 19K). *TCF4\_tot* tase *HPRT* suhtes paremas posterioorses hipokampuses moodustas ~105% *TCF4\_tot* tasemest vasakus posterioorses hipokampuses (Joonis 19O). *TCF4\_long* tase *TBP* suhtes paremas anterioorses hipokampuses moodustas ~91% *TCF4\_long* tasemest vasakus anterioorses hipokampuses (Joonis 19D). *TCF4\_long* tase *TBP* suhtes paremas posterioorses hipokampuses moodustas ~107% *TCF4\_long* tasemest vasakus posterioorses hipokampuses (Joonis 19H). *TCF4\_tot* tase *TBP* suhtes paremas anterioorses hipokampuses moodustas ~94% *TCF4\_tot* tasemest vasakus anterioorses hipokampuses (Joonis 19L). *TCF4\_tot* tase *TBP* suhtes paremas posterioorses hipokampuses moodustas ~111% *TCF4\_tot* tasemest vasakus posterioorses hipokampuses (Joonis 19P). Keskmiselt *TCF4\_long* tase kõigi koduhoidjate suhtes paremas anterioorses hipokampuses moodustas ~99% *TCF4\_long* tasemest vasakus anterioorses hipokampuses (Joonis 20A). Keskmiselt *TCF4\_long* tase kõigi koduhoidjate suhtes paremas posterioorses hipokampuses moodustas ~99% *TCF4\_long* tasemest vasakus

posterioorses hipokampuses (Joonis 20B). *TCF4\_tot* tase kõigi koduhoidjate suhtes paremas anterioorses hipokampuses moodustas ~99% *TFC4\_tot* tasemest vasakus anterioorses hipokampuses (Joonis 20C). *TCF4\_tot* tase kõigi koduhoidjate suhtes paremas posterioorses hipokampuses moodustas ~103% *TFC4\_tot* tasemest vasakus posterioorses hipokampuses (Joonis 20D). Ka Wilcoxon'i testiga, mis tehti kõigile joonistel 19 ja 20 välja toodud tulemustele, ei saadud ühtegi statistiliselt olulist tulemust ( $p > 0,05$ ).

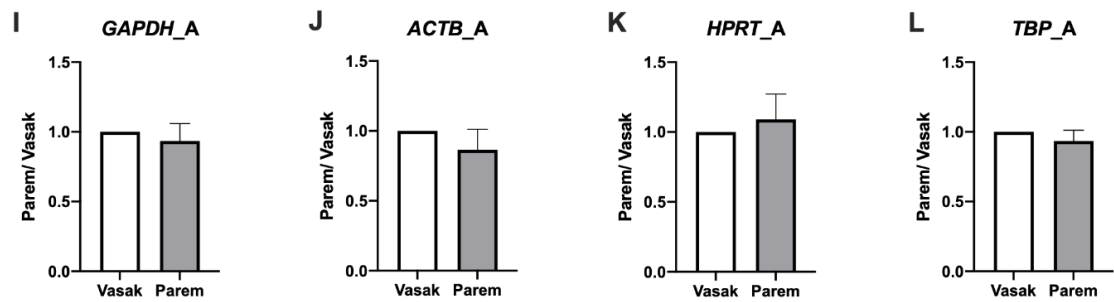
### *TCF4<sub>long</sub>*



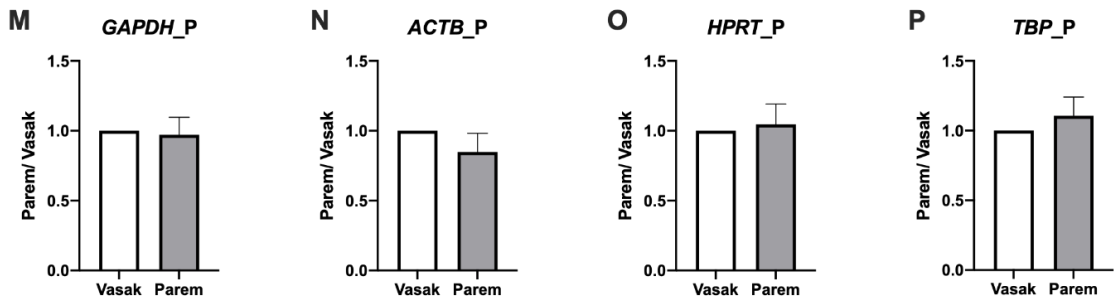
### *TCF4<sub>long</sub>*



### *TCF4<sub>tot</sub>*



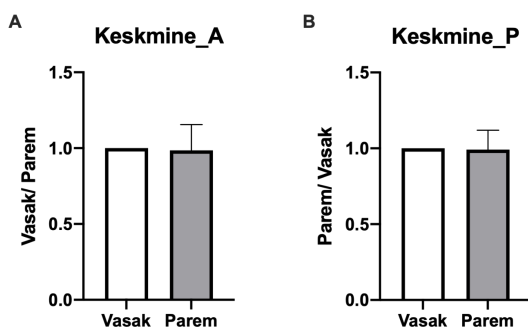
### *TCF4<sub>tot</sub>*



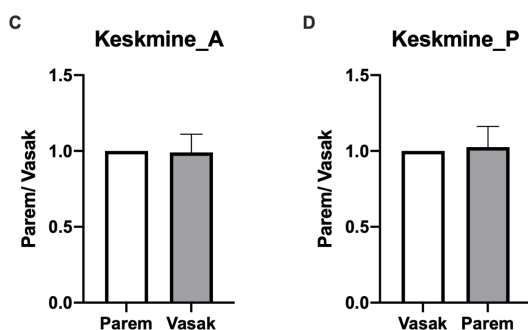
Joonis 19. Inimese *TCF4* ekspressiooni taseme erinevus ajupoolkerade anteriorsetes ja posteriorsetes hipokampustes vastavate koduhoidjate suhtes, kui vasaku ajupoolkera tulemused võrdsustati ühega. Joonisel on proovide ( $n = 7$ , *TBP* puhul  $n = 5$ ) keskmine vastava koduhoidja suhtes *GAPDH* (A, E, I, M), *ACTB* (B, F, J, N), *HPRT* (C, G, K, O) ja *TBP* (D, H, L, P), kui vasak pool on võrdsustatud ühega ja võetud on parema poole suhe vasakusse. A – anteriorne, P – posteriorne osa hipokampusest. Välja on toodud SEM piirid. Ühtegi

statistiliselt olulist erinevust parema ja vasaku ajupoolkera *TCF4* ekspressiooni vahel ei leitud ( $p > 0,05$ ).

### *TCF4\_long*



### *TCF4\_tot*



**Joonis 20.** Inimese *TCF4* ekspressiooni keskmine taseme erinevus ajupoolkerade anteriorsetes ja posterioorsetes hipokampustes vastavate koduhoidjate suhtes, kui vasaku ajupoolkera tulemused võrdsustati ühega. Joonisel on näidatud nelja praimerit (*GAPDH*, *ACTB*, *HPRT*, *TBP*) keskmine tulemus *TCF4\_long* (A,B) ja *TCF4\_tot* (C, D) puhul, kui vasak pool on võrdsustatud ühega ja võetud on parema poole suhe vasakusse. A – anteriorne, P – posterioorne osa hipokampusest. Välja on toodud SEM piirid. Ühtegi statistiliselt olulist erinevust parema ja vasaku ajupoolkera vahel ei leitud ( $p > 0,05$ ).

Kirjeldavas tabelis 4 on näha arvuliselt katseisikute jaotumine *TCF4* ekspressiooni alusel, mis annab ehk parema ülevaate qPCR-i tulemustest inimesel.

