

Tartu Ülikool
Bioloogia-Geograafiateaduskond
Zooloogia ja Hüdrobioloogia Instituut

Hendrik Luuk

**Wolframin'i ja karboksüpeptidaas E ekspressiooni koregulatsioon
roti mandelkehas vastusena hirmureaktsioonile ja interaktsioon
rakukultuuris**

Magistritöö arengubioloogias

Juhendajad: Sulev Kõks, M.D., Ph.D.
Alar Karis, Ph.D.

Tartu 2004

Sisukord

Sisukord	2
Lühendid ja mõisted.....	3
Sisukokkuvõte.....	4
Abstract	5
1. Sissejuhatus.....	6
2. Ülevaade	7
2.1 Wfs1.....	7
2.2 Karboksüpeptidaas E	9
3. Eesmärk.....	12
4. Materjalid ja meetodid	13
4.1 Katseloomad ja käitumiskatsed	13
4.2 Võrdlev geeniekspressioonianalüüs	14
4.3 Kloonide <i>dot-blot</i> analüüs	16
4.4 Pöördtranskriptsioon-PCR reaktsioon (RT-PCR)	17
4.5 DNA konstruktid	18
4.6 Koekultuur	19
4.7 Immunopretsipitatsioon	20
4.8 Immunoanalüüs (<i>Western blot</i>)	20
4.9 Immunofluorestsentsmikroskoopia	21
5. Tulemused.....	21
5.1 Hirmureaktsiooni mõjul mandelkehas indutseeritud geenid	21
5.2 Wolframin'i ja karboksüpeptidaas E interaktsioon cos-7 rakkudes	24
Arutelu	27
Järeldused.....	29
Tänuavaldused	30
Kasutatud kirjandus	31
Lisa 1 – publitseeritud artikli äratrükk.....	37

Lühendid ja mõisted

Arg	arginiin
C-terminus	karboksüülterminus
CPE	karboksüpeptidaas E (<i>carboxypeptidase E</i>)
CPE ^{fat/fat} hiired	karboksüpeptidaas E puudulikkusega hiireliin
CPD	karboksüpeptidaas D (<i>carboxypeptidase E</i>)
cos-7	aafrika rohepärdiku neerukasvaja rakuliin
DIDMOAD	magediabeet, suhkrudiabeet, nägemisnärv atroofia, kurtus (<i>Diabetes Insipidus, Diabetes Mellitus, Optic Atrophy, Deafness</i>) = Wolfram'i sündroom
<i>Dot-blot</i>	membraanile immobiliseeritud DNA hübridisatsioonanalüüs
ER	endoplasmaatiline retiikulum
FITC	fluorestseeritud isotsüanaat
GAPDH	glütseeraldehüd-3-fosfaadi dehüdrogenaas
HRP	mädarõika peroksüdaas (<i>horseradish peroxidase</i>)
IgG	immunoglobuliin gamma
Lys	lüsiin
N-terminus	aminotermiinus
PC1	prohormoonikonvertaas 1 (proprotein convertase 1)
PC2	prohormoonikonvertaas 2 (proprotein convertase 2)
PCR	polümeraasi ahelreaktsioon (<i>polymerase chain reaction</i>)
Pro	proliin
RDA	võrdlev geeniekspressioonianalüüs (<i>representational difference analysis</i>)
RSP	reguleeritud sekretoorne rada (<i>regulated secretory pathway</i>)
RT-PCR	pöördtranskriptsioon polümeraasi ahelreaktsioon (<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>)
Ser	seriin
<i>tag</i>	afiinsusmärgis
<i>Western blot</i>	membraanile immobiliseeritud valkude immunoanalüüs
Wfs1	Wolfram'i sündroomi põhjustav geen 1 (<i>Wolfram syndrome 1</i>)
wolframin	Wfs1 geeni poolt kodeeritud valk

Sisukokkuvõte

Mutatsioonid *Wfs1* geenis põhjustavad haruldast geneetilist haigust - Wolfram'i sündroomi (MIM #222300). See on pärilik haigus, mida iseloomustab juveniilne mitteautoimmuunne suhkruhaigus, magedihaigus, nägemisnärv atroofia ja kurtus (DIDMOAD – *diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy, deafness*). *Wfs1* geeni mutatsiooni kandjatel on suurenenud risk haigestuda psühhiaatrilistesse haigustesse. Wolfram'i sündroomiga patsientidel on leitud häireid mitmete peptiidsete prohormoonide protsessingus.

Wfs1 geeni produkt (wolframin) on endoplasmaatilisse retiikulumi lokaliseeruv transmembraanne valk, mille funktsioon on ebaselge. Karboksüpeptidaas E on paljude peptiidsete prohormoonide aktiveerimises osalev ensüüm. Lähtuvalt Wolfram'i sündroomiga kaasnevast laiaulatuslikust neuroendokriinkudede düsfunktsioonist, on karboksüpeptidaas E üks võimalik kandidaat, mille düsregulatsiooni kaudu sellised häired võivad Wolfram'i sündroomiga patsientidel tekkida. Käesolevas töös tuvastasime *Wfs1* ja karboksüpeptidaas E üleekspressiooni roti mandelkehas vastusena kassilõhna poolt tingitud hirmureaktsioonile. Koimmunopretsipitatsioonikatse rakukultuuris transitoorselt ekspresseeritud N-terminaalsete wolframin'i (aminohapped 1-310) ja karboksüpeptidaas E (aminohapped 78-280) fragmentidega näitas, et wolframin ja karboksüpeptidaas E interakteeruvad omavahel. Käesoleva töö tulemused osutavad sellele, et wolframin võib osaleda karboksüpeptidaas E aktiveerimisel ja loovad aluse edasisteks uuringuteks wolframin'i funktsiooni täpsemaks selgitamiseks.

Abstract

Mutations in the *Wfs1* gene are responsible for Wolfram syndrome (MIM #222300), a rare, hereditary disorder characterized by juvenile onset non-autoimmune diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy and deafness (DIDMOAD). *Wfs1* mutation carriers have increased risk for developing psychiatric disorders. Defects in the processing of several peptide prohormones have been implicated in Wolfram syndrome patients. Carboxypeptidase E is an enzyme involved in the activation of various peptide prohormones. Since Wolfram syndrome is characterized by widespread dysfunction of neuroendocrine tissues, dysregulation of carboxypeptidase E could account for the impairments found in Wolfram syndrome patients. In the present thesis we have identified the overexpression of *Wfs1* and carboxypeptidase E in the amygdala of rats in response to cat-odor induced fear reaction. Coimmunoprecipitation experiments in cell culture revealed an interaction between transiently expressed N-terminal fragments of wolframin aminoacids 1-310 and carboxypeptidase E aminoacids 78-280. The results of the present work suggest that wolframin might be involved in the activation of carboxypeptidase E and establish a foundation for further studies into the function of wolframin protein.

1. Sissejuhatus

Käesolev magistritöö koosneb kahest osast: töö esimeses osas käsitletakse geeniekspressiooni võrdlevat analüüsi rottide mandelkehas (*amygdala*) vastusena kassilõhna poolt tingitud hirmureaktsioonile; töö teiseks osaks on esimeses katses hirmureaktsiooni poolt indutseeritud geenide *wfs1* ja karboksüpeptidaas E valkproduktide interaktsiooni uurimine rakukultuuris. Käesoleva töö esimene osa tulemused on avaldatud ajakirjas *Genes, Brain and Behavior* käesoleva aasta aprillis ilmunud artiklis „*A screen for genes induced in the amygdaloid area during cat odor exposure*“ (Kõks *et al.*, 2004).

Mandelkeha on subkortikaalne ajustruktuur, millel on oluline roll emotsionaalse käitumise regulatsioonis. Mandelkeha kahjustused põhjustavad nii inimestel kui rottidel häireid seoste õppimisel ohule viitavate stiimulite ja seda olukorda vältiva käitumise vahel (Le Doux, 1998). Kuna teadmised negatiivsete emotsioonide biokeemilistest ja neurobioloogilistest mehhanismidest on puudulikud, oli käesoleva töö esimese osa eesmärk identifitseerida kandidaatgeenid, mis osalevad hirmureaktsiooniga seotud protsesside regulatsioonis mandelkehas. Käesolevas töös kasutasime rottidel hirmureaktsiooni tekitamiseks mittetingitud hirmu mudelit, milleks on kassilõhna poolt põhjustatud hirmureaktsioon. Kiskjalõhna poolt tingitud hirmureaktsioon on kaasasündinud ja evolutsiooniliselt tugevalt konserveerunud käitumuslik vastus (Panksepp, 1998). Juba väga lühiajaline (5 minutit) rottide eksponeerimine kassile või kassi lõhnale põhjustab hüpotalamo-hüpofüsaar-adrenaaltelje aktivatsiooni, millega kaasneb stressiregulatsiooniga seotud hormoonide sekretsiooni suurenemine (File *et al.*, 1993).

Käesoleva uurimuse teises osas sooritasime koimmunoprecipitatsioonikatse tuvastamiseks karboksüpeptidaas E ja wolframin valkude omavahelist interaktsiooni. Kuna töö esimeses osas õnnestus meil tuvastada neid valke kodeerivate mRNA-de ekspressiooni koregulatsioon roti mandelkehas vastusena hirmureaktsioonile, tekkis hüpotees, et wolframin võib osaleda karboksüpeptidaas E aktivatsioonil ja selle kaudu mõjutada neuroendokriinkudede talitlust. Wolframin'i inaktiveerivad mutatsioonid

homosügootses seisus põhjustavad inimestel geneetilist haigust, mida kutsutakse Wolfram'i sündroomiks või DIDMOAD'iks (*diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy, deafness*) (Wolfram & Wagener, 1938). Wolfram'i sündroom on haruldane geneetiline haigus, mida iseloomustab raske progresseeruv ja selektiivne neuroendokriinkudede taandareng, mille tagajärjel võivad kujuneda erineval määral magediabeet, suhkruabeet, kurtus, nägemisnärv atroofia, kusetrakti atoonia ja erinevad psühhiaatrilised häired. Karboksüpeptidaas E on neuroendokriinkudedes ekspresseeruv ensüüm, mis osaleb paljude peptiidhormoonide ja neuropeptiidide bioaktivatsioonil. Neuropeptiidid on kuni mõnekümne aminohappe suurusel signaalmolekulid, mis osalevad erinevate käitumisreaktsioonide ja aistingute regulatsioonis nagu söögiisu (leptiin, neuropeptiid Y, galaniin, oreksiin), emotsionaalne käitumine (koletsüstokiniin, opioididid), valu (opioididid, koletsüstokiniin, melanokortiin, notsitseptiin) jms. Regulatsioonihäired peptiidhormoonide insuliini ja vasopressiini protsessingus ja sekretsioonis on seotud suhkruabeedi ja magediabeedi kujunemisega.