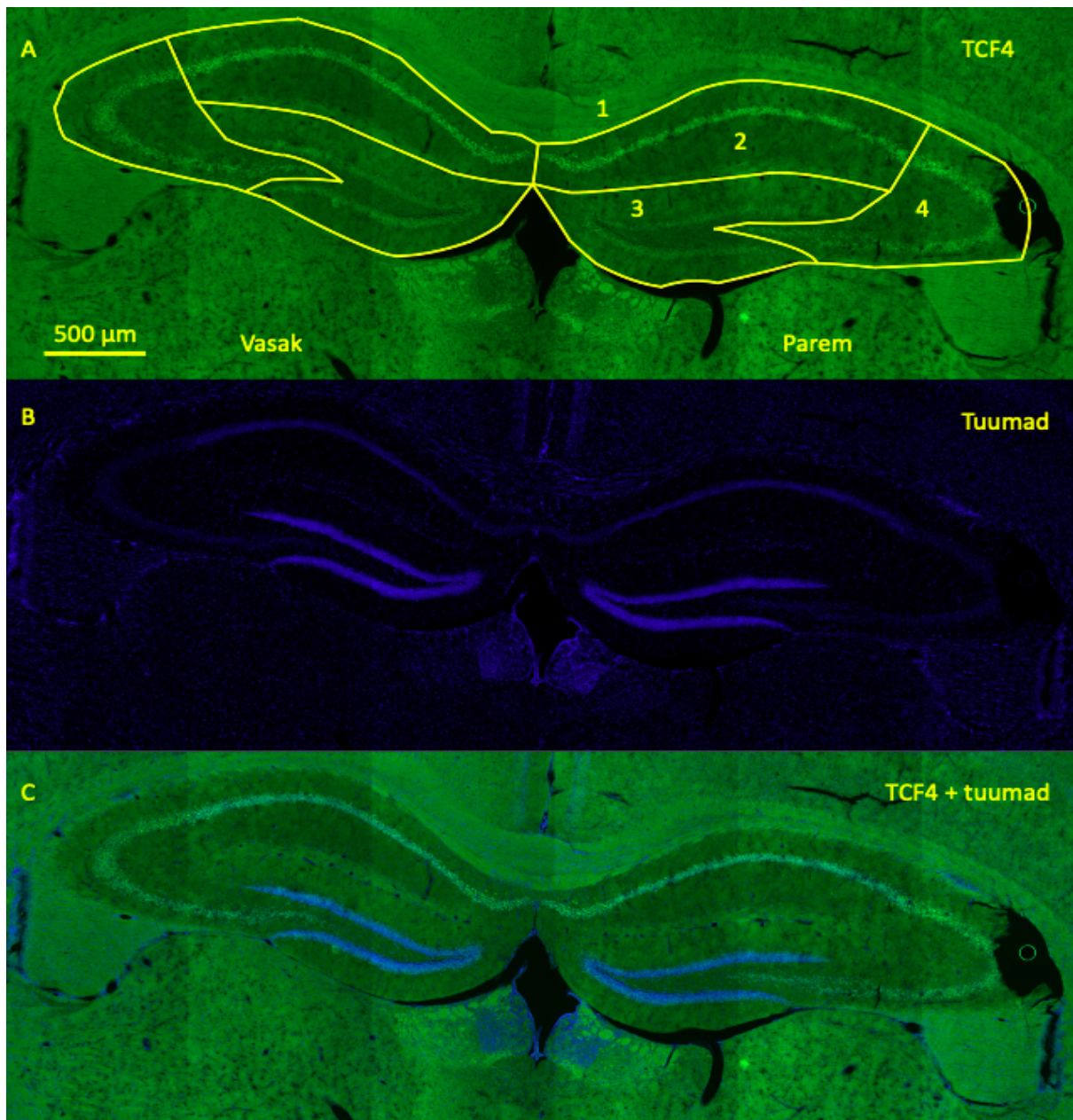
**Tabel 4. Kirjeldav tabel qPCR tulemustest inimesel.**

Ajupiirkond	n	Koduhoidja	Vasakul kõrgem <i>TCF4_long</i> ekspressioon (n)	Paremal kõrgem <i>TCF4_long</i> ekspressioon (n)	Vasakul kõrgem <i>TCF4_long</i> ekspressioon kõigist (%)	Vasakul kõrgem <i>TCF4_tot</i> ekspressioon (n)	Paremal kõrgem <i>TCF4_tot</i> ekspressioon (n)	Vasakul kõrgem <i>TCF4_tot</i> ekspressioon kõigist (%)
Frontaalsagar (inimene)	17	<i>GAPDH</i>	N/A	N/A	N/A	8	9	47
	19	<i>ACTB</i>	N/A	N/A	N/A	13	6	68
	19	<i>HPRT</i>	N/A	N/A	N/A	14	5	74
	18	<i>TBP</i>	N/A	N/A	N/A	11	7	61
Anterioorne hipokampus (inimene)	7 ( <i>TBP</i> - 5)	<i>GAPDH</i>	3	4	43	3	4	43
		<i>ACTB</i>	4	3	57	4	3	57
		<i>HPRT</i>	3	4	43	3	4	43
		<i>TBP</i>	3	2	60	2	3	40
Posterioorne hipokampus (inimene)	7 ( <i>TBP</i> - 5)	<i>GAPDH</i>	4	3	57	4	3	57
		<i>ACTB</i>	5	2	71	4	3	57
		<i>HPRT</i>	3	4	43	3	4	43
		<i>TBP</i>	1	4	20	2	3	40

Tabel näitab indiviidide (inimeste) arvu igas uuritud ajupiirkonnas ja toob välja, kui suure osakaalu moodustavad indiviidid, kellel oli *TCF4* tase kõrgem vasakus ajupoolkeras.

### 2.3.3 Hiire immunohistokeemilise analüüsi tulemused

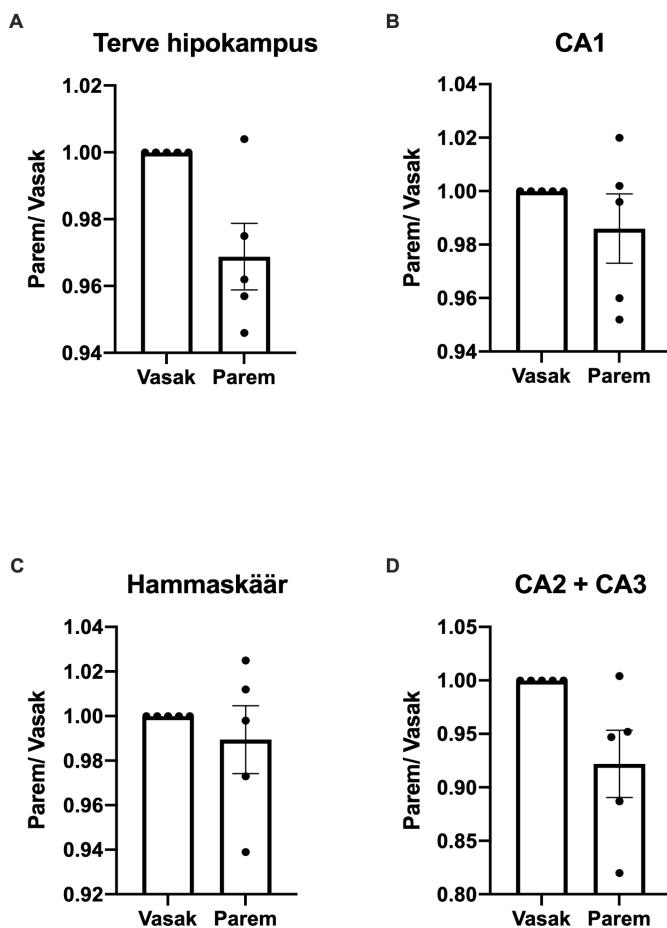
Antud töös hinnati ka transkriptsioonifaktor *TCF4* lokalisatsiooni ja ekspressiooni ajalõikudel immunohistokeemilise analüüsiga. Selleks tehti viie hiirega immunohistokeemia peatükis 2.2.5 ja 2.2.6 kirjeldatud meetodite järgi. Preparaadid skaneeriti ja kujutisi analüüsiti ImageJ (versioon 1.53r) programmis (Schneider, C. *et al.*, 2012). Mõõdeti, kui palju oli *TCF4* valk ekspresseerunud nii paremas kui ka vasakus hiire hipokampuses. Hipokampus valiti, kuna seal oli *TCF4* fluorestsents kõige intensiivsem ehk seal on *TCF4* valku kõige rohkem. Täpsemate tulemuste saamiseks jagati hiirte hipokampus kolmeks osaks: CA1 (ammoni sarv 1, lad. *Cornu ammonis 1*), CA2/ CA3 ja hammaskäär (Joonis 21). Võrreldi vasakut hipokampuse poolt paremaga ja siis kõiki kolme ühe hipokampuse poole osa vastavate teise poole osadega. Skaneeritud kujutisi analüüsides ei olnud näha erinevust *TCF4* fluorestsentsi intensiivsuses parema ja vasaku ajupoolkera hipokampuse vahel. Samas selgus, et *TCF4* on kõige rohkem ekspresseerunud CA1 piirkonnas, millele järgnevad CA2 ja CA3 piirkonnad. Kõige vähem on *TCF4* ekspresseerunud hammaskäärus. Katse spetsiifilisuse tõestamiseks oli näha, et *TCF4* paikneb transkriptsioonifaktorile kohaselt rakutuumas.



**Joonis 21. Immunohistokeemiline värving hiire ajulõikudel.** (A) TCF4 (roheline) lokaliseerub raku tuumades erinevates hipokampuse osades. Kollasega on märgitud osad, milleks hipokampus oli jaotatud, et hinnata täpsemalt TCF4 ekspressiooni: 1 - kõik hipokampuse piirkonnad (CA1-3 + hammaskäär), 2 - CA1, 3 - hammaskäär, 4 - CA2/ CA3. Silmanähtavalt ühtegi erinevust parema ja vasaku ajupoolkera hipokampuse TCF4 ekspressiooni vahel ei esinenud. (B) Rakutuumade (DNA) visualiseerimiseks kasutati bisbensimiid H 33258 (sinine). (C) TCF4 ja rakutuumad koos.

Peale ajulõikude analüüsimist ImageJ (versioon 1.53r) programmis (Schneider, C. *et al.*, 2012) võrreldi TCF4 ekspressiooni tasemete erinevusi poolkerade vahel võrdsustades vasaku ajupoolkera hipokampuse TCF4 ekspressioon ühega (Joonis 22). Seejärel arvutati keskmine  $\pm$  standardviga (SEM) ja tehti analüüs Wilcoxon'i testiga. Selgus, et tervet hipokampust vaadates moodustas parema ajupoolkera hipokampuse TCF4 ekspressioon ~97% vasaku ajupoolkera hipokampuse TCF4 ekspressioonist (Joonis 22A). CA1 puhul moodustas parema ajupoolkera

hipokampuse TCF4 ekspressioon ~99% vasaku ajupoolkera hipokampuse TCF4 ekspressioonist (Joonis 22B). Parema hammaskäär TCF4 ekspressioon moodustas ~99% vasaku hammaskäär TCF4 ekspressioonist (Joonis 22C). Parema ajupoolkera CA2/ CA3 piirkonna TCF4 ekspressioon moodustas ~92% vasaku CA2/ CA3 piirkonna TCF4 ekspressioonist (Joonis 22D). Wilcoxon'i testiga ei leitud ühtegi statistiliselt olulist erinevust parema ja vasaku ajupoolkera hipokampuse TCF4 ekspressiooni vahel ( $p > 0,05$ ).



**Joonis 22. TCF4 ekspressiooni taseme erinevus hipokampuse erinevates piirkondades, kui vasaku ajupoolkera tulemused võrdsustati ühega.** Iga hiire ( $n = 5$ ) hipokampusest valiti 3 lõiku ja arvutati nende lõikude keskmine TCF4 ekspressioon. Seejärel võrdsustati vasak pool ühega ning arvutati parema ajupoolkera suhe vasakusse, mis on joonisel kujutatud musta täpina. Leiti ka kõigi hiirte keskmine TCF4 ekspressiooni suhe parema ja vasaku ajupoolkera hipokampuse vahel ja standardviga (SEM).

## ARUTELU

Koduhiire (lad. *Mus musculus*) aju on umbes 1000 korda väiksem inimese ajust nii pindala kui ka neuronite arvu poolest (Herculano-Houzel, *et al.*, 2006; Hodge *et al.*, 2019). Sellest hoolimata on hiire genoom 90% ulatuses identne inimese omaga, mis teeb hiirest hea mudelorganismi (*Mouse Genome Sequencing Consortium*, 2002). Samuti on leitud, et hiirel ja inimesel on aju teatud määral sarnaselt lateraliseeritud, näiteks mõlemal vastutab ruumilise õppimise eest parem ajupoolkera (Grabrucker *et al.*, 2018).

Antud uurimistöö raames ei nähtud suuri erinevusi inimese ja hiire qPCR analüüsi tulemustes, mis tõestab, et hiir on hea mudelorganism transkriptsioonifaktor TCF4 uurimiseks. Hiire qPCR tulemusi analüüsid selgus, et frontaalsagaras on statistiliselt oluline erinevus parema ja vasaku ajupoolkera *Tcf4* ekspressioonis *Hprt* geeni koduhoidjana kasutades. Sarnast tulemust ei olnud näha qPCR analüüsis inimese frontaalsagaraga. Samas varasemalt Tartu Ülikooli füsioloogia osakonnas läbiviidud katsed inimese frontaalsagaraga näitasid statistiliselt olulist erinevust *TCF4* ekspressioonis parema ja vasaku ajupoolkera vahel (peatükk 1.5, Joonis 4). Seega võib käesolevas uurimistöös erinevus inimese ja hiire tulemuste vahel olla põhjustatud mõnest välisest faktorist, mille üle edaspidi ka antud peatükis arutletakse.

Nii hiire kui ka inimese hipokampuse puhul ei olnud näha statistiliselt olulist erinevust parema ja vasaku ajupoolkera *TCF4/ Tcf4* ekspressioonis. Samas hiirel oli näha statistiliselt oluline erinevus parema ja vasaku ajupoolkera *Tcf4* ekspressioonis temporaalsagaras kasutades *Gapdh* geeni koduhoidjana. Sellised statistiliselt olulist ekspressiooni erinevust näitavad andmed viitavad, et *TCF4/ Tcf4* võiks olla ajus lateraliseeritud. Lisaks on kõigi statistiliselt erinevate tulemuste puhul näha vasakus ajupoolkeras kõrgemat *TCF4/ Tcf4* ekspressiooni kui paremas ajupoolkeras, mis läheb kokku varasemalt kirjanduses mainituga (Gogliettino, 2017; Kennedy *et al.*, 2016). Antud uurimistöös saadud tulemuste põhjal ei ole siiski võimalik lõplikke järeldusi transkriptsioonifaktor TCF4 lateraliseerituse kohta teha.

Üheks probleemiks antud uurimistöös võis olla qPCR katsete käigus koduhoidjate avaldumise suur kõikumine, nagu on välja toodud peatükis 2.2.2. *TCF4/ Tcf4* lateraliseeritus ajupoolkerade vahel, kui see eksisteerib, ei ole kindlasti lihtsasti märgatav, sest vastasel juhul oleks seda fenomeni juba kirjeldatud. Tuginedes antud töö tulemustele tuleb tõdeda, et sellise ajupoolkerade vahelise erinevuse uurimiseks vaja väga täpset süsteemi.

On avaldatud mitmeid vastuolulisi teadusartikleid seoses sobilike koduhoidjate valikuga. Ühed publikatsioonid väidavad, et *ACTB/ ActB*, *GAPDH/ Gapdh*, *HPRT/ Hprt*, *TBP* on stabiilsed ja head koduhoidja variandid (Otto *et al.*, 2020; Röhn *et al.*, 2018; Søs *et al.*, 2013), samas teised väidavad, et need ei ole stabiilsed ja nendega tehtud katsete tulemusi ei saa usaldada (Alieva *et al.*, 2021; de Jonge *et al.*, 2007; Silberberg *et al.*, 2009). Sellest võib järeldada, et koduhoidjate stabiilsus on väga koespetsiifiline ja äärmiselt raske on ette ennustada, kuidas valitud koduhoidjad kindlas katses käituma hakkavad. Antud uurimistöö raames võib öelda, et *Gapdh* ja *Hprt* olid kõige paremad, sest nende puhul oli näha statistiliselt olulist erinevust *Tcf4* lateraliseerituses ajupoolkerade vahel. *TBP* oli kõige kehvem koduhoidja, sest replikaatide vaheline hajuvus oli selle koduhoidja puhul kõige suurem.

Mis veel võis saada saatuslikuks statistiliselt oluliste tulemuse avaldumisele, oli tulemuste suur standardhälve. See võis lisaks koduhoidjate suurele kõikumisele olla põhjustatud aju dissektsioonide ja lõikude tegemisest, kuna väga keeruline on kõiki ajusid täpselt ühtemoodi lõigata. See võib tingida selle, et parema ja vasaku ajupoolkera koematerjal ei ole kogutud täpselt identsetest piirkondadest. Dissekteerimisviga on kõige väiksem hiire hipokampuse puhul, kuna see ajustruktuur eraldub ülejäänud ajust suhteliselt selgepiirilisel. Siiski ei nähtud antud uurimistöös selgeid poolkeradevahelisi erinevusi *TCF4* ekspressioonis hiire hipokampuste puhul.

Immunohistokeemilise analüüsi tulemused kinnitavad juba varem kinnitatud *Tcf4* ekspressioonimustrit (Jung *et al.*, 2018), mille alusel *Tcf4* ekspresseerub eelkõige rakutuumades. Seetõttu ei ole *Tcf4* ekspressioon erinevates koe piirkondades ühtlane (rakutuumad ei ole koes ühtlaselt jaotunud), mis võib suurendada *Tcf4* ekspressiooni variatiivsust indiviidide vahel.

Pannes kokku nii qPCR kui ka immunohistokeemia tulemused võib järeldada, et kui vasakus ajupoolkeras eksisteerib kõrgem *TCF4/ Tcf4* ekspressioon, siis ilmneb see pigem statistilise tõenäosusena, mistõttu oleks vaja suuremat valimit. Indiviidi tasandil ei ole võimalik *TCF4/ Tcf4* lateraliseeritust näha. Olemasolevaid tulemusi võib vaadata kui paljulubavat pilootkatset, mille põhjal võiks katseloomade arvu oluliselt suurendada (täpse arvu jaoks on plaan konsulteerida statistika spetsialistidega).

Tuleviku eksperimentide jaoks tasuks planeerida suuremat valimit ja tagada parem koduhoidjate stabiilsus või ka katsetada absoluutse kvantifitseerimise meetodit. Samuti tuleks uurida erinevaid aju arengu staadiumeid, näiteks erinevas vanuses hiiri, sest lateraliseeritus võib avalduda ainult kindlatest arenguetappides (de Kovel *et al.*, 2018) (võimalik, et eelkõige embrüonaalselt). Lisaks võiks *TCF4/Tcf4* geeni lateraliseeritust ajus mõõta erinevate tingimuste korral, näiteks stressisituatsioonis, kuna on näidatud, et geeni lateraliseeritus võib ilmned ainult stressi korral ja ei ole märgatav tavatingimustes (Chae *et al.*, 2021). Kuna katsed *Tcf4*<sup>+/-</sup> haplodefitsiitsete hiirtega on näidanud, et neil esineb muu hulgas parema esikäpa nõrkus (Kennedy *et al.*, 2016; Welniarz *et al.*, 2015), siis oleks huvitav uurida täpsemalt haplodefitsiitsete hiirte *Tcf4* lateraliseeritust ajus, kuna see võib organismile tekitada stressisituatsioonile sarnase olukorra.