2. Ülevaade

2.1 Wfs1

Wfs1 on enimuuritud kandidaatgeeniks Wolfram'i sündroomi tekkel. Wolfram'i sündroom (MIM #222300) on haruldane pärilik haigus, mida iseloomustab suhkruabeet, magediabeet, nägemisnärv atroofia ja kurtus (DIDMOAD – *diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy, deafness*). Haigust kirjeldati esmakordselt 1938 aastal Wolfram'i ja Wagener'i poolt kui juveniilset suhkruabeeti koos nägemise tugeva nõrgenemisega (Wolfram & Wagener, 1938). Ainult insuliin-sõltuva diabeedi ja bilateraalse progresseeruva nägemisnärv atroofia olemasolu on piisav Wolfram'i sündroomi diagnoosimiseks. Lisaks endokrinoloogilistele häiretele on Wolfram'i sündroomile iseloomulikud ka neurodegeneratiivsed tunnused, eelkõige nägemise nõrgenemine nägemisnärv atroofia tagajärjel ja kurtuse tekkimine. Kirjeldatud on ka nüstagme, vaimset arengupeatust, dementsust, kusetrakti atooniat, ataksiat, perifeerset neuropaatiat, epilepsiat ning psühhiaatrilisi häireid (Swift, Sadler

& Swift, 1990; Swift *et al.*, 1991). Ligikaudu 60% -l Wolfram'i sündroomiga haigetest on kirjeldatud sügava depressiooni episoodi, psühhoose või orgaanilist ajukahjustust (Swift *et al.*, 1991). Heterosügootseid Wolfram'i sündroomi kandjaid on Ameerika Ühendriikide populatsioonis hinnanguliselt umbes 1% (Swift *et al.*, 1991). Wolfram'i sündroomi kandjatel on kirjeldatud 26 korda suuremat riski haigestuda psühhiaatrilistesse haigustesse (Swift *et al.*, 1998). Praeguseks on leitud, et psühhiaatriline patoloogia kaasneb peaaegu alati Wolfram'i sündroomiga (Strom *et al.*, 1998). Psühhiaatrilise häire avaldumine võib olla mitmekülgne, kuid juhtivaks on rasked meeleoluhäired. Tuumamagnetresonantsuuringud Wolfram'i sündroomiga patsientidel on näidanud laiaulatuslikke atroofilisi muutusi üle terve aju (Rando, Horton & Layzer, 1992). Lisaks nimetatule esineb Wolfram'i sündroomiga patsientidel ka hematoloogilisi häireid (al-Sheyyab *et al.*, 2001). Kooskõlas Wolfram'i sündroomi heterogeense kliinilise pildiga, on geneetiliste aheldusuuringute tulemusena leitud lisaks Wfs1 geeni lookusele 4p16.1, teine kandidaatlookus 4q22-24 (Wfs2), kus ei ole seni haigust põhjustavat geeni tuvastatud (El-Shanti *et al.*, 2000).

Wfs1 geen paikneb inimesel neljanda kromosoomi 4p16.1 regioonis, koosneb kaheksast eksonist ja geeni kogupikkuseks on 33,4 tuhat aluspaari (Strom *et al.*, 1998; Inoue *et al.*, 1998). Wfs1 geeni produkt (edaspidi wolframin) on 890 aminohappe suurune ja umbes 100 kDA molekulmassiga valk (Strom *et al.*, 1998), mis on homoloogne *Drosophila Melanogaster*'i valguga CG4917 (NP_651079) ja *Anopheles gambiae* valguga 1274554 (XP_313695), millede funktsioon on seni teadmata. Roti ja hiire wolframin'i aminohappeline järjestus on 86% ulatuses sarnane inimese omale. Wolframin asub endoplasmaatilise retiikulumi membraanis 9 transmembraanse segmendi abil (aminohapped 330-650), kusjuures aminotermiinus ulatub tsütoplasmasse ja karboksüülterminus endoplasmaatilise retiikulumi luumenisse (Hofmann *et al.*, 2003). Wolframin on endoglükosidaas H tundlik ja natiivsetes tingimustes moodustab 400 kDA molekulmassiga arvatavasti homotetrameerseid komplekse (Takeda *et al.*, 2001; Hofmann *et al.*, 2003). Wolframin ekspresseerub paljudes kudedes, eriti kõrge on ekspressioonitase ajus, südames, kopsus ja neurosekretoorsetes kudedes, sealhulgas insuliini sekreteerivates pankrease β -rakkudes (Inoue *et al.*, 1998; Strom *et al.*, 1998). Ajus on wolframin ekspresseerunud eelkõige hippokampuses, mandelkehas, haistesibulas ning allokorteksis (Takeda *et al.*,

2001). Uurimused on näidanud, et wolframin osaleb rakusiseses Ca^{2+} homeostaasi regulatsioonis ja mõjutab insuliini sekreteerivate β -rakkude elulemust nii rakukultuuris kui *in vivo* Wfs1 puudulikkusega hiirtel (Osman *et al.*, 2003; McBain & Morgan, 2003; Ishihara *et al.*, 2004). Wolfram'i sündroomiga patsientide lahangumaterjali uurimisel leiti, et nendel oli *nucleus supraopticus*'es ja *nucleus paraventricularis*'es vasopressiini protsessing puudulik (Gabreels *et al.*, 1998). Häired vasopressiini aktiivsuses on otseseks põhjuseks magediabeedi (*diabetes insipidus*) kujunemisel (Siggaard *et al.*, 1999). Seega on võimalik, et wolframin'i funktsiooniks on peptiidseid prohormoone protsessivate ensüümide, nagu prohormooni konvertaas 1 (PC1), prohormooni konvertaas 2 (PC2), karboksüpeptidaas E (CPE), karboksüpeptidaas D (CPD) aktiveerimine. Kuna samad ensüümid osalevad ka proinsuliini protsessingus, on selle mehhanismiga võimalik seletada ka suhkruabeedi teket ja selektiivset β -rakkude degeneratsiooni. Kuna Wolfram'i sündroomiga kaasneb väga sageli psühhiaatriline patoloogia, on põhjust arvata, et wolframin mõjutab ka peptiidsete neurotransmitterite sünteesil osalevate ensüümide aktiivsust. Oma eelnevates katsetes oleme tuvastanud Wfs1 geeni üleekspressiooni rottide mandelkehas vastusena kassilõhna poolt tingitud hirmureaktsioonile (Köks *et al.*, 2002).

2.2 Karboksüpeptidaas E

Üheks enimuuritud peptiidhormoone ja neuropeptiide protsessivaks ensüümiks on karboksüpeptidaas E. CPE on teada kui paljude peptiidsete neuromediaatorite aktiveerija närvikoes, samuti on näidatud CPE osalemist insuliini posttranslatsioonilises töötlemises (Cawley *et al.*, 2003; Polastri *et al.*, 2002).

Endokriinrakkudes on peptiidhormoonide süntees ja sekretsioon täpselt reguleeritud. Paljud peptiidhormoonid ja neid protsessivad ensüümid (endopeptidaasid, eksopeptidaasid) sünteesitakse alguses suuremate eellasmolekulidena, mis trans-Golgi võrgustikus suunatakse reguleeritud sekretoorsesse ratta (RSP). Trans-Golgi võrgustikus aset leidva sorteerimisprotsessi käigus eraldatakse RSP-sse määratud valgud konstitutiivselt sekreteeritavatest ning lüsoosoomi valkudest ja pakitakse punguvatesse ebaküpsetesse sekretoorsetesse graanulitesse. Sellistes graanulites

toimub prohormoonide endoproteolüüs, mille tulemusena tekivad erinevad peptiidhormoonid, mida säilitatakse küpsetes sekretoorsetes graanulites ja eksotsüteeritakse Ca^{2+} -vahendatud stimulatsioonil. Paljude peptiidhormoonide aktiveerimine jätkub küpsetes sekretoorsetes graanulites, kus eksopeptidaasid eemaldavad peptiidide N- või C-terminusest mõned aminohappejäägid, muutes peptiidhormoonid bioloogiliselt aktiivseteks signaalmolekulideks.

Karboksüpeptidaas E (samuti tuntud kui karboksüpeptidaas H ja enkefaliini konvertaas) on metallokarboksüpeptidaas, mida leidub ajus, ajuripatsis, pankrease saarekestes ja muudes endokriinkudedes (Fricker & Snyder, 1983). Rakkudes lokaliseerub CPE trans-Golgi võrgustikku ja peptiide sisaldavatesse küpsetesse sekretoorsetesse graanulitesse, mis on kooskõlas tema funktsiooniga peptiidhormoonide ja peptiidsete neurotransmitterite modifitseerimisel (Fricker & Snyder, 1983; Docherty & Hutton, 1983). CPE eellasmolekul on 55 kDa molekulmassiga ja 476-st aminohappest koosnev valk, mis sisaldab 27 aminohappelist N-terminaalset signaaljärjestust ja sellele järgnevat 15 aminohappelist aktivatsioonipeptiidi, mille proteolüütilisel eemaldamisel ensüüm aktiveeritakse. CPE C-terminaalsed hüdrofoobsed aminohapped 457-470 seostuvad sekretoorsetes graanulites valitsevas happelises keskkonnas (pH 5.5) graanulite membraaniga ja C-terminaalsed aminohapped 472-476 on eksponeeritud sekretoorsete graanulite pinnal tsütoplasmasse (Fricker, Das & Angeletti, 1990; Dhanvantari *et al.*, 2002). Lisaks membraanseotud vormile esineb CPE ka 53 kDa molekulmassiga lahustuva vormina, mis tekib membraanseotud vormi endoproteolüüsil sekretoorsetes graanulites ja omab membraanseotud vormiga võrreldes umbes 2 korda suuremat karboksüpeptidaasest aktiivsust (Fricker, 1988). Erinevates kudedes on membraanseotud ja lahustuva vormi vahekord erinev, kuid üldiselt on lahustunud vormi osakaal sekretoorsetes graanulites 60-80% (Fricker, 1988).

CPE-I on leitud kaks erinevat, kuid omavahel seotud funktsiooni: esiteks on ta reguleeritud sekretoorse raja sorteerimisretseptor, mis võimaldab mitmetel prohormoonidel (näiteks proenkefaliin, proopiomelanokortiin, proinsuliin) siseneda sekretoorsetesse graanulitesse ja suunduda RSP-sse (Normant & Loh, 1998; Cool *et al.*, 1997). On näidatud, et CPE aminohappejäägid Arg₂₅₅ ja Lys₂₆₀ interakteeruvad proopiomelanokortiiniga, soodustades selle sorteerimist RSP-sse (Zhang, Snell &

Loh, 1999). Teisalt on CPE kui univeraalse prohormoonide sorteerija hüpoteesi kritiseeritud, kuna tema stöhhiomeetria RSP-sse sorteeritava materjali koguse suhtes on liiga väike (Eisenbarth, 2004). Alternatiivina pakutakse välja hüpotees, et CPE või teised prohormoonid protsessivad ensüümid käituvad nukleatsioonipunktidenä RSP-sse määratud valkude agregatsioonil või eelnevalt agregeerunud prohormoonide kinnitumissaitidenä (Eisenbarth, 2004).

Teiseks eemaldab CPE paljude endoproteolüütiliselt lõigatud prohormoonide karboksüülterminusest aluselisi aminohappeid (tavaliselt C-terminaalsed Lys või Arg), muutes need peptiidid bioloogiliselt aktiivseteks signaalmolekulideks (Fricker & Snyder, 1983). Lähtuvalt membraanseotud ja lahustuva vormi erinevatest biokeemilistest omadustest, arvatakse, et membraanseotud vorm funktsioneerib eelkõige prohormooni sorteerimisretseptorinä trans-Golgi's ja lahustuv vorm on sekretoorsetes graanulites prohormoonid aktiveerivaks ensüümiks (Song & Fricker, 1995). Hiireliinil CPE^{fat/fat}, kellel on CPE inaktiveeritud Ser₂₀₂→Pro mutatsiooni tagajärjel, on suurenenud paljude peptiidhormoonide ja neuropeptiidide ellasmolekulide kontsentratsioon ja samal ajal vähenenud lõpuni protsessitud aktiivsete peptiidide osakaal (Fricker *et al.*, 1996; Che *et al.*, 2001). Kuigi CPE^{fat/fat} hiirtel on CPE täiesti inaktiveerunud, leidub neil siiski ka lõpuni protsessitud variante peptiididest, mida CPE protsessib (Che *et al.*, 2001). Seega peab leiduma veel teisi karboksüpeptidaase, mis omavad CPE-ga sarnast aktiivsust. Üheks selliseks kandidaadiks on karboksüpeptidaas D (CPD), mis esineb ainult membraanseotud vormis ja lokaliseerub trans-Golgisse, mis on reguleeritud sekretoorse raja alguspunktiks (Dong, Fricker & Day, 1999). CPE^{fat/fat} hiirte uurimisel on selgunud, et CPE aktiivsuse puudumine vähendab ka teiste prohormoonid protsessivate ensüümide aktiivsust (prohormooni konverteasid 1 ja 2) (Berman *et al.*, 2001). See teostub arvatavasti läbi negatiivse tagasiside mehhanismi, kus CPE poolt protsessimata propeptiidide vaheproduktid inhibeerivad prohormooni konvertease, mis asuvad propeptiidide protsessingurajas CPE-st eespool. Üheks selliseks näiteks on proSAAS, mis inhibeerib prohormooni konverteas 1 (Fricker *et al.*, 2000).