On ka leitud, et ebatavaline sümmeetria aju geeniekspressioonis võib olla seotud vaimsete häiretega (Chae *et al.*, 2021) ja on välja toodud, et mitmed üksiku nukleotiidi polümorfismid *TCF4* geenis on seotud psühhiaatriliste häiretega, nagu depressioon (Howard *et al.*, 2019) skisofreenia, autismi ning bipolaarne häire (Li *et al.*, 2019; Yao *et al.*, 2021). Seetõttu oleks oluline uurida, kas *TCF4* geeni lateraliseeritus avaldub näiteks vaimsete häiretega hiirtel ja inimestel. Lisaks tasuks kontrollida hüpoteesi, et *TCF4* lateraliseeritust võib indutseerida stressi või ärevusega.

Varasemalt on Tartu Ülikooli füsioloogia osakonnas uuritud, kas *TCF4* avaldub teistmoodi skisofreeniapatsientidel võrreldes kontrollisikutega (peatükk 1.5). Selgus, et ekspressioonitasemete keskmised väärtused ei muutunud, kui isikuid vaadeldi *TCF4* ekspressiooni osas eraldiseisvalt haigusgruppi kuulumise alusel (skisofreeniapatsiendid versus kontrollid) või eraldiseisvalt soo alusel (mehed versus naised). Siiski on võimalik, et ekspressioonitasemete erinevus esineb mõne teise vaimse häire puhul.

On ka märgitud, et mitmed ajus geeniekspressiooni asümmeetriat uurivad teadustööd ei ole suutnud leida lateraalsust individuaalse geeni tasandil (Lambert *et al.*, 2011; Muntané *et al.*, 2017). Selle asemel on uuritud funktsionaalseid geenirühme, mis tooksid asümmeetria ajus tugevamalt välja (Karlebach & Francks, 2015; Muntané *et al.*, 2017; Ocklenburg *et al.*, 2017). On võimalik, et sama kehtib ka *TCF4/Tcf4* puhul. Kui uurida *TCF4* geeni sisaldavat funktsionaalset geenirühma, siis ehk on lateraliseeritus rohkem märgatavam kui antud uurimistöö raames. Olulise hüpoteesi *TCF4* võimaliku osaluse kohta lateraliseerituses annab *LEFTY1/Lefty1* geeni oluline allareguleeritus *TCF4/Tcf4 knockdown* järgselt kahes sõltumatus

katses (Meno *et al.*, 1997; Kennedy *et al.*, 2016). Seetõttu on LEFTY1 seotud molekulaarsed võrgustikud üheks potentsiaalseks uurimisteemaks seoses TCF4 võimaliku lateraliseeritusega.

## KOKKUVÕTE

Antud uurimistöös uuriti transkriptsioonifaktor TCF4 lateraliseeritust inimese ja hiire ajus, et teada saada kas ja mil määral erineb transkriptsioonifaktor TCF4 tase erinevate ajupoolkerade vahel. Selleks püstitati kaks eesmärki. Kõigepealt analüüsiti *TCF4/ Tcf4* geeni ekspressiooni võrdlevalt vasakus ja paremas ajupoolkeras. Seejärel uuriti TCF4 lokaliseeritud lateraliseeritust hiire ajus.

Töö eksperimentaalosa esimeses pooles teostati qPCR analüüs. Tulemustest selgus, et hiire frontaalsagaras on statistiliselt oluline erinevus parema ja vasaku ajupoolkera *Tcf4* ekspressioonis *Hprt* geeni koduhoidjana kasutades. Samuti oli hiirel näha statistiliselt oluline erinevus parema ja vasaku ajupoolkera *Tcf4* ekspressioonis temporaalsagaras kasutades *Gapdh* geeni koduhoidjana. Mõlemal korral oli *Tcf4* rohkem ekspresseerunud just vasakul ajupoolkeral. Sellised statistiliselt olulist ekspressiooni erinevust näitavad andmed viitavad, et *TCF4/ Tcf4* võiks olla ajus lateraliseeritud. Kuna inimese, hiire teiste ajuosade ja koduhoidjate puhul ei olnud statistiliselt olulisi erinevusi parema ja vasaku ajupoolkera *TCF4/ Tcf4* ekspressioonis näha, siis antud uurimistöös saadud tulemuste põhjal ei ole võimalik lõplikke järeldusi teha, kas ja kui palju erineb transkriptsioonifaktor TCF4 tase erinevate ajupoolkerade vahel.

Teise eesmärgi uurimiseks teostati immunohistokeemiline analüüs. Antud töö katsete põhjal ei olnud näha statistiliselt olulist erinevust parema ja vasaku ajupoolkera *Tcf4* ekspressioonis ehk ei leitud, et transkriptsioonifaktor TCF4 oleks hiire ajus lateraliseeritud.

Käesoleva uurimistöõ tulemustest järeldati, et juhul kui vasakus ajupoolkeras eksisteerib kõrgem *TCF4/ Tcf4* ekspressioon, siis tuleb see efekt välja ainult teatud tingimustes (näiteks kindla koduhoidja puhul), aga ka mitte alati. *TCF4/ Tcf4* ekspressiooni erinevust ajupoolkerade vahel ei ole võimalik näha indiviidi tasandil, vaid statistilise tõenäosusena, mistõttu oleks vaja suuremat valimit, kui antud uurimistöõ võimaldas. Võimalik, et TCF4 lateraliseeritus ilmneb selgemalt siis, kui uurida tervikuna TCF4 valguga seotud molekulaarseid radasid. Käesolevat tööd võib vaadata pilootkatsena, kust saadud andmete põhjal on võimalik edaspidi katsegruppe suurendada ning samuti edasi arendada paremaid lähenemisi ja meetodeid, mille abil saada selgemaid vastuseid TCF4 võimaliku osaluse kohta ajupoolkerade lateraliseerituses.

# RESÜMEE

## The lateralisation of transcription factor TCF4 in mouse and human brain

Carolin Kuuskmäe

### Summary

The brain is a good example of left-right asymmetry (also known as lateralisation) of organs. Brain lateralisation means that the right and left hemispheres of the brain are structurally different and have a tendency to be responsible for different tasks (Amunts, 2010; Chang *et al.*, 2015). Deviations from typical asymmetry are known to lead to various cognitive disorders such as autism and schizophrenia (Floris *et al.*, 2016; Kienast *et al.*, 2021; Ribolsi *et al.*, 2014; Shaw *et al.*, 2009).

The present study investigated the lateralisation of the transcription factor TCF4 in mouse and human brains. TCF4 is involved in various developmental processes, cell cycle regulation and response to environmental signals (Jones, 2004; Massari & Murre, 2000; Skinner *et al.*, 2010). It is encoded by *TCF4* (human)/ *Tcf4* (mouse), a gene essential for the development of the organism (Zhuang *et al.*, 1996). *Tcf4*<sup>+/-</sup> mice have previously been shown to have weakness in the right forepaw (Kennedy *et al.*, 2016; Welniarz *et al.*, 2015). Also more genes with dysregulated expression have been found in the left hippocampus of *Tcf4*<sup>+/-</sup> mice than in the right hippocampus (Gogliettino, 2017). There are also indications that TCF4 could be somehow associated with the *LEFTY1* gene (Meno *et al.*, 1997; Kennedy *et al.*, 2016), a known lateralised gene (Kennedy *et al.*, 2016). Based on this it can be speculated that the expression of the *TCF4*/*Tcf4* gene might be lateralised in the brain.

In this study, the lateralisation of the transcription factor TCF4 in the human and mouse brain was investigated to determine if and to what extent the level of the transcription factor TCF4 differs between the two hemispheres of the brain. To that end, two aims were set.

The first aim of the current thesis was to analyse *TCF4*/*Tcf4* gene expression comparatively between the left and right hemispheres of the brain. For that, a qPCR analysis was performed. The results showed that there is a statistically significant difference of the *Tcf4* expression between right and left hemispheres in the mouse frontal lobe using *Hprt* as a housekeeping gene. There was also a statistically significant difference of the *Tcf4* expression between the right and left hemisphere in the mouse temporal lobe using *Gapdh* as a housekeeping gene. In

both cases *Tcf4* was more highly expressed in the left hemisphere. Such statistically significant differences in the *Tcf4* expression suggest that *TCF4/ Tcf4* may be lateralised in the brain. Because there were no statistically significant results obtained analysing the human *TCF4* expression lateralisation, other regions of the mouse brain and other housekeeping genes, it is not possible to conclude definitively whether and to what extent the transcription factor TCF4 levels differ between hemispheres.

For the second aim, an immunohistochemical analysis was performed to determine the lateralised localisation of TCF4. The results did not show a statistically significant difference in the expression of *Tcf4* in the right and left hemispheres, therefore transcription factor TCF4 was found to be not lateralised in the mouse brain.

It was concluded that if higher *TCF4/ Tcf4* expression exists in the left hemisphere, this effect occurs only under certain conditions (e.g. in case of a particular housekeeping gene), but not always. The difference in *TCF4/ Tcf4* expression between the brain hemispheres cannot be seen at the individual level, but as a statistical probability, so a larger sample would be needed than was available in this study. It is possible that TCF4 lateralization becomes more apparent when examining the molecular pathways associated with the TCF4 protein as a whole. The present work can be seen as a pilot experiment, from which data can be used to further expand experimental groups, as well as to develop better approaches and methods to obtain clearer answers about the possible involvement of TCF4 in brain hemisphere lateralization.

## TÄNUSÕNAD

Sooviksin eelkõige tänada oma põhijuhendajat Mari-Anne Philipsit suurepärase juhendamise eest. Samuti sooviksin tänada Kersti Lillevälja ja Tambet Tõnissood kasulike märkuste ja konstruktiivse tagasiside eest. Veel sooviksin tänada Toomas Jagomäed, kes õpetas mulle kõike, mida on vaja teada immunohistokeemia katsete tegemiseks. Lisaks sooviksin veel tänada Maria Kaaret ja Marko Leevikest, kes aitasid mul katsete meetodid selgeks saada ja Kaie Mikheima, kes leidis mulle arvuti, kus kõik minu lõputöö tegemiseks vajalikud programmid töötavad.

## KASUTATUD KIRJANDUS

Abdolmaleky, H. M., Gower, A. C., Wong, C. K., Cox, J. W., Zhang, X., Thiagalingam, A., Shafa, R., Sivaraman, V., Zhou, J. R. & Thiagalingam, S. (2019). Aberrant transcriptomes and DNA methylomes define pathways that drive pathogenesis and loss of brain laterality/asymmetry in schizophrenia and bipolar disorder. *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics*, 180(2), 138–149.

Alieva, A. K., Filatova, E. V., Rudenok, M. M., Slominsky, P. A. & Shadrina, M. I. (2021). Housekeeping Genes for Parkinson's Disease in Humans and Mice. *Cells*, 10(9), 2252.

Amiel, J., Rio, M., de Pontual, L., Redon, R., Malan, V., Boddaert, N., Plouin, P., Carter, N. P., Lyonnet, S., Munnich, A. & Colleaux, L. (2007). Mutations in TCF4, encoding a class I basic helix-loop-helix transcription factor, are responsible for Pitt-Hopkins syndrome, a severe epileptic encephalopathy associated with autonomic dysfunction. *American journal of human genetics*, 80(5), 988–993.

Amunts, K. (2010). “Structural indices of asymmetry,” in *The Two Halves of the Brain*, eds K. Hugdahl and R. Westerhausen (Cambridge, MA: The MIT Press), 145–176.

Andrade, C., Alwarshetty, M., Sudha, S. & Suresh Chandra, J. (2001). Effect of innate direction bias on T-maze learning in rats: implications for research. *Journal of neuroscience methods*, 110(1-2), 31–35.

Bangasser, D. A. & Wiersielis, K. R. (2018). Sex differences in stress responses: a critical role for corticotropin-releasing factor. *Hormones (Athens, Greece)*, 17(1), 5–13.

Bergqvist, I., Eriksson, M., Saarikettu, J., Eriksson, B., Corneliussen, B., Grundström, T. & Holmberg, D. (2000). The basic helix-loop-helix transcription factor E2-2 is involved in T lymphocyte development. *European journal of immunology*, 30(10), 2857–2863.

Braun, K., Häberle, B. M., Wittmann, M. T. & Lie, D. C. (2020). Enriched environment ameliorates adult hippocampal neurogenesis deficits in Tcf4 haploinsufficient mice. *BMC neuroscience*, 21(1), 50. <https://doi.org/10.1186/s12868-020-00602-3>

Breslau N. (2002). Gender differences in trauma and posttraumatic stress disorder. *The journal of gender-specific medicine : JGSM : the official journal of the Partnership for Women's Health at Columbia*, 5(1), 34–40.

Brockschmidt, A., Todt, U., Ryu, S., Hoischen, A., Landwehr, C., Birnbaum, S., Frenck, W., Radlwimmer, B., Lichter, P., Engels, H., Driever, W., Kubisch, C. & Weber, R. G. (2007). Severe mental retardation with breathing abnormalities (Pitt-Hopkins syndrome) is caused by haploinsufficiency of the neuronal bHLH transcription factor TCF4. *Human molecular genetics*, 16(12), 1488–1494.

Brzózka, M. M., Radyushkin, K., Wichert, S. P., Ehrenreich, H. & Rossner, M. J. (2010). Cognitive and sensorimotor gating impairments in transgenic mice overexpressing the schizophrenia susceptibility gene Tcf4 in the brain. *Biological psychiatry*, 68(1), 33–40.

Bunnell, T. M., Burbach, B. J., Shimizu, Y. & Ervasti, J. M. (2011).  $\beta$ -Actin specifically controls cell growth, migration, and the G-actin pool. *Molecular biology of the cell*, 22(21), 4047–4058.

Butte, A. J., Dzau, V. J. & Glueck, S. B. (2001). Further defining housekeeping, or “maintenance,” genes Focus on “A compendium of gene expression in normal human tissues”. *Physiological Genomics*, 7(2), 95-96.

Cadwell, C. R., Bhaduri, A., Mostajo-Radji, M. A., Keefe, M. G. & Nowakowski, T. J. (2019). Development and Arealization of the Cerebral Cortex. *Neuron*, 103(6), 980–1004.

Carlin, D., Bonerba, J., Phipps, M., Alexander, G., Shapiro, M. & Grafman, J. (2000). Planning impairments in frontal lobe dementia and frontal lobe lesion patients. *Neuropsychologia*, 38(5), 655–665.

- Carujo, S., Estanyol, J. M., Ejarque, A., Agell, N., Bachs, O. & Pujol, M. J. (2006). Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase is a SET-binding protein and regulates cyclin B-cdk1 activity. *Oncogene*, 25(29), 4033–4042.
- Chae, S., Hong, J., Kang, K., Shin, A., Kim, D. G., Lee, S., Kim, M. Y., Jung, I. & Kim, D. (2021). Molecular laterality encodes stress susceptibility in the medial prefrontal cortex. *Molecular brain*, 14(1), 92.
- Chang, E. F., Raygor, K. P. & Berger, M. S. (2015). Contemporary model of language organization: an overview for neurosurgeons. *Journal of neurosurgery*, 122(2), 250–261.
- Chayer, C. & Freedman, M. (2001). Frontal lobe functions. *Current Neurology And Neuroscience Reports*, 1(6), 547-552.
- Cisse, B., Caton, M. L., Lehner, M., Maeda, T., Scheu, S., Locksley, R., Holmberg, D., Zweier, C., den Hollander, N. S., Kant, S. G., Holter, W., Rauch, A., Zhuang, Y. & Reizis, B. (2008). Transcription factor E2-2 is an essential and specific regulator of plasmacytoid dendritic cell development. *Cell*, 135(1), 37–48.
- Cohen, S. J., Munchow, A. H., Rios, L. M., Zhang, G., Asgeirsdóttir, H. N. & Stackman, R. W., Jr (2013). The rodent hippocampus is essential for nonspatial object memory. *Current biology : CB*, 23(17), 1685–1690.
- Costa, A. M., Pereira-Castro, I., Ricardo, E., Spencer, F., Fisher, S. & da Costa, L. T. (2013). GRG5/AES interacts with T-cell factor 4 (TCF4) and downregulates Wnt signaling in human cells and zebrafish embryos. *PloS one*, 8(7), e67694.
- Crespi, B., Read, S. & Hurd, P. (2018). The SETDB2 locus: evidence for a genetic link between handedness and atopic disease. *Heredity*, 120(1), 77–82.
- de Jonge, H. J., Fehrmann, R. S., de Bont, E. S., Hofstra, R. M., Gerbens, F., Kamps, W. A., de Vries, E. G., van der Zee, A. G., te Meerman, G. J. & ter Elst, A. (2007). Evidence based selection of housekeeping genes. *PloS one*, 2(9), e898.

de Kovel, C., Lisgo, S., Fisher, S., & Francks, C. (2018). Subtle left-right asymmetry of gene expression profiles in embryonic and foetal human brains. *Scientific Reports*, 8(1).

Demény, M. A., Soutoglou, E., Nagy, Z., Scheer, E., Jánoshazi, A., Richardot, M., Argentini, M., Kessler, P. & Tora, L. (2007). Identification of a small TAF complex and its role in the assembly of TAF-containing complexes. *PloS one*, 2(3), e316. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000316>

de Pontual, L., Mathieu, Y., Golzio, C., Rio, M., Malan, V., Boddaert, N., Soufflet, C., Picard, C., Durandy, A., Dobbie, A., Heron, D., Isidor, B., Motte, J., Newbury-Ecob, R., Pasquier, L., Tardieu, M., Viot, G., Jaubert, F., Munnich, A., Colleaux, L., ... Amiel, J. (2009). Mutational, functional, and expression studies of the TCF4 gene in Pitt-Hopkins syndrome. *Human mutation*, 30(4), 669–676.