3. Eesmärk

Kuna teadmised negatiivsete emotsioonide biokeemilistest ja neurobioloogilistest mehhanismidest on puudulikud, oli käesoleva töö esimese osa eesmärk identifitseerida kandidaatgeenid, mis osalevad hirmureaktsiooniga seotud protsesside regulatsioonis mandelkehas. Töö teise osa eesmärk oli tuvastada hirmureaktsiooni mõjul indutseeritud kahe geeni valkproduktide (wolframin ja CPE) interaktsioon rakukultuuris. Lähtuvalt Wolfram'i sündroomiga kaasnevast laiaulatuslikust neuroendokriinkudede düsfunktsioonist, on CPE üks võimalik kandidaat, mille düsregulatsiooni kaudu sellised häired Wolfram'i sündroomiga patsientidel võivad tekkida. Seetõttu on väga oluline selgitada, kas ja millisel moel wolframin mõjutab CPE aktiivsust. Kaks võimalikku hüpoteesi võiksid olla:

- A. wolframin osaleb otseselt või kaudselt (näiteks šaperonide mõjutamise kaudu) CPE aktiveerumiseks vajaliku N-terminaalse aktivatsioonipeptiidi eemaldamisel.
- B. wolframin on sorteerimisretseptor, mis suunab CPE reguleeritud sekretoorsesse ratta ja wolframin'i funktsiooni puudumine takistab CPE sattumist sekretoorsetesse graanulitesse, millega kaasnevad häired peptiidhormoonide ja neuropeptiidide protsessingus.

Esimesele hüpoteesile on nii poolt- kui vastuargumente. Vastuargumendiks on tulemused, et proCPE protsessing toimub peamiselt sekretoorsetes graanulites, aga wolframin lokaliseerub endoplasmaatilise retiikulumi membraani (Song & Fricker, 1995). Samas on allikaid, kus väidetakse, et CPE prodomeeni äralõikamine on kiire protsess, mis toimub arvatavasti ER'i tasemel (Eisenbarth, 2004).

Märgitud hüpoteeside kontrollimiseks pidasime vajalikuks esmajärjekorras selgitada, kas on võimalik näidata wolframin'i ja CPE omavahelist interaktsiooni füsioloogilistes tingimustes. Selleks valisime koimmunopretsipitatsiooni meetodi cos-7 rakukultuuris, kus on transitoorselt ekspresseeritud afiinsusmärgitud (*tag*'itud) fragmendid mõlemast valgust. Wolframin'i ekspressioonikonstruktsiks valisime N-terminaalseid aminohappeid 1-310 kodeeriva osa hiire Wfs1 cDNA-st, kuna see on

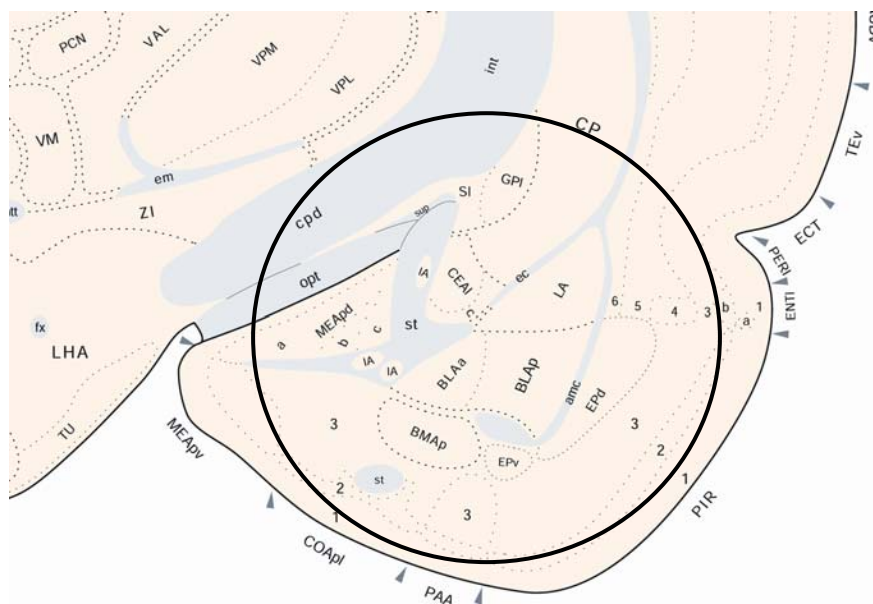
eksponeeritud tsütoplasmasse, kus ta võib interakteeruda teiste tsütoplasmaatiliste valkudega. Kuue miljoni klooni skriinimisega pärmi kaksikhübridi mudelis näidati, et wolframin'i karboksüterminaalseid aminohappeid kodeeriv lühendatud valk ei interakteeru CPE-ga (Minton, 2003). Kuigi teaduskirjanduses sellele viited puuduvad, on tehtud pärmi kaksikhübridi skriiningu katse ka inimese wolframin'i N-terminaalseid aminohappeid 1-306 ja 1-135 kodeerivate cDNA fragmentidega, mille käigus tuvastati ühe interaktsioonipartnerina inimese CPE aminohappeid 78-280 kodeeriv kloon (Hiebsch, 2002). Seetõttu otsustasime immunopretsipitatsioonikatseks kasutada hiire CPE sama piirkonda kodeerivat DNA-konstrukti.

4. Materjalid ja meetodid

4.1 Katseloomad ja käitumiskatsed

Katseloomadeks olid isased Wistar liini rotid (Han/Kuo: WIST) kehakaaluga 250-280. Katseloomi hoiti kuuekaupa standardsetes polüpropüleenpuurides kontrollitud õhutemperatuuri (21 ± 2 °C) ja 12-tunnise valge/pime tsükliga ruumis (valgus lülitati sisse 7.00). Joogivesi ja toidugraanulid on loomadele vabalt kättesaadavad. Kõik loomadega läbiviidud protseduurid olid kooskõlastatud Tartu Ülikooli Loomkatsete Komiteega vastavalt Euroopa Ühenduse direktiivile 24 novembrist 1986 (86/609/EEC). Eksperimendi jaoks jagati loomad kahte kaheteistkümneme isendiga gruppi. Esimese rühma loomadele pandi puuri peale kassi lõhnaga riidetükk, teisele rühmale puhas riidetükk. Loomi eksponeeriti riidetükile 30 minutit, samal ajal salvestati nende käitumine videokassetile. Katse viidi läbi kahes eraldi ruumis, kus olid sarnased õhutemperatuuri, ventilatsiooni ja valgustingimused. Mõlema rühma loomi harjutati 3 päeva enne eksperimenti katseruumiga. Videosalvestise alusel käitumise hindamine viidi läbi eksperimentaatori poolt, kes ei olnud teadlik loomadega läbiviidud protseduuridest. Käitumise hindamiseks peatati videosalvestis iga minuti järel ja märgiti üles riidetükki nuusutavate, riidetüki läheduses viibivate või riidetükki puudutavate loomade arv. Samuti märgiti üles oma karvkatet puhastavate loomade arv. Statistiline andmetöötlus viidi läbi Mann-Whitney U-testiga kasutades *Statistica for Windows 5* programmi. Mann-Whitney U-test on mitteparameetiline

statistiline meetod (ei eelda mõõtmistulemuste vastamist normaaljaotusele), mis võimaldab hinnata kahe rühma keskmiste erinevust. Pärast käitumiskatset loomad dekapiteeriti ja ajust tehti koronaarlõigud. Mandelkeha dissekteeriti ringikujulise mulgustajaga vastavalt roti ajuatlasele (Swanson, 1998). Mandelkeha preparaadid sisaldasid mandelkeha basolateraalsel, tsentraalsel ja mediaalsel tuuma (joonis 1). Kuuelt loomalt saadud koeproovid pandi kokku, et vähendada individuaalsetest erinevustest tulenevaid kõikumisi geeniekspressioonis.



Joonis 1. Mandelkeha prepareerimine. BLAa – mandelkeha basolateraalse tuuma anteriorne osa; BLAp – mandelkeha basolateraalse tuuma posteriorne osa; BMAp - mandelkeha basomedialse tuuma posteriorne osa; CEAl – mandelkeha tsentraalse tuuma lateraalne osa; LA – mandelkeha lateraalne tuum; MEApd – mandelkeha mediaalse tuuma posterodorsaalne osa

4.2 Võrdlev geeniekspressioonianalüüs

Geeniekspressiooni võrdlev analüüs viidi läbi kasutades *cDNA Representational Difference Analysis (cDNA-RDA)* meetodit väikeste modifikatsioonidega (Hubank & Schatz, 1999; Pastorian, Hawel & Byus, 2000; O'Neill & Sinclair, 1997). cDNA RDA on polümeraasi ahelreaktsioonil (PCR) põhinev subtraktiivse hübriidatsiooni meetod, mille abil on võimalik tuvastada erineval tasemel ekspresseerunud gene kahe cDNA populatsiooni vahel. cDNA RDA puhul rikastatakse PCR'i abil kahes cDNA populatsioonis erinevalt ekspresseerunud geenide cDNA-d, samal ajal

elimineerides võimalikult suurel määral võrdselt ekspresseerunud geenide cDNA transkriptid. See saavutatakse PCR amplifikatsiooniga pärast erinevate adapteritega testrühma ja võrdlusrühma cDNA fragmentide hübridisatsiooni (anniilingut). Praimerid amplifikatsiooniks on valitud nii, et eksponentsiaalselt amplifitseeruksid ainult testrühma cDNA dupleksid (võrdlusrühmaga võrreldes kõrgemalt ekspresseerunud geenide cDNA-d), testrühma ja võrdlusrühma cDNA dupleksid amplifitseeruvad lineaarselt (mõlemas populatsioonis võrdsel määral ekspresseerunud geenide cDNA-d) ja võrdlusrühma cDNA dupleksid ei amplifitseeru (võrdlusrühmas üleekspresseerunud geenide cDNA-d). Mainitud loogikast lähtudes tehakse RDA analüüs alati kahes suunas: „edasi“ suunatud RDA puhul rikastatakse testrühmas kõrgemalt ekspresseerunud geenide cDNA-d; „tagasi“ suunatud RDA puhul rikastatakse võrdlusrühmas kõrgemalt ekspresseerunud geenide transkriptid. Kuna tegemist ei ole kahe cDNA populatsiooni vahel absoluutseid erinevusi tuvastava meetodiga, jääb RDA eelkõige kvalitatiivseks meetodiks, mis võimaldab ilma eelnevaid hüpoteese püstitamata tuvastada suvalisi erineval tasemel ekspresseerunud gene. Kuna RDA käigus toimub algse cDNA amplifikatsioon ja rikastamine meile soovitud suunas, ei pruugi kõik identifitseeritud geenide transkriptid olla tegelikult erinevalt ekspresseerunud, sest subtraktsioon ei ole kunagi 100%-line. Seetõttu on oluline teiste geeniekspressiooni taseme tuvastamise meetoditega kontrollida saadud tulemuste paikapidavust.