D'Esposito, M., Postle, B. R. & Rypma, B. (2000). Prefrontal cortical contributions to working memory: evidence from event-related fMRI studies. *Experimental brain research*, 133(1), 3–11.

Dörflinger, U., Pscherer, A., Moser, M., Rümmele, P., Schüle, R. & Buettner, R. (1999). Activation of somatostatin receptor II expression by transcription factors MIBP1 and SEF-2 in the murine brain. *Molecular and cellular biology*, 19(5), 3736–3747.

Flora, A., Garcia, J. J., Thaller, C. & Zoghbi, H. Y. (2007). The E-protein Tcf4 interacts with Math1 to regulate differentiation of a specific subset of neuronal progenitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(39), 15382–15387.

Floris, D. L., Barber, A. D., Nebel, M. B., Martinelli, M., Lai, M. C., Crocetti, D., Baron-Cohen, S., Suckling, J., Pekar, J. J. & Mostofsky, S. H. (2016). Atypical lateralization of motor circuit functional connectivity in children with autism is associated with motor deficits. *Molecular autism*, 7, 35.

Forrest, M. P., Waite, A. J., Martin-Rendon, E. & Blake, D. J. (2013). Knockdown of human TCF4 affects multiple signaling pathways involved in cell survival, epithelial to mesenchymal transition and neuronal differentiation. *PloS one*, 8(8), e73169.

- Forrest, M. P., Hill, M. J., Kavanagh, D. H., Tansey, K. E., Waite, A. J. & Blake, D. J. (2018). The Psychiatric Risk Gene Transcription Factor 4 (TCF4) Regulates Neurodevelopmental Pathways Associated With Schizophrenia, Autism, and Intellectual Disability. *Schizophrenia bulletin*, 44(5), 1100–1110. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbx164>
- Furumura, M., Potterf, S. B., Toyofuku, K., Matsunaga, J., Muller, J. & Hearing, V. J. (2001). Involvement of ITF2 in the transcriptional regulation of melanogenic genes. *The Journal of biological chemistry*, 276(30), 28147–28154.
- Gabrieli, J. D., Brewer, J. B., Desmond, J. E. & Glover, G. H. (1997). Separate neural bases of two fundamental memory processes in the human medial temporal lobe. *Science (New York, N.Y.)*, 276(5310), 264–266.
- Gitton, Y., Cohen-Tannoudji, M. & Wassef, M. (1999). Role of Thalamic Axons in the Expression of H-2Z1, a Mouse Somatosensory Cortex Specific Marker. *Cerebral Cortex*, 9(6), 611-620.
- Gogliettino, Alex R. (2017). Lateralization of Dysregulated Gene Expression in Pitt-Hopkins Syndrome and Manipulating the Methylome to Enhance Memory. *Honors Theses*. 212. <https://scarab.bates.edu/honorsthesis/212>
- Grabrucker, S., Haderspeck, J. C., Sauer, A. K., Kittelberger, N., Asoglu, H., Abaei, A., Rasche, V., Schön, M., Boeckers, T. M. & Grabrucker, A. M. (2018). Brain Lateralization in Mice Is Associated with Zinc Signaling and Altered in Prenatal Zinc Deficient Mice That Display Features of Autism Spectrum Disorder. *Frontiers in molecular neuroscience*, 10, 450.
- Güntürkün, O. & Ocklenburg, S. (2017). Ontogenesis of Lateralization. *Neuron*, 94(2), 249–263.
- Hammond, R. S., Tull, L. E. & Stackman, R. W. (2004). On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory. *Neurobiology of learning and memory*, 82(1), 26–34.
- Herculano-Houzel, S., Mota, B. & Lent, R. (2006). Cellular scaling rules for rodent brains. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 103(32), 12138-12143.

Hodge, R. D., Bakken, T. E., Miller, J. A., Smith, K. A., Barkan, E. R., Graybuck, L. T., Close, J. L., Long, B., Johansen, N., Penn, O., Yao, Z., Eggermont, J., Höllt, T., Levi, B. P., Shehata, S. I., Aeversmann, B., Beller, A., Bertagnolli, D., Brouner, K., Casper, T., ... Lein, E. S. (2019). Conserved cell types with divergent features in human versus mouse cortex. *Nature*, *573*(7772), 61–68.

Hollander, E., Anagnostou, E., Chaplin, W., Esposito, K., Haznedar, M. M., Licalzi, E., Wasserman, S., Soorya, L. & Buchsbaum, M. (2005). Striatal volume on magnetic resonance imaging and repetitive behaviors in autism. *Biological psychiatry*, *58*(3), 226–232

Holmes, M., Folley, B. S., Sonmezturk, H. H., Gore, J. C., Kang, H., Abou-Khalil, B. & Morgan, V. L. (2014). Resting state functional connectivity of the hippocampus associated with neurocognitive function in left temporal lobe epilepsy. *Human brain mapping*, *35*(3), 735–744.

Horstick, E., Bayleyen, Y. & Burgess, H. (2020). Molecular and cellular determinants of motor asymmetry in zebrafish. *Nature Communications*, *11*(1).

Howard, D. M., Adams, M. J., Clarke, T. K., Hafferty, J. D., Gibson, J., Shirali, M., Coleman, J., Hagenaars, S. P., Ward, J., Wigmore, E. M., Alloza, C., Shen, X., Barbu, M. C., Xu, E. Y., Whalley, H. C., Marioni, R. E., Porteous, D. J., Davies, G., Deary, I. J., Hemani, G., ... McIntosh, A. M. (2019). Genome-wide meta-analysis of depression identifies 102 independent variants and highlights the importance of the prefrontal brain regions. *Nature neuroscience*, *22*(3), 343–352.

Itahana, Y., Piens, M., Fong, S., Singh, J., Sumida, T. & Desprez, P. Y. (2008). Expression of Id and ITF-2 genes in the mammary gland during pregnancy. *Biochemical and biophysical research communications*, *372*(4), 826–830.

Jarrard L. E. (1995). What does the hippocampus really do?. *Behavioural brain research*, *71*(1-2), 1–10.

Jerger, J., Lovering, L. & Wertz, M. (1972). Auditory Disorder Following Bilateral Temporal Lobe Insult: Report of a Case. *Journal Of Speech And Hearing Disorders*, *37*(4), 523-535.

- Jones S. (2004). An overview of the basic helix-loop-helix proteins. *Genome biology*, 5(6), 226.
- Jung, D. W., Kim, W. H., Seo, S., Oh, E., Yim, S. H., Ha, H. H., Chang, Y. T. & Williams, D. R. (2014). Chemical targeting of GAPDH moonlighting function in cancer cells reveals its role in tubulin regulation. *Chemistry & biology*, 21(11), 1533–1545.
- Jung, M., Häberle, B. M., Tschakowsky, T., Wittmann, M. T., Balta, E. A., Stadler, V. C., Zweier, C., Dörfler, A., Gloeckner, C. J. & Lie, D. C. (2018). Analysis of the expression pattern of the schizophrenia-risk and intellectual disability gene TCF4 in the developing and adult brain suggests a role in development and plasticity of cortical and hippocampal neurons. *Molecular autism*, 9, 20.
- Karlebach, G. & Francks, C. (2015). Lateralization of gene expression in human language cortex. *Cortex* 67, 30–36.
- Kennedy, A. J., Rahn, E. J., Paulukaitis, B. S., Savell, K. E., Kordasiewicz, H. B., Wang, J., Lewis, J. W., Posey, J., Strange, S. K., Guzman-Karlsson, M. C., Phillips, S. E., Decker, K., Motley, S. T., Swayze, E. E., Ecker, D. J., Michael, T. P., Day, J. J. & Sweatt, J. D. (2016). Tcf4 Regulates Synaptic Plasticity, DNA Methylation, and Memory Function. *Cell reports*, 16(10), 2666–2685.
- Kienast, P., Schwartz, E., Diogo, M. C., Gruber, G. M., Brugger, P. C., Kiss, H., Ulm, B., Bartha-Doering, L., Seidl, R., Weber, M., Langs, G., Prayer, D. & Kasprian, G. (2021). The Prenatal Origins of Human Brain Asymmetry: Lessons Learned from a Cohort of Fetuses with Body Lateralization Defects. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 31(8), 3713–3722.
- Kim, S. H., Moores, J. C., David, D., Respass, J. G., Jolly, D. J. & Friedmann, T. (1986). The organization of the human HPRT gene. *Nucleic acids research*, 14(7), 3103–3118.
- Kolb, B., & Milner, B. (1981). Performance of complex arm and facial movements after focal brain lesions. *Neuropsychologia*, 19(4), 491–503.
- Lambert, N., Lambot, M. A., Bilheu, A., Albert, V., Englert, Y., Libert, F., Noel, J. C., Sotiriou, C., Holloway, A. K., Pollard, K. S., Detours, V. & Vanderhaeghen, P. (2011). Genes expressed

in specific areas of the human fetal cerebral cortex display distinct patterns of evolution. *PLoS one*, 6(3), e17753.

Lee, J. J., Wedow, R., Okbay, A., Kong, E., Maghzian, O., Zacher, M., Nguyen-Viet, T. A., Bowers, P., Sidorenko, J., Karlsson Linnér, R., Fontana, M. A., Kundu, T., Lee, C., Li, H., Li, R., Royer, R., Timshel, P. N., Walters, R. K., Willoughby, E. A., Yengo, L., ... Cesarini, D. (2018). Gene discovery and polygenic prediction from a genome-wide association study of educational attainment in 1.1 million individuals. *Nature genetics*, 50(8), 1112–1121.

Lein, E. S., Hawrylycz, M. J., Ao, N., Ayres, M., Bensinger, A., Bernard, A., Boe, A. F., Boguski, M. S., Brockway, K. S., Byrnes, E. J., Chen, L., Chen, L., Chen, T. M., Chin, M. C., Chong, J., Crook, B. E., Czaplinska, A., Dang, C. N., Datta, S., Dee, N. R., ... Jones, A. R. (2007). Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature*, 445(7124), 168–176.

Leonard, G., Jones, L. & Milner, B. (1988). Residual impairment in handgrip strength after unilateral frontal-lobe lesions. *Neuropsychologia*, 26(4), 555–564.

Liu, Y. P., Burleigh, D., Durning, M., Hudson, L., Chiu, I. M. & Golos, T. G. (2004). Id2 is a primary partner for the E2-2 basic helix-loop-helix transcription factor in the human placenta. *Molecular and cellular endocrinology*, 222(1-2), 83–91.

Liu, Y., Ray, S., Yang, X., Luntz-Leybman, V. & Chiu, I. (1998). A Splice Variant of E2–2 Basic Helix-Loop-Helix Protein Represses the Brain-specific Fibroblast Growth Factor 1 Promoter through the Binding to an Imperfect E-box. *Journal Of Biological Chemistry*, 273(30), 19269-19276.

Mańkowska, A., Harciarek, M., Williamson, J. & Heilman, K. (2018). The influence of rightward and leftward spatial deviations of spatial attention on emotional picture recognition. *Journal Of Clinical And Experimental Neuropsychology*, 40(9), 951-962.

Massari, M. E. & Murre, C. (2000). Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Molecular and cellular biology*, 20(2), 429–440.

Mazoyer, B., Zago, L., Jobard, G., Crivello, F., Joliot, M., Perchey, G., Mellet, E., Petit, L. & Tzourio-Mazoyer, N. (2014). Gaussian mixture modeling of hemispheric lateralization for language in a large sample of healthy individuals balanced for handedness. *PLoS one*, 9(6), e101165.

Meinhardt, G., Husslein, P. & Knöfler, M. (2005). Tissue-specific and ubiquitous basic helix-loop-helix transcription factors in human placental trophoblasts. *Placenta*, 26(7), 527–539.

Meno, C., Ito, Y., Saijoh, Y., Matsuda, Y., Tashiro, K., Kuhara, S. & Hamada, H. (1997). Two closely-related left-right asymmetrically expressed genes, *lefty-1* and *lefty-2*: their distinct expression domains, chromosomal linkage and direct neuralizing activity in *Xenopus* embryos. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, 2(8), 513–524.

Mouse Genome Sequencing Consortium, Waterston, R. H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J. F., Agarwal, P., Agarwala, R., Ainscough, R., Alexandersson, M., An, P., Antonarakis, S. E., Attwood, J., Baertsch, R., Bailey, J., Barlow, K., Beck, S., Berry, E., Birren, B., Bloom, T., ... Lander, E. S. (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, 420(6915), 520–562.

Muntané, G., Santpere, G., Verendejev, A., Seeley, W. W., Jacobs, B., Hopkins, W. D., Navarro, A. & Sherwood, C. C. (2017). Interhemispheric gene expression differences in the cerebral cortex of humans and macaque monkeys. *Brain structure & function*, 222(7), 3241–3254.

Murakami, M., Kataoka, K., Tominaga, J., Nakagawa, O. & Kurihara, H. (2004). Differential cooperation between dHAND and three different E-proteins. *Biochemical and biophysical research communications*, 323(1), 168–174.

Mustachio, L. M., Roszik, J., Farria, A. T., Guerra, K. & Dent, S. Y. (2019). Repression of GCN5 expression or activity attenuates c-MYC expression in non-small cell lung cancer. *American journal of cancer research*, 9(8), 1830–1845.

Ng, S. Y., Gunning, P., Eddy, R., Ponte, P., Leavitt, J., Shows, T. & Kedes, L. (1985). Evolution of the functional human beta-actin gene and its multi-pseudogene family: conservation of noncoding regions and chromosomal dispersion of pseudogenes. *Molecular and cellular biology*, 5(10), 2720–2732.

Nonaka, S., Tanaka, Y., Okada, Y., Takeda, S., Harada, A., Kanai, Y., Kido, M. & Hirokawa, N. (1998). Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein. *Cell*, 95(6), 829–837.

Ocklenburg, S., Arning, L., Gerding, W. M., Hengstler, J. G., Epplen, J. T., Güntürkün, O., Beste, C. & Akkad, D. A. (2016a). Left-Right Axis Differentiation and Functional Lateralization: a Haplotype in the Methyltransferase Encoding Gene SETDB2 Might Mediate Handedness in Healthy Adults. *Molecular neurobiology*, 53(9), 6355–6361.

Ocklenburg, S., Korte, S. M., Peterburs, J., Wolf, O. T. & Güntürkün, O. (2016b). Stress and laterality - The comparative perspective. *Physiology & behavior*, 164(Pt A), 321–329.

Ocklenburg, S., Schmitz, J., Moïnfar, Z., Moser, D., Klose, R., Lor, S., Kunz, G., Tegenthoff, M., Faustmann, P., Francks, C., Epplen, J. T., Kumsta, R. & Güntürkün, O. (2017). Epigenetic regulation of lateralized fetal spinal gene expression underlies hemispheric asymmetries. *eLife*, 6, e22784.

Olton, D., Becker, J. & Handelmann, G. (1979). Hippocampus, space, and memory. *Behavioral and Brain Sciences*, 2(3), 313-322.

Packham, C. (2015). What role does the hippocampus play in memory?. Vöetud 24.04.2022, <https://medicalxpress.com/news/2015-10-role-hippocampus-memory.html>

Persson, P., Jögi, A., Grynfeld, A., Pählman, S. & Axelson, H. (2000). HASH-1 and E2-2 are expressed in human neuroblastoma cells and form a functional complex. *Biochemical and biophysical research communications*, 274(1), 22–31.

Peters, M., Reimers, S. & Manning, J. T. (2006). Hand preference for writing and associations with selected demographic and behavioral variables in 255,100 subjects: the BBC internet study. *Brain and cognition*, 62(2), 177–189.

Pscherer, A., Dörflinger, U., Kirfel, J., Gawlas, K., Rüschoff, J., Buettner, R. & Schüle, R. (1996). The helix-loop-helix transcription factor SEF-2 regulates the activity of a novel initiator

element in the promoter of the human somatostatin receptor II gene. *The EMBO journal*, 15(23), 6680–6690.

Ribolsi, M., Daskalakis, Z. J., Siracusano, A. & Koch, G. (2014). Abnormal asymmetry of brain connectivity in schizophrenia. *Frontiers in human neuroscience*, 8, 1010.

Robinson, J. L., Barron, D. S., Kirby, L. A., Bottenhorn, K. L., Hill, A. C., Murphy, J. E., Katz, J. S., Salibi, N., Eickhoff, S. B. & Fox, P. T. (2015). Neurofunctional topography of the human hippocampus. *Human brain mapping*, 36(12), 5018–5037.

Rouillard, A. D., Gundersen, G. W., Fernandez, N. F., Wang, Z., Monteiro, C. D., McDermott, M. G. & Ma'ayan, A. (2016). The harmonizome: a collection of processed datasets gathered to serve and mine knowledge about genes and proteins. *Database : the journal of biological databases and curation*, 2016, baw100.

Rueckert, L. & Grafman, J. (1996). Sustained attention deficits in patients with right frontal lesions. *Neuropsychologia*, 34(10), 953–963.

Röhn, G., Koch, A., Krischek, B., Stavrinou, P., Goldbrunner, R. & Timmer, M. (2018). ACTB and SDHA Are Suitable Endogenous Reference Genes for Gene Expression Studies in Human Astrocytomas Using Quantitative RT-PCR. *Technology in cancer research & treatment*, 17, 1533033818802318.

Scheffe, J. H., Lehmann, K. E., Buschmann, I. R., Unger, T. & Funke-Kaiser, H. (2006). Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 84(11), 901–910.

Schmitz, J., Kumsta, R., Moser, D., Güntürkün, O. & Ocklenburg, S. (2018a). DNA methylation in candidate genes for handedness predicts handedness direction. *Laterality*, 23(4), 441–461.

Schmitz, J., Kumsta, R., Moser, D., Güntürkün, O. & Ocklenburg, S. (2018b). KIAA0319 promoter DNA methylation predicts dichotic listening performance in forced-attention conditions. *Behav. Brain Res.* 337, 1–7.