Koeproovidest eraldati mRNA (QIAGEN RNeasy ja Oligotex mRNA kit; Hilden, Saksamaa), seejärel sünteesiti cDNA (Superscript Choice System for cDNA synthesis kit; Gibco BRL, UK). Võrdlev geeniekspressioonianalüüs viidi läbi kahes suunas: „edasi“ subtraktsiooni katses oli testrühmaks (*tester*) kassilõhnale eksponeeritud loomad ja võrdlusrühmaks (*driver*) kontrollgrupp; „tagasi“ subtraktsioonikatses oli testrühmaks kontrollgrupp ja võrdlusrühmaks kassilõhnale eksponeeritud loomad. Kaheahelaline cDNA restrikteeriti DpnII-ga (New England Biolabs, USA) ja ligeeriti anniilunud R-adapterite külge (praimerite järjestused on toodud tabelis 1). cDNA amplikonid (amplifitseeritud cDNA) testrühma ja võrdlusrühma jaoks sünteesiti Vent DNA-polümeraasiga (New England Biolabs, USA). Testrühma amplikon sünteesiti viie 200 µL-se mahuga PCR reaktsiooniga, võrdlusrühma amplikon sünteesiti kahekümne samasuure mahuga PCR reaktsiooniga. DpnII abil eemaldati amplikonis R-adapterid ja seejärel ligeeriti J-adapterid. Subtraktiivne hübridisatsioon viidi läbi

5µL mahus 67 °C juures 24 tunni jooksul PCR'i masinas. Igale subtraktiivse hübridisatsiooni etapile järgnes PCR reaktsioon, mille käigus amplifitseerisid eksponentsiaalselt ainult testrühma cDNA dupleksid: 1 min 95 °C, 3 min 70 °C x 10 tsüklit; 10 min lõppekstensioon 72 °C . Et luua erinevusprodukt 1 (DP1), segati 0.4 µg testrühma amplikoni cDNA-d 40 µg kontrollrühma amplikoni cDNA-ga (suhe 1:100). DP1-l eemaldati J-adapterid DpnII restriksioonil ja ligeeriti N-adapterid. Erinevusprodukt 2 (DP2) loomiseks segati 50 ng DP1 ja 40 µg võrdlusrühma cDNA-d (suhe 1:800). DP2 restrikteeriti DpnII-ga, et eemaldada N-adapterid, mille järel ligeeriti J-adapterid. Et luua erinevusprodukt 3 (DP3), segati 100 pg J-adapteritega DP2 40 µg võrdlusrühma cDNA-ga (suhe 1:400 000). Paralleelselt tehti teine leebemate tingimustega subtraktsiooniekperiment, kus segati 4 ng DP2 40 µg võrdlusrühma cDNA-ga (suhe 1:10 000). DP3 restrikteeriti DpnII-ga, et eemaldada J-adapterid ja puhastati Qiagen PCR Purification Kit'iga. Puhastatud DP3 cDNA fraktsioneeriti suuruse alusel 1.5% TBE agarosgeelis ja fraktsioonid puhastati ränimaatrikskolonnil (QIAEX II Gel Extraction Kit; Qiagen, Hilden, Saksamaa). Puhastatud fraktsioonid ligeeriti pGem7-Zf(+) vektori (Promega) BamHI äratundmisjärjestusse. Saadud kloonid sekveneeriti ABI Prism Genetic Analyzer ABI310 DNA sekvenaatoriga (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) ja järjestused identifitseeriti nukleotiidsete ja valgujärjestuste joondamisalgoritmiga Blast (Basic local alignment search tool).

Nimi	Praimeri järjestus
R-Bgl-24	5'-AGCACTCTCCAGCCTCTCACCGCA
R-Bgl-12	5'-AGCACTCTCCAGCCTCTCACCGCA
J-Bgl-24	5'-ACCGACGTCGACTATCCATGAACA
J-Bgl-12	5'-GATCTGTTTCATG
N-Bgl-24	5'-AGGCAACTGTGCTATCCGAGGGAA
N-Bgl-12	5'-GATCTTCCCTCG

Tabel 1. RDA jaoks kasutatud praimerite\ adapterite järjestused

4.3 Kloonide *dot-blot* analüüs

Dot-blot meetodit kasutati RDA tulemusena identifitseeritud geenide erinevate ekspressioonitasemete kontrollimiseks. 100 ng cDNA-d denatureeriti 0.4M NaOH ja

10 mM EDTA puhvris 10 minutit 100 °C juures, tilgutati Hybond N+ nailonmembraanile ja immobiliseeriti UV kiirgusega. „Edasi“ ja „tagasi“ subtraktsiooni tulemusena saadud unikaalsed cDNA kloonid tilgutati erinevatele membraanidele, mõlemast membraanist tehti identsed koopiad (kokku 4 membraani). Sünteesiti DIG-märgisega (dioksügeeniin) hübridisatsioonisondid kassilõhnale eksponeeritud rühma ja kontrollrühma cDNA algmaterjalist (DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I; Roche, Saksamaa). cDNA algmaterjalina kasutati RDA analüüsi mittekaasatud loomade cDNA-d. Mõlemad sondid hübridiseeriti nii „edasi“ kui „tagasi“ RDA analüüsis tuvastatud kloone kandvatele membraanidele 65 °C juures üleöö. Hübridisatsioon viidi läbi kahes korduses erinevatelt katseloomadelt pärit cDNA sondidega, et vähendada individuaalsetest erinevustest tulenevaid kõikumisi. Dot blotid skanneeriti densitomeetriga (GS 710 Calibrated Imaging Densitometer; Bio-Rad, Saksamaa) ja analüüsiti Quantity One tarkvaraga (Bio-Rad, Saksamaa). Signaalide intensiivsused korrigeeriti lokaalse taustsignaali intensiivsuse suhtes. Omavahel võrreldi samade kloonide signaale, mis olid saadud hübridiseerimisel erineva sondiga (kassilõhnale eksponeeritud loomade cDNA vs kontrollrühma loomade cDNA). Võrdluse tulemused esitati optilise tiheduse suhtena katserühma ja kontrollrühma signaalide vahel.

4.4 Pöördtranskriptsioon-PCR reaktsioon (RT-PCR)

RT-PCR reaktsiooni kasutati geenide *c-fos*, *Gamm1* ja *CPE* ekspressioonitasemete võrdlemiseks kassilõhnale eksponeeritud ja kontrollrühma loomade vahel. Reaktsioonis kasutati cDNA algmaterjali, mida RDA analüüsis ei kasutatud. Subtraktiivse hübridisatsiooni efektiivsuse kontrollimiseks viidi RT-PCR läbi ka RDA analüüsi lõpuks tekkinud erinevusprodukt 3 (DP3) materjali peal. Sisemiseks kontrolliks kõigis RT-PCR reaktsioonides oli koduhoidjageen glütseeraldehüüd-3-fosfaadi dehüdrogenaasi (*GAPDH*) transkript. Reaktsioonides kasutatud praimerid on toodud tabelis 2. RT-PCR reaktsioonid viidi läbi 20 µL mahus 10 pmol praimeritega järgnevatel tingimustel: algne denaturatsioon 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 58 °C 1 min, 72 °C 1 min - 6 tsükli; 94 °C 1 min, 56 °C 1 min, 72 °C 1 min - 20 tsükli; lõppekstensioon 72 °C 5 min. Kümme mikrolitrit reaktsiooniprodukti lahutati 2 % TBE agarosgeelis, geel skaneeriti Molecular Imager FX skanneriga (Bio-Rad, Saksamaa) ja *band*'ide optilised tihedused määrati Quantity One tarkvaraga (Bio-Rad,

Saksamaa). Geeni suhteline ekspresioonitase väljendati keskmise optilise tiheduse suhtena koduhoidjageeni GAPDH *band*'i suhtes.

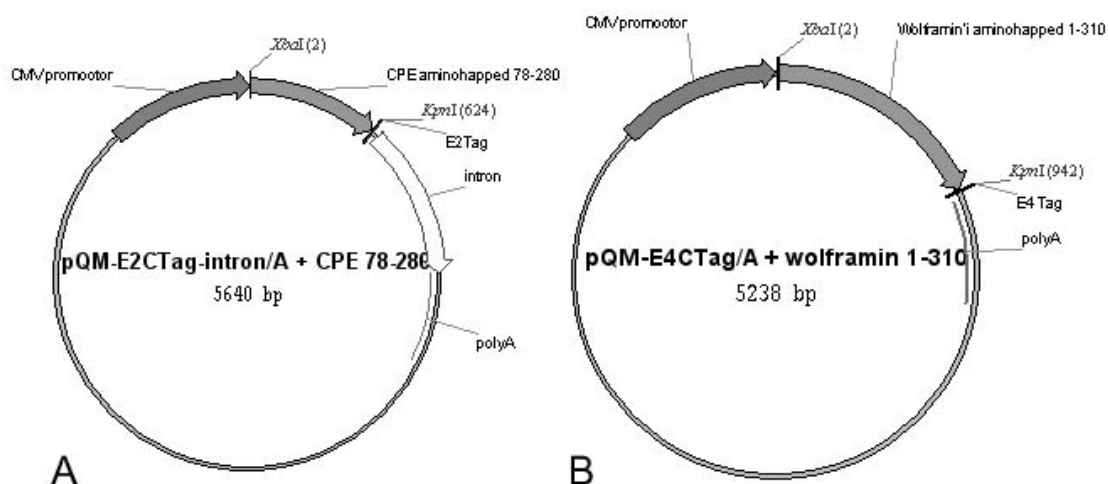
Nimi	Praimeri järjestus
GAPDH F	5'- CCCTCAAGATTGTCAGCAATGC
GAPDH R	5'- GTACTCAGTGTAGCCCAGGAT
CFOS F	5'- TCACAGGGCTAGCAGTGTGG
CFOS R	5'- ATGACCTGGGCTTCCCAGAG
GAMM1 F	5'- CTGACCAAGACACTGAGGCAGG
GAMM1 R	5'- GCTCCTTGGGCACACACTGG
CPE F	5'- GCTCTCTGCCAACCTGCACG
CPE R	5'- CTCAAAGCAGTTGCTGCTCAGG

Tabel 2. RT-PCR reaktsiooni jaoks kasutatud praimerite järjestused

4.5 DNA konstruktid

N-terminaalseid aminohappeid 1-310 kodeeriv Wfs1 DNA amplifitseeriti PCR'iga kasutades matriitsina hiire täispikka cDNA kloni (IMAGE: 6492038, gb BC046988; MRC Geneservice, Cambridge, UK) praimeritega Wfs_Xba-AH1F: 5' gat cta gaa tga act cag gca ccc cac c 3' ja Wfs_Kpn-AH310R: 5' atg gta ccg gag gct acg tca atc agg t 3'. CPE N-terminaalseid aminohappeid 78-280 kodeeriv DNA amplifitseeriti PCR'iga kasutades matriitsina hiire CPE täispikka cDNA-d (IMAGE:3157558, gb BC010197; MRC Geneservice, Cambridge, UK) praimeritega CPE_Xba-AH78F: 5' ga tct aga atg aca gtg ggg cgc agc ttc 3' ja CPE_Kpn-AH280R: 5' at ggt acc gct ttg gaa aat tgc gtc atc 3', kusjuures CPE_Xba-AH78F praimer sisaldas ATG initsiaatorkoodonit enne hiire CPE cDNA-ga komplementaarset piirkonda. PCR viidi läbi Vent DNA polümeraasiga (New England Biolabs, Beverly, USA). Saadud produktid kloneeriti tõmbilt pGem7-Zf(+) vektorisse (Promega, USA) ja sekveneeriti täies ulatuses ABI Prism Genetic Analyzer 310 sekvenaatoriga (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Õige järjestusega kloonid kloneeriti praimerite otstesse disainitud KpnI ja XbaI äratundmisjärjestuste vahendusel eukarüootsetesse ekspresioonivektoritesse. CPE_78-280 fragment kloneeriti pQM-E2CTag-intron/A vektorisse (Quattromed, Eesti) (joonis 2 A) ja Wfs1_1-310 fragment pQM-E4CTag/A vektorisse (Quattromed, Eesti) (joonis 2 B). Selle tulemusena saadi DNA-konstruktid, kus Wfs1 kodeerivale järjestusele järgnes E4 *tag*'i kodeeriv järjestus (Wfs1_1-310E4) ja CPE kodeerivale

järjestusele E2 tag'i kodeeriv järjestus (CPE_78-280E2). E2 tag koosneb kümnest aminohappejäägist (SSTSSDFRDR) ja on saadud veise papilloomiviiruse (BPV) valgust E2. E4 tag'i aminohappeline järjestus on GTTGHYSVRD. Mõlemas vektoris kasutatakse transkriptsiooni käivitamiseks tugevat CMV (tsütomegaloviirus) promootorit ja episomaalseks replikatsiooniks SV40 viiruse replikatsiooni alguspunkti, millelt käivitub replikatsioon SV40 *large* T-antigeeni ekspresseerivates rakkudes (käesolevas töös cos-7). Transfektsiooniks puhastati DNA-konstruktid ränimaatrikskolonniga (Qiagen Plasmid Midi Kit; QIAGEN, Saksamaa).



Joonis 2. CPE_78-280E2 (A) ja WFS_1-310E4 (B) DNA-konstruktid.

4.6 Koekultuur

Cos-7 rakuliini kasvatati koekultuuri inkubaatoris (37 °C, 5 % CO₂) IMDM söötmel (PAA Laboratories, Saksamaa), millele oli lisatud 10 % vasikaloote seerumit (Gibco, UK), 100 U/ml penitsilliini ja 100 mg/ml streptomütsiini. Poolkonfluentne kultuur koguti tsentrifuugimise teel ja rakud suspendeeriti IMDM söötmes, millele oli lisatud 200 mM NaBes ja 25 µg lõhe sperma sonikeeritud DNA-d (kandja-DNA). Rakke transfekteeriti 1 µg Wfs1_1-310E4 või/ja 1 µg CPE_78-280E2 DNA konstruktidega elektroporatsiooniga 4 mm küvetis Gene Pulser II elektroporaatoriga (Bio-Rad, Saksamaa) pingega 180 V ja mahtuvusega 975 µF.

4.7 Immunopretsipitatsioon

Nelikümmend kaheksa tundi pärast transfekteerimist lüüsi rakud natiivsetes tingimustes. Pilootkatsetes võrreldi transitoorselt ekspresseeritud valkude lahustuvust erinevatel lüüsi tingimustel:

- A. 50 mM Tris (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.1% TritonX-100, 10% glütserool, 1 mM PMSF (madala soolakontsentratsiooniga lüüsi puhver)
- B. 50 mM Tris (pH 8.0), 500 mM NaCl, 0.1% TritonX-100, 10% glütserool, 1 mM PMSF (kõrge soolakontsentratsiooniga lüüsi puhver)
- C. Neli korda külmutamine vedelas lämmastikus ja sulatamine 37°C juures 50 mM Tris (pH 8.0) puhvris, millele oli lisatud 1 mM PMSF.

Immunopretsipitatsioonikatsed viidi läbi lüüsi puhvriga A. Rakud pesti kaks korda PBS'iga, lisati jääkülma lüüsi puhver, rakud koguti ja inkubeeriti jääl 1 tund. Lüüsi puhvriga A tasakaalustatud magnetkerakestele, milledele oli immobiliseeritud hiire monoklonaalsed 3F12 (seostub E2 tag'iga) või 1E2 (seostub E4 tag'iga) antikehad, lisati lüüsi puhvriga A supernatant ja inkubeeriti 2 tundi 4 °C juures *end-over* loksutil. Magnetkerakesed pesti 4 korda jääkülmas lüüsi puhvriga A 4 °C juures *end-over* loksutil, seostunud valk elueeriti 1x Laemmli' puhvriga A ja eluaadid kuumutati 98 °C juures 4 minutit.

4.8 Immunoanalüüs (*Western blot*)

Valgud lahutati denatureerivas 12 % polüakrüülamiid-SDS geelis ja kanti Immobilon P membraanile (Millipore, USA) kasutades poolkuiva ülekannet *Trans-blot SD Semidry Transfer Cell* (Bio-Rad, Saksamaa) blotteriga 15 minutit 15 V. Kõik järgnevad protseduurid viidi läbi loksutil toatemperatuuril puhvriga A 150 mM NaCl, 50 mM Tris (pH 7.5), 0.1% (v/v) Tween-20. Membraan blokeeriti 15 minutit 5% piimavalgulahuses. Primaarse antikeha sidumine toimus 1 tund 2% piimavalgulahuses hiire monoklonaalse 5E11 antikehaga (seostub E2 tag'iga, 1mg/ml, 1:5000 lahjendus) või hiire monoklonaalse 1E2 antikehaga (seostub E4 tag'iga, 1mg/ml, 1:1000

lahjendus). Koimmunopretsipitatsioonikatses kasutati E2 tag'i detekteerimiseks HRP-ga konjugeeritud primaarset hiire 5E11-HRP antikeha (1mg/ml, 1/2000 lahjendus), et vältida magnetkerakestelt elueerimise käigus lahti tulnud hiire IgG kerge ja raske ahela värvumist. Mittekongjugeeritud primaarse antikehaga märgitud membraane inkubeeriti sekundaarse hiirevastase kitse IgG-HRP konjugeeritud antikehaga (1mg/ml, lahjendus 1/10000) 1 tund pimedas. Signaal detekteeriti kasutades võimendatud kemiluminescents meetodit (ECL Western blotting detection kit, Amersham, UK), eksponeeriti röntgenfilmile (Super RX, Fujifilm) ja skanneeriti GS-710 densitomeertiga (Bio-Rad, Saksamaa).

4.9 Immunofluorestsentsmikroskoopia

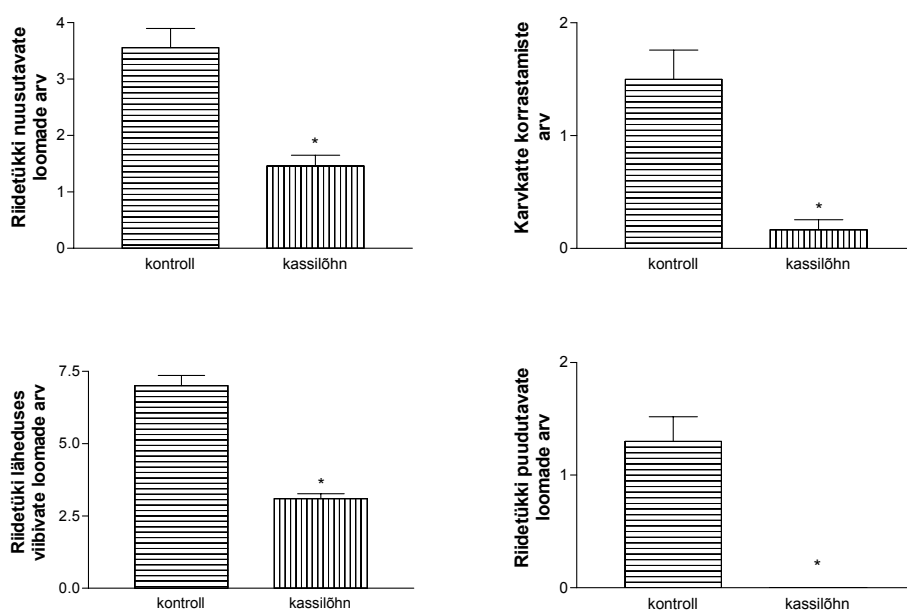
Nelikümmend kaheksa tundi pärast transfektsiooni pesti ümmargusele kattedklaasile (13mm, Nr 1) kinnitunud rakud PBS'iga ja fikseeriti külma metanooliga 10 minutit - 20 °C juures. Kattedklaasile fikseeritud rakud blokeeriti 20 minutit toatemperatuuril PBS'is, kuhu oli lisatud 2% BSA ja 0.1 % NaN₃. Primaarse antikeha sidumine toimus 2 tundi toatemperatuuril blokeerimislahuses, kuhu oli lisatud hiire monoklonaalne 5E11 antikeha (1mg/ml, 1:200 lahjendus) või 1E2 antikeha (1mg/ml, 1:200 lahjendus). Seejärel inkubeeriti kattedklaase sekundaarse hiirevastase kitse IgG-FITC (1mg/ml, lahjendus 1/200) konjugeeritud antikehaga 1 tund pimedas toatemperatuuril. Kattedklaasid kinnitati alusklaasile sulustusvedelikuga 0.1 M Tris (pH 8.0), 50% glütserool (w/v), 0.1% NaN₃. Preparaate vaadati Axioplan 2 (Zeiss, Saksamaa) mikroskoobiga, kasutades 40x ja 60x suurendusega õliimmersioonobjektiive, ergastamislainepikkus 488 nm. Saadud digitaalsed pildid töödeldi Adobe Photoshop 6.0 tarkvaraga.

5. Tulemused

5.1 Hirmureaktsiooni mõjul mandelkehas indutseeritud geenid

Katseloomade eksponeerimine kassilõhnaga riidetükile 30 minuti jooksul põhjustas selge ärevuskäitumise kontrollrühma loomadega võrreldes (joonis 3). Kassilõhnale

eksponeeritud loomadel oli statistiliselt olulisel määral ($p < 0.01$, Mann-Whitney U-test) vähenenud riidetüki nuusutamise (1.46 ± 0.19 versus 3.56 ± 0.34), riidetüki läheduses viibimine (3.1 ± 0.17 versus 7.0 ± 0.36) ja karvkatte puhastamine (0.16 ± 0.09 versus 1.5 ± 0.26). Kassilõhnale eksponeeritud loomad ei puudutanud kordagi riidetükki (0 versus 1.3 ± 0.2).



Joonis 3. Käitumuslikud muutused rottide eksponeerimisel kassilõhnale 30 minuti jooksul. (* $p < 0.01$, Mann-Whitney U-test)

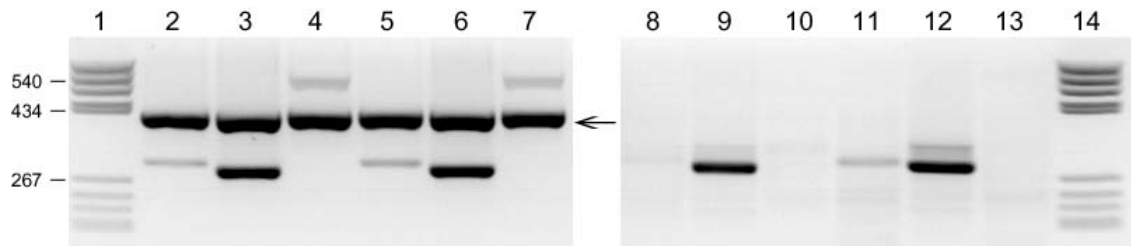
Võrdlev geeniekspressioonianalüüs kassilõhnale eksponeeritud rottide ja kontrollrühma rottide mandelkehas tuvastas terve rea hirmureaktsiooni mõjul suurenenud ekspressioonitasemega geene (tabel 3). *Dot-blot*'i analüüsi alusel oli kassilõhnale eksponeeritud rühmas kõige suurema ülekspressiooniga melanotsüütide proliferatsioonist mõjutav geen *Gamm1* (geenipanga kood AF252871).