- Schmitz, J., Güntürkün, O. & Ocklenburg, S. (2019). Building an Asymmetrical Brain: The Molecular Perspective. *Frontiers in psychology*, *10*, 982.
- Schneider, C., Rasband, W. & Eliceiri, K. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, *9*, 671–675.
- Schwerin, S. C., Hutchinson, E. B., Radomski, K. L., Ngalula, K. P., Pierpaoli, C. M. & Juliano, S. L. (2017). Establishing the ferret as a gyrencephalic animal model of traumatic brain injury: Optimization of controlled cortical impact procedures. *Journal of neuroscience methods*, *285*, 82–96.
- Scott, I. C., Anson-Cartwright, L., Riley, P., Reda, D. & Cross, J. C. (2000). The HAND1 basic helix-loop-helix transcription factor regulates trophoblast differentiation via multiple mechanisms. *Molecular and cellular biology*, *20*(2), 530–541.
- Sepp, M., Kannike, K., Eesmaa, A., Urb, M. & Timmusk, T. (2011). Functional diversity of human basic helix-loop-helix transcription factor TCF4 isoforms generated by alternative 5' exon usage and splicing. *PloS one*, *6*(7), e22138.
- Shaw, P., Lalonde, F., Lepage, C., Rabin, C., Eckstrand, K., Sharp, W., Greenstein, D., Evans, A., Giedd, J. N. & Rapoport, J. (2009). Development of cortical asymmetry in typically developing children and its disruption in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Archives of general psychiatry*, *66*(8), 888–896.
- Silberberg, G., Baruch, K. & Navon, R. (2009). Detection of stable reference genes for real-time PCR analysis in schizophrenia and bipolar disorder. *Analytical biochemistry*, *391*(2), 91–97.
- Silver, N., Cotroneo, E., Proctor, G., Osailan, S., Paterson, K. L. & Carpenter, G. H. (2008). Selection of housekeeping genes for gene expression studies in the adult rat submandibular gland under normal, inflamed, atrophic and regenerative states. *BMC molecular biology*, *9*, 64.
- Skerjanc, I. S., Truong, J., Fillion, P. & McBurney, M. W. (1996). A splice variant of the ITF-2 transcript encodes a transcription factor that inhibits MyoD activity. *The Journal of biological chemistry*, *271*(7), 3555–3561.

- Skinner, M. K., Rawls, A., Wilson-Rawls, J. & Roalson, E. H. (2010). Basic helix-loop-helix transcription factor gene family phylogenetics and nomenclature. *Differentiation; research in biological diversity*, 80(1), 1–8.
- Sobrado, V. R., Moreno-Bueno, G., Cubillo, E., Holt, L. J., Nieto, M. A., Portillo, F. & Cano, A. (2009). The class I bHLH factors E2-2A and E2-2B regulate EMT. *Journal of cell science*, 122(Pt 7), 1014–1024.
- Søes, S., Sørensen, B. S., Alsner, J., Overgaard, J., Hager, H., Hansen, L. L. & Kristensen, L. S. (2013). Identification of accurate reference genes for RT-qPCR analysis of formalin-fixed paraffin-embedded tissue from primary non-small cell lung cancers and brain and lymph node metastases. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 81(2), 180–186.
- Soosaar, A., Chiaramello, A., Zuber, M. X. & Neuman, T. (1994). Expression of basic-helix-loop-helix transcription factor ME2 during brain development and in the regions of neuronal plasticity in the adult brain. *Brain research. Molecular brain research*, 25(1-2), 176–180.
- Sreenivasan, V., Esmaili, V., Kiritani, T., Galan, K., Crochet, S. & Petersen, C. (2016). Movement Initiation Signals in Mouse Whisker Motor Cortex. *Neuron*, 92(6), 1368–1382.
- Strominger, N. L., Demarest, R. J., Laemle, L. B. (2012). Cerebral Cortex. In: Noback's Human Nervous System, Seventh Edition. Humana Press, Totowa, NJ.
- Sun, T., Patoine, C., Abu-Khalil, A., Visvader, J., Sum, E., Cherry, T. J., Orkin, S. H., Geschwind, D. H. & Walsh, C. A. (2005). Early asymmetry of gene transcription in embryonic human left and right cerebral cortex. *Science (New York, N.Y.)*, 308(5729), 1794–1798.
- Sutterer, M. J., Kosciak, T. R. & Tranel, D. (2015). Sex-related functional asymmetry of the ventromedial prefrontal cortex in regard to decision-making under risk and ambiguity. *Neuropsychologia*, 75, 265–273.
- Tabin C. (2005). Do we know anything about how left-right asymmetry is first established in the vertebrate embryo?. *Journal of molecular histology*, 36(5), 317–323.

Tierney, G. & Simms, C. (2018). A Biomechanical Assessment of Direct and Inertial Head Loading in Rugby Union. Doktoritöö, Dublini Ülikool, Trinity kolledž. Võetud 24.05.2022: [https://www.researchgate.net/figure/The-four-lobes-which-form-the-cerebral-cortex-18\\_fig2\\_343307050](https://www.researchgate.net/figure/The-four-lobes-which-form-the-cerebral-cortex-18_fig2_343307050).

Zhuang, Y., Cheng, P. & Weintraub, H. (1996). B-lymphocyte development is regulated by the combined dosage of three basic helix-loop-helix genes, E2A, E2-2, and HEB. *Molecular and cellular biology*, 16(6), 2898–2905.

Zweier, C., Peippo, M. M., Hoyer, J., Sousa, S., Bottani, A., Clayton-Smith, J., Reardon, W., Saraiva, J., Cabral, A., Gohring, I., Devriendt, K., de Ravel, T., Bijlsma, E. K., Hennekam, R. C., Orrico, A., Cohen, M., Dreweke, A., Reis, A., Nurnberg, P. & Rauch, A. (2007). Haploinsufficiency of TCF4 causes syndromal mental retardation with intermittent hyperventilation (Pitt-Hopkins syndrome). *American journal of human genetics*, 80(5), 994–1001.

Wahl, M., Lauterbach-Soon, B., Hattingen, E., Jung, P., Singer, O., Volz, S., Klein, J. C., Steinmetz, H. & Ziemann, U. (2007). Human motor corpus callosum: topography, somatotopy, and link between microstructure and function. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(45), 12132–12138.

Wedel, M., Fröb, F., Elsesser, O., Wittmann, M., Lie, D., Reis, A. & Wegner, M. (2020). Transcription factor Tcf4 is the preferred heterodimerization partner for Olig2 in oligodendrocytes and required for differentiation. *Nucleic Acids Research*, 48(9), pp.4839-4857.

Weickert, C. S., Sheedy, D., Rothmond, D. A., Dedova, I., Fung, S., Garrick, T., Wong, J., Harding, A. J., Sivagnanansundaram, S., Hunt, C., Duncan, C., Sundqvist, N., Tsai, S. Y., Anand, J., Draganic, D. & Harper, C. (2010). Selection of reference gene expression in a schizophrenia brain cohort. *The Australian and New Zealand journal of psychiatry*, 44(1), 59–70.

Welniarz, Q., Dusart, I., Gallea, C. & Roze, E. (2015). One hand clapping: lateralization of motor control. *Frontiers in neuroanatomy*, 9, 75.

Williamson, P. D., Thadani, V. M., Darcey, T. M., Spencer, D. D., Spencer, S. S. & Mattson, R. H. (1992). Occipital lobe epilepsy: clinical characteristics, seizure spread patterns, and results of surgery. *Annals of neurology*, *31*(1), 3–13.

Wittmann, M. T., Katada, S., Sock, E., Kirchner, P., Ekici, A. B., Wegner, M., Nakashima, K., Lie, D. C. & Reis, A. (2021). scRNA sequencing uncovers a TCF4-dependent transcription factor network regulating commissure development in mouse. *Development (Cambridge, England)*, *148*(14), dev196022.

Wolpert, D., Goodbody, S. & Husain, M. (1998). Maintaining internal representations: the role of the human superior parietal lobe. *Nature Neuroscience*, *1*(6), 529-533.

Yao, X., Glessner, J. T., Li, J., Qi, X., Hou, X., Zhu, C., Li, X., March, M. E., Yang, L., Mentch, F. D., Hain, H. S., Meng, X., Xia, Q., Hakonarson, H. & Li, J. (2021). Integrative analysis of genome-wide association studies identifies novel loci associated with neuropsychiatric disorders. *Translational psychiatry*, *11*(1), 69.

Yoon, S. O. & Chikaraishi, D. M. (1994). Isolation of two E-box binding factors that interact with the rat tyrosine hydroxylase enhancer. *The Journal of biological chemistry*, *269*(28), 18453–18462.

# LIHTLITSENTS

## Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Carolin Kuuskmäe

(sünnikuupäev: 17. detsember 1996)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihlitsentsi) minu loodud teose

„Transkriptsioonifaktor TCF4 lateraliseeritus hiire ja inimese ajus“,

mille juhendajad olid PhD Mari-Anne Philips, PhD Kersti Lilleväli, PhD Tambet Tõnissoo,

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

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, alates **30.05.2025** kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

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

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

Carolin Kuuskmäe

**30.05.2022**