Wolframin'i ja CPE ülekspressioonitase kassilõhnale eksponeeritud rottidel oli kontrollrühmaga võrreldes 1.2 korda. Samuti identifitseeriti kontrollrühmal mitmeid ülekspresseerunud geene (vt tabel 3 käesoleva tööga kaasasolevas artiklis). RT-PCR kinnitas subtraktiivse hübridisatsiooni efektiivsust, kuna erinevusprodukt 3 –st (DP3) oli kadunud koduhoidja geeni GAPDH transkript, mille ekspressioonitase oli võrdne mõlema katserühma cDNA amplikonides (joonis 4). Samuti oli subtraktiooni tulemusena kadunud *c-fos*'i transkript, mis näitab, et selle varajase

transkriptsioonifaktori ekspressioonitase mandelkehas katserühmade vahel ei erine (joonis 4).

Geeni nimi	Geenipanga kood	Suhe
GAMM1 M. musculus protein, Myg-1	AF252871	1.8
CDCrel-1A	AB027143	1.5
KIAA0337 protein, Rho-specific guanine-nucleotide exchange factor 164 kDa	NM_014786	1.5
Rattus norvegicus Rho GTPase activating protein 4 (Arhgap4)	NM_144740	1.5
Neural F box protein NFB42	AF098301	1.4
Putative transmembrane protein 2c	AF282981	1.4
BEC1 protein	AF035814	1.3
Ca/calmoduline-dependent protein kinase alpha	AB023658	1.3
KIAA0408 protein	AL096711	1.3
Mus musculus expressed sequence AI428855	AI428855	1.3
Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase alpha(+) isoform catalytic subunit	M14512	1.3
NADH-ubiquinone oxidoreductase B17 subunit	XM_204158	1.3
NIR1	AF334586	1.3
Rattus norvegicus calmodulin III (Calm3)	AF231407	1.3
Rattus norvegicus CaM-kinase II inhibitor alpha	AF271156	1.3
Rattus norvegicus neurochondrin, norbin	NM_053543	1.3
Apolipoprotein E gene	J02582	1.2
Carboxypeptidase E (EC 3.4.17.10.)	X51406	1.2
DXImx39e, M. musculus	AF229636	1.2
Homeobox protein HOX-4.4 and HOX-4.5	X62669	1.2
Limbic system associated membrane protein (LsAMP)	NM_017242	1.2
Myelin-associated glycoprotein precursor (I-MAG/S-MAG)	M14871	1.2
NCI-CGAP-Lu29, M. musculus cDNA clone 601102606F1	BE305755	1.2
ODZ3	AF195418	1.2
T-type calcium channel alpha-1 subunit	AF051947	1.2
WFS1, wolframin	AF136378	1.2
Beta-spectrin III	AB008551	1.1
EST 196451 Normalized rat kidney, cDNA clone RKIAV31	AA892648	1.1
EST349530 Rat gene index, cDNA clone RGIEO08	AW918226	1.1
Gelsolin (actin-depolymerizing factor - ADF), brevin	J04953	1.1
Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2813462	AW303350	1.1
KIAA0429 protein	XM226503	1.1
KIAA0771 protein	AB018314	1.1
Mus musculus cDNA clone IMAGE:575778	AA120430	1.1
NCI-CGAP-Lu29, M. musculus cDNA clone IMAGE: 3989880, 601770406F1	BF161425	1.1
NIH_MGC_71 Homo sapiens cDNA clone	BE889795	1.1
Rattus norvegicus Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, theta polypeptide	NM_013053	1.1
Transketolase (EC 2.2.1.1.)	U09256	1.1
Rattus norvegicus similar to hypothetical protein MGC25696	XM229276	1.1
KIAA0014 protein	NM_014665	1.1

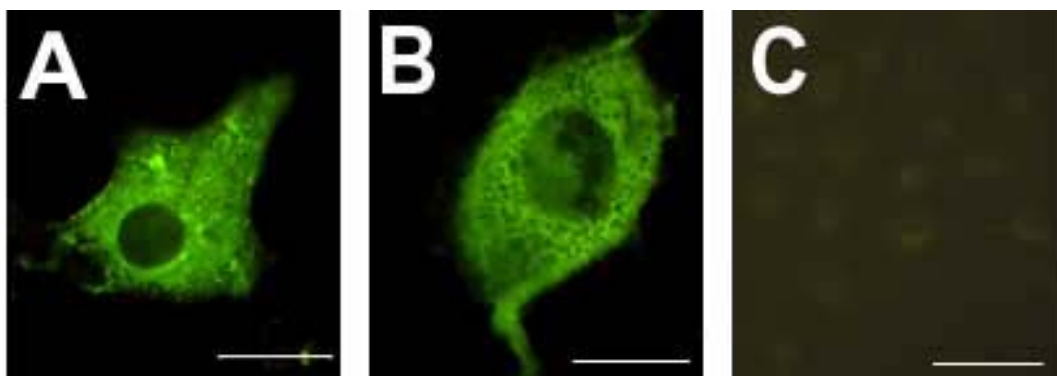
Tabel 3. Hirmureaktsiooni mõjul mandelkehas indutseeritud geenid. Geeniekspressiooni suurenemise määr on väljendatud *dot-blot*'i signaalide optilise tiheduse suhtena kassilõhnale eksponeeritud rühma ja kontrollrühma vahel.



Joonis 4. cDNA amplikonide (rajad 2-7) ja erinevusprodukt3 (DP3) (rajad 8-13) RT-PCR analüüs. Kõigil radadel on cDNA koguse sisemiseks kontrolliks GAPDH (produkt 409 bp, märgitud noolega). Rajad 1 ja 14: pBR322 DNA/*BsuRI* (*HaeIII*) marker (Fermentas, Leedu); Rada 2: kontrollrühma cDNA, GAMM1 (303 bp); Rada 3: kontrollrühma cDNA, CPE (289 bp); Rada 4: kontrollrühma cDNA, c-fos (520 bp); Rada 5: kassilõhnarühma cDNA, GAMM1; Rada 6: kassilõhnarühma cDNA, CPE; Rada 7: kassilõhnarühma cDNA, c-fos; Rada 8: DP3 kontrollrühm, GAMM1; Rada 9: DP3 kontrollrühm, CPE; Rada 10: DP3 kontrollrühm, c-fos; Rada 11: DP3 kassilõhnarühm, GAMM1; Rada 12: DP3 kassilõhnarühm, CPE; Rada 13: DP3 kassilõhnarühm, c-fos.

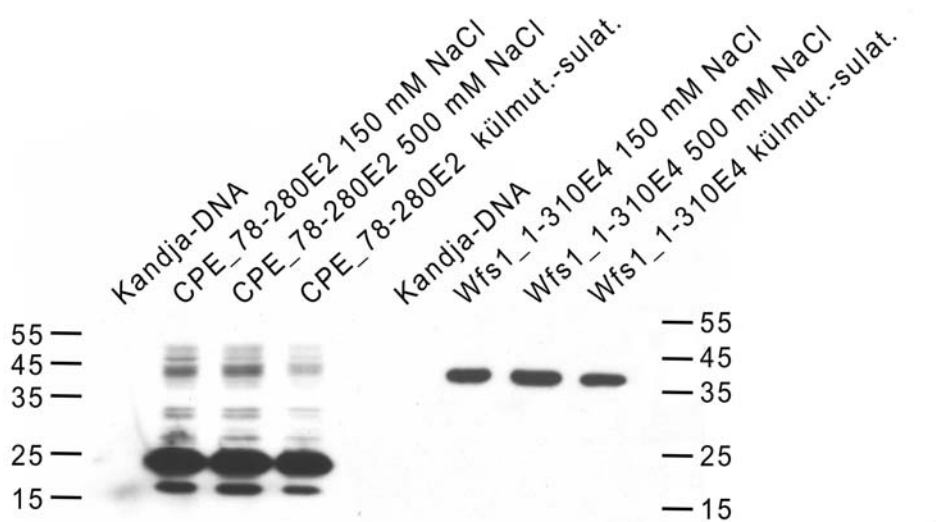
5.2 Wolframin'i ja karboksüpeptidaas E interaktsioon *cos-7* rakkudes

Wfs1_1-310E4 ja CPE_78-280E2 valkude transitoorsel ekspressioonil *cos-7* rakkudes oli mõlema valgu ekspressioonitase kõrge ja mõlemad valgud lokaliseerusid tsütoplasmasse (joonis 5). Kõigil natiivse lüüsi tingimustel lahustusid Wfs1_1-310E4 ja CPE_78-280E2 valgud vesilahustuvas fraktsioonis peaaegu võrdse efektiivsusega (joonis 6). Kuna pidasime vajalikuks meid huvitavate valkude kompleksi uurimiseks füsioloogilistele tingimustele lähedase ioonse jõu säilitamist lüüsipuhvrts, viidi koimmunopretsipitatsioonikatse läbi 150 mM NaCl sisaldavas lüüsipuhvrts.

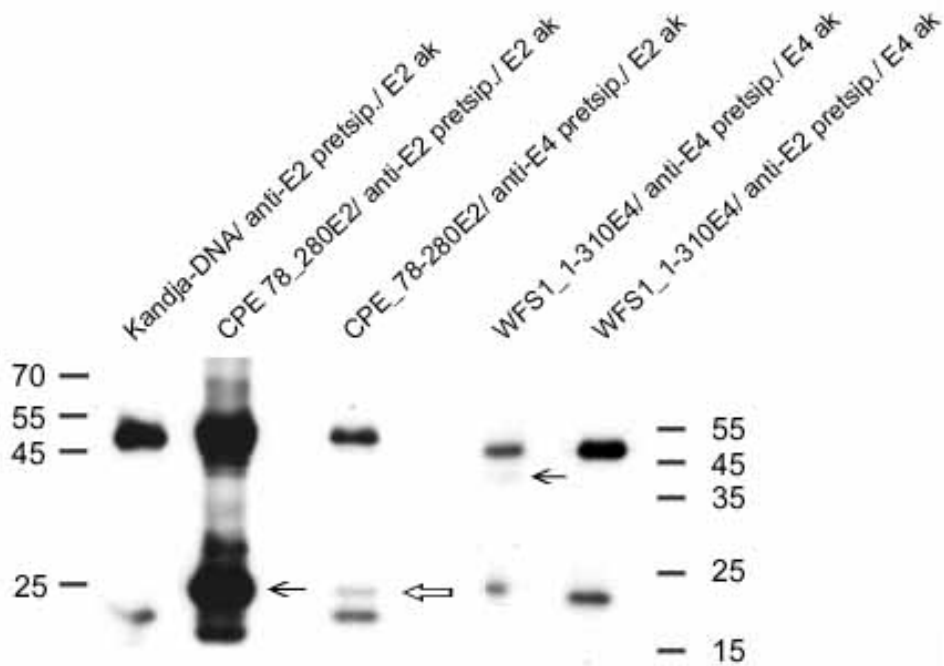


Joonis 5. Immunofluorestsentsmikroskoopia Wfs1_1-310E4 (A) ja CPE_78-280E2 (B) transitoorsel ekspressioonil *cos-7* rakkudes. Kandja-DNA-ga transfekteeeritud *cos-7* rakud (C). Mõõtkava 40 μ m.

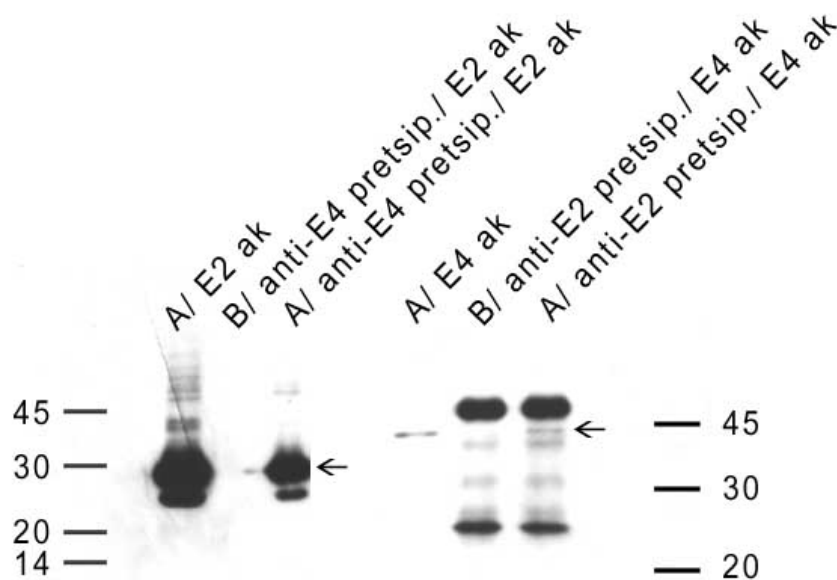
Magnetkerakestele immobiliseeritud E4 tag'i ja E2 tag'i vastaste hiire monoklonaalsete antikehadega immunopretsipitatsiooni spetsiifilisuse kontrollimine CPE_78-280E2 ja WFS1_1-310E4 transitoorsel ekspressioonil cos-7 rakkudes näitas, et E4 antikehaga immunopretsipitatsioonil pretsipiteerus lisaks spetsiifilisele valgule ebaspetsiifiliselt ka väikeses koguses CPE_78-280E2 valk, kuid kuna spetsiifilise pretsipitatsiooni signaalid olid tunduvalt intensiivsemad, oli vähetõenäoline, et see edasisi eksperimente segaks (joonis 7). Koimmunopretsipitatsioonil cos-7 rakkude natiivsest lüsaadist kopretsipiteerus CPE_78-280E2 valgu spetsiifilisel sidumisel WFS1_1-310E4 valk ja WFS1_1-310E4 valgu spetsiifilisel sidumisel CPE_78-280E2 valk (joonis 8).



Joonis 6. Immunoanalüüs erinevate natiivse lüüsi tingimuste võrdlemisest CPE_78-280E2 ja Wfs1_1-310E4 valkude transitoorsel ekspressioonil cos-7 rakkudes. Kõikidel lüüsi tingimustel olid mõlemad valgud lüsaadi supernatandist võrdsel määral detekteeritavad.



Joonis 7. Immunoanalüüs CPE_78-280E2 ja WFS1_1-310E4 valkude immunopretsipitatsioonist natiivsetest lüsaatidest pärast CPE_78-280E2 või WFS1_1-310E4 transitoorset ekspressiooni cos-7 rakukultuuris. Tumeda noolega on märgitud spetsiifiliselt immunopretsipiteerunud valkude *band*'id, heleda noolega on märgitud E4 antikehaga ebaspesiifiliselt pretsipiteerunud CPE_78-280E2 valgu nõrk *band*.



Joonis 8. Immunoanalüüs CPE_78-280E2 ja WFS1_1-310E4 valkude koimmunopretsipitatsioonist pärast transitoorset koekspressiooni cos-7 rakukultuuris. A – kotransfekteeritud rakkude natiivne lüsaat, B – kandja-DNA-ga transfekteeritud rakkude natiivne lüsaat. Koimmunopretsipiteerunud valkude spetsiifilised *band*'id on märgitud nooltega.

Arutelu

Nii „edasi“ kui „tagasi“ subtraktsioonikatsetes õnnestus tuvastada terve rida rakus erinevaid funktsioone täitvaid geene, mida võib käesoleva eksperimendi püstituse alusel seostada hirmureaktsiooni regulatsiooniga mandelkehas. Tuvastatud geenide funktsionaalse annotatsiooni alusel võib järeldada, et hirmu regulatsioonis osalevad peale närviülekanedega seotud geenide ka närvirakkude ja gliiarakkude teiste funktsioonidega seotud geenid. Kuna subtraktsioon karmidel tingimustel (testrühma:võrdlusrühma cDNA suhe 1:400 000) ei andnud detekteeritavaid signaale erinevusprodukt 3-s, kuid need tekkisid leebematel tingimustel (testrühma:võrdlusrühma cDNA suhe 1:10 000), võib järeldada, et pigem on tegemist väikeste muututustega tuvastatud geenide transkriptsioonitasemetes. Kuna subtraktiivne hübriidsatsioon ja sellele järgnevad PCR amplifikatsioonid rikastavad suhteliselt rohkem väikese koopiaarvuga transkriptide osakaalu, on väikese ulatusega geeniekspressioonimuutuste detekteerimine ootuspärane.

Käesolevas töös läbiviidud immunopretsipitatsioonikatse tulemused näitavad, et wolframin'i aminotermiinalne piirkond 1-310 ja CPE valgu fragment 78-280 seostuvad omavahel rakukultuuris. Mainitud tulemus annab alust uskuda, et ka endogeensed CPE ja wolframin valgud võivad omavahel interakteeruda. Tõenäoliselt leiab selline interaktsioon aset ER'i membraani tsütoplasmaatilise külje lähedal, kuna endogeenne wolframin on üheksa transmembraanse segmendi kaudu aheldatud ER'i membraani ja wolframin'i N-terminus on eksponeeritud tsütoplasmasse. Seda väidet toetab patendis WO 02/063307 näidatud tulemus, kus endogeense wolframin'i ja CPE lokalisatsioonimustrid kattuvad endoplasmaatilise retiikulumi piirkonnas (Hiebsch 2002). Lisaks on mainitud patendis näidatud, et lühendatud wolframin'i (aminohapped 1-136) ekspresseerivates PC12 rakkudes oli kadunud depolarisatsiooniga indutseeritav CPE sekretsioon, mis annab alust uskuda, et nende valkude interakteerumisel on ka funktsionaalne seos. Wolframin'i funktsionaalset seost peptiidseid hormoone protsessivate süsteemidega toetavad ka hiljuti avaldatud tulemused uurimusest Wfs1 puudulikkusega hiirtel (Ishihara *et al.*, 2004). Mainitud töös leiti, et sellistel hiirtel on häirunud insuliini sekretsioon *in vivo* ja samuti glükoosi poolt stimuleeritud insuliini sekretsioon isoleeritud pankrease saarekestes. Lisaks

ilmnes Wfs1 puudulikkusega hiirtel progresseeruv pankrease β -rakkude degeneratsioon. Samas on varem näidatud, et Wfs1 antisense RNA-d ekspresseerivatel BRIN-BD11 β -rakkudel on küll oluliselt pidurdunud rakkude jagunemine, kuid insuliini sekretsioonis muutusi ei ole (McBain & Morgan, 2003).

Teaduskirjanduses on wolframin'i funktsiooni uuritud eelkõige seoses rakusisese Ca^{2+} homeostaasi regulatsiooniga ja mõjuga β -rakkude elulemusele ning vähe on pööratud tähelepanu võimalikele seostele propeptiide protsessivate süsteemidega. On näidatud, et wolframin suurendab lipiidmembraanide läbitavust Ca^{2+} ioonidele ja rakusisese vaba Ca^{2+} kontsentratsiooni (Osman *et al.*, 2003). Seega on tõenäoline, et tegu on mitut funktsiooni omava valguga, mis võib mõjutada Ca^{2+} liikumist endoplasmaatilise retiikulumi ja tsütoplasma vahel, kui osaleda valkude sorteerimises reguleeritud sekretoorsesse ratta. CPE suunamist reguleeritud sekretoorse raja sekretoorsetesse graanulitesse on uuritud ja jõutud järeldusele, et pigem on tegu selektiivse agregatsiooni hüpoteesi järgiva protsessiga (Song & Fricker, 1995). Mainitud hüpoteesi kohaselt agregeeruvad reguleeritud sekretoorsesse ratta suunduvad valgud trans-Golgi's alaneva pH ja suureneva Ca^{2+} kontsentratsiooni mõjul, seostuvad mingil moel lipiidmembraanidega ja "sorteerivad iseennast". On näidatud, et CPE C-terminaalse fragmendi ja albumiini liitvalk sorteerus vähesel määral sekretoorsetesse graanulitesse (Mirta, Song & Fricker, 1994). Samuti on näidatud, et Ca^{2+} destabiliseerib ja vähendab ning EGTA suurendab CPE aktiivsust (Nalamachu, Song & Fricker, 1994). Samas ei pruugi CPE agregeerumine happelises keskkonnas Ca^{2+} ioonide osalusel olla veel otseseks ja vaieldamatuks tõestuseks "ise sorteerumise" hüpoteesi paikapidavuse kohta. Alternatiivseks hüpoteesiks on sorteeriva valgu hüpotees, mis postuleerib sekretoorsetesse graanulitesse sorteeriva valgulise retseptori olemasolu (Kelly, 1985). Mainitud hüpoteesi tõestamine on ilmselt tunduvalt keerulisem, kuna nõuab vastava sorteeriva valgu identifitseerimist. Sorteerimisel on aga interaktsioon "sorteeriva" ja "sorteeritava" valgu vahel transitoorne, mistõttu on selliseid komplekse keeruline eraldada. Idee, et CPE võib vajada mingit saatjavalku lipiidses membraanis transmembraanse orientatsiooni saavutamiseks, on hiljuti uuesti päevakorda kerkinud. Selle põhjuseks on katsetulemused, mis näitavad, et rakukultuuris on CPE sekretoorsete graanulite membraanides transmembraanse orientatsiooniga, aga *in vitro* modelleeritud lipiidmembraane puhastatud CPE C-terminus ei läbi (Fricker, Das & Angeletti, 1990; Dhanvantari *et al.*, 2002). Sellest

tehti järeldus, et rakus võib mingi saatjavalk varjestada CPE C-terminaalsele membraanseotud piirkonnale R₄₁₃KEEEEKEELMEWWKMM₄₂₈ järgneva polaarse motiivi S₄₂₉ETLNF₄₃₄, mille tulemusena omandab CPE transmembraanse orientatsiooni. Mainitud tulemused annavad põhjust otsida CPE lipiidmembraanidesse ankurdamist soodustavaid valke. Personaalsele kommunikatsioonile M. Assadi ja Y. P. Loh'iga viidates vihjavad Dhanvantari *et al.*, 2002, et üks selline kandidaatvalk on isoleeritud detergendis mittelahustuvast sekretoorsete graanulite membraanfraktsioonist.

Järeldused

Käesolevas töös tuvastasime terve hulga kandidaatgeene, mis võivad olla seotud hirmureaktsiooni regulatsiooniga mandelkehas. Lisaks näitasime kahe hirmureaktsiooni mõjul üleekspresseerunud valgu, wolframin'i ja karboksüpeptidaas E, N-terminaalsete fragmentide interakteerumist koekultuuris. Kuna meil õnnestus kahe täiesti erineva meetodiga demonstreerida seoseid wolframin'i ja karboksüpeptidaas E regulatsioonis, saame järeldada, et tegemist on tõenäoliselt ka funktsionaalselt seotud valkudega. Sellest lähtuvalt on käesoleva tööga paralleelselt tehtud Wfs1 geeni *knockout*-konstrukt, mis on viidud hiire embrüonaalsetesse tüvirakkudesse. Praeguseks hetkeks on olemas kõrgeprotsendilise kimäärsusega hiired, kelle ristamisel metsiktüüpi hiirtega loodame saada heterosügootsed Wfs1 geeni puudulikkusega hiired ja sealt edasi juba *-/-* (*knockout*) hiired. Lisaks on tegemisel Wfs1 antikehad ning Wfs1 antisensekonstrukti ja wolframini N-terminaalseid aminohappeid 1-310 ekspresseerivad püsiliinid PC12 (roti feokromotsütoom) ja RIN-M5F (roti insulinoom) rakkudes, et uurida wolframin'i mõju karboksüpeptidaas E aktiivsusele ja lokaliseerimisele rakus.

Tänuavaldused

Tänan oma juhendajaid Sulev Kõksi ja Alar Karist igakülgse toetuse ja nõuannete eest käesoleva töö planeerimisel ja kirjutamisel. Samuti olen palju tänuvõlgu Urve Tootsile, kes on teinud mulle selgeks valkude uurimiseks vajalikud meetodid, aidanud katseid planeerida ja andnud nõu töö kirjutamisel. Käesolev töö ongi sündinud eeskätt tänu Sulevi ja Urve initsiatiivile ja positiivsele suhtumisele. Tänan Rein Sikutit, kes õpetas mulle rakukultuuridega töötamist ja tundis pidevalt huvi, kuidas mul teadus edeneb. Tänan ka kõiki teisi Quattromed'i ja Fit Biotech'i inimesi nende sõbralikkuse ja abivalmiduse eest. Loomulikult ei saa ma unustada oma kalleid töökaaslasi Füsioloogia instituudis, kelle seltsis on alati väga lõbus ja nauditav tööd teha. Samuti olen tänulik oma perekonnale ja kõikidele sõpradele, kes on mind alati toetanud.

Kasutatud kirjandus

- al-Sheyyab, M. *et al.*, 2001. Bleeding tendency in Wolfram syndrome: a newly identified feature with phenotype genotype correlation. *Eur. J Pediatr.* 160, 243-246.
- Berman, Y. *et al.*, 2001. Impaired prohormone convertases in Cpe(fat)/Cpe(fat) mice. *J Biol Chem.* 276(2):1466-73.
- Bespalova, I. N. *et al.*, 2001. Mutations in the Wolfram syndrome 1 gene (WFS1) are a common cause of low frequency sensorineural hearing loss. *Hum. Mol. Genet.* 10, 2501-2508.
- Cawley, N. X. *et al.*, 2003. Trafficking of mutant carboxypeptidase E to secretory granules in a beta-cell line derived from Cpe(fat)/Cpe(fat) mice. *Endocrinology.* 144(1):292-8.
- Che, F.Y. *et al.*, 2001. Identification of peptides from brain and pituitary of Cpe(fat)/Cpe(fat) mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(17):9971-6.
- Cool, D.R. *et al.*, 1997. Carboxypeptidase E is a regulated secretory pathway sorting receptor: genetic obliteration leads to endocrine disorders in Cpe(fat) mice. *Cell.* 88(1):73-83.
- Cryns, K. *et al.*, Mutations in the WFS1 gene that cause low-frequency sensorineural hearing loss are small non-inactivating mutations. 2002. *Hum. Genet.* 110, 389-394.
- Dhanvantari, S. *et al.*, 2002. Carboxypeptidase E, a prohormone sorting receptor, is anchored to secretory granules via a C-terminal transmembrane insertion. *Biochemistry.* 41(1):52-60.
- Docherty, K. & Hutton, J.C. 1983. Carboxypeptidase activity in the insulin secretory granule. *FEBS Lett.* 162(1):137-41.

Dong, W., Fricker, L. D. & Day, R. 1999. Carboxypeptidase D is a potential candidate to carry out redundant processing functions of carboxypeptidase E based on comparative distribution studies in the rat central nervous system. *Neuroscience*. 89(4):1301-17.

Eisenbarth, G. S. (Editor). 2004. Type 1 diabetes: molecular, cellular, and clinical immunology. 2nd edition. Plenum Publishing Corporation.

El-Shanti, H. et al., 2000. Homozygosity mapping identifies an additional locus for Wolfram syndrome on chromosome 4q. *American Journal of Human Genetics*. 66(4):1229-36.

File, S. E. *et al.*, 1993. Dissociation between behavioral and corticosterone responses on repeated exposures to cat odor. *Physiology of Behavior*. 54, 1109-1111.

Fricker, L. D. & Snyder, S. H. 1983. Purification and characterization of enkephalin convertase, an enkephalin-synthesizing carboxypeptidase. *The Journal of Biochemistry*, 258(18):10950-5.

Fricker, L. D. 1988. Activation and membrane binding of carboxypeptidase E. *J Cell Biochem*. 38(4):279-89.

Fricker, L.D., Das, B. & Angeletti, R.H. 1990. Identification of the pH-dependent membrane anchor of carboxypeptidase E (EC 3.4.17.10). *J Biol Chem*. 265(5):2476-82.

Fricker, L. D. et al., 1996. Carboxypeptidase E activity is deficient in mice with the fat mutation. Effect on peptide processing. *J Biol Chem*. 271(48):30619-24.

Fricker L. D. *et al.*, 2000. Identification and characterization of proSAAS, a granin-like neuroendocrine peptide precursor that inhibits prohormone processing. *J Neurosci*. 20(2):639-48.

- Hiebsch, R. 2002. Methods of assessing wolframin protein activity. WO 02/063307 A2. Pharmacia & Upjohn company.
- Hofmann, S. *et al.*, 2003. Wolfram syndrome: structural and functional analyses of mutant and wild-type wolframin, the WFS1 gene product. Human Molecular Genetics, Vol. 12, No. 16
- Inoue, H. *et al.*, 1998. A gene encoding a transmembrane protein is mutated in patients with diabetes mellitus and optic atrophy (Wolfram syndrome). Nat. Genet. 20, 143-148.
- Ishihara, H. *et al.*, 2004. Disruption of the WFS1 gene in mice causes progressive β -cell loss and impaired stimulus-secretion coupling in insulin secretion. Hum Mol Genet. 13(11):1159-1170.
- Köks, S. *et al.*, 2002. Cat odour exposure increases the expression of wolframin gene in the amygdaloid area of rat. Neurosci. Lett. 322:116-120.
- Köks, S. *et al.*, 2004. A screen for genes induced in the amygdaloid area during cat odor exposure. Genes Brain and Behavior. 3: 80-89.
- Kelly, R. B. 1985. Pathways of protein secretion in eukaryotes. Science. 230(4721): 25-32.
- Komatsu, K. *et al.*, 2002. Confirmation of genetic homogeneity of nonsyndromic low-frequency sensorineural hearing loss by linkage analysis and a DFNA6/14 mutation in a Japanese family. J. Hum. Genet. 47, 395-399.
- LeDoux, J. 1998. Fear and the brain: where have we been, and where are we going? Biological Psychiatry. 44, 1229-1238.
- McBain, S. C. & Morgan, N. G. 2003. Functional effects of expression of wolframin-antisense transcripts in BRIN-BD11 beta-cells. Biochem Biophys Res Commun. 307(3):684-8.

- Minton, J. A. L. *et al.*, 2003. Functional analysis of the Wolfram syndrome gene WFS1 using yeast-2-hybrid. 63rd Scientific Sessions, New Orleans, American Diabetes Association.
- Mitra, A., Song, L. & Fricker, L. D. 1994. The C-terminal region of carboxypeptidase E is involved in membrane binding and intracellular routing in AtT-20 cells. *J Biol Chem.* 269(31):19876-81.
- Nalamachu, S. R., Song, L. & Fricker, L. D. 1994. Regulation of carboxypeptidase E. Effect of Ca²⁺ on enzyme activity and stability. *J Biol Chem.* 269(15):11192-5.
- Normant, E. & Loh, Y. P. (1998) Depletion of carboxypeptidase E, a regulated secretory pathway sorting receptor, causes misrouting and constitutive secretion of proinsulin and proenkephalin, but not chromogranin A. *Endocrinology.* 139(4):2137-45.
- O'Neill, M. J. & Sinclair, A. H. 1997. Isolation of rare transcripts by representational difference analysis. *Nucleic Acids Research* 25, 2681-2682.
- Osman, A. A. *et al.*, 2003. Wolframin expression induces novel ion channel activity in endoplasmic reticulum membranes and increases intracellular calcium. *J Biol Chem.* 278(52): 52755-62.
- Panksepp, J. 1998. *Affective Neuroscience: The Foundations of Human and Animal Emotions*, Oxford University, New York.
- Pastorian, K., Hawel, L. & Byus, C. V. 2000. Optimization of cDNA representational difference analysis for the identification of differentially expressed mRNAs. *Analytical Biochemistry* 283, 89-98.
- Polastri, L. *et al.*, 2002. Effects of carboxypeptidase E overexpression on insulin mRNA levels, regulated insulin secretion, and proinsulin processing of pituitary GH3

cells transfected with a furin-cleavable human proinsulin cDNA. *Cell Transplant.* 11(8):803-11.

Polymeropoulos, M. H., Swift, R. G. & Swift, M. 1994. Linkage of the gene for Wolfram syndrome to markers on the short arm of chromosome 4. *Nat. Genet.* 8, 95-97.

Siggaard, C. et al., 1999. Clinical and molecular evidence of abnormal processing and trafficking of the vasopressin preprohormone in a large kindred with familial neurohypophyseal diabetes insipidus due to a signal peptide mutation. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 84, 2933–2941.

Song, L. & Fricker, L. D. 1995. Calcium- and pH-dependent aggregation of carboxypeptidase E. *Journal of Biological Chemistry.* 270(14):7963-7967.

Song, L. & Fricker, L. D. 1995. Processing of procarboxypeptidase E into carboxypeptidase E occurs in secretory vesicles. *Journal of Neurochemistry.* 64, 444-453.

Strom, T. M. *et al.*, 1998. Diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy and deafness (DIDMOAD) caused by mutations in a novel gene (wolframin) coding for a predicted transmembrane protein. *Hum. Mol. Genet.* 7, 2021-2028.

Swanson, L. W. 1998. *Brain Maps: Structure of the Rat Brain*, 2nd edition. Elsevier Science B. V., Amsterdam

Swift, R.G., Sadler, D. B. & Swift, M. 1990. Psychiatric findings in Wolfram syndrome homozygotes. *Lancet.* 336, 667-669.

Swift, R. G. *et al.*, 1991. Psychiatric disorders in 36 families with Wolfram syndrome. *Am J Psychiatry.* 148, 775-779.

Swift, R.G. *et al.*, 1998. Predisposition of Wolfram syndrome heterozygotes to psychiatric illness. *Mol. Psychiatry* 3, 86-91.

Rando, T. A., Horton, J. C. & Layzer, R. B. 1992. Wolfram syndrome: evidence of a diffuse neurodegenerative disease by magnetic resonance imaging. *Neurology* 42(6):1220-1224.

Takeda, K. *et al.*, 2001. WFS1 (Wolfram syndrome 1) gene product: predominant subcellular localization to endoplasmic reticulum in cultured cells and neuronal expression in rat brain. *Hum. Mol. Genet.* 10, 477-484.

Wolfram, D. J. & Wagener, H. P. 1938. Diabetes mellitus and simple optic atrophy among siblings: report of four cases. *Mayo. Clin. Proc.* 13, 715-718.

Young, T. L. *et al.*, 2001. Non-syndromic progressive hearing loss DFNA38 is caused by heterozygous missense mutation in the Wolfram syndrome gene WFS1. *Hum. Mol. Genet.* 10, 2509-2514.

Zhang, C. F, Snell, C. R. & Loh, Y.P. 1999. Identification of a novel prohormone sorting signal-binding site on carboxypeptidase E, a regulated secretory pathway-sorting receptor. *Molecular Endocrinology.* 13(4):527-36.

Lisa 1 – publitseeritud artikli äratrük

A screen for genes induced in the amygdaloid area during cat odor exposure

S. Kõks^{*,†}, H. Luuk^{†,‡}, A. Nelovkov[†], T. Areda^{†,‡} and E. Vasar[†]

[†]Department of Physiology, University of Tartu, Tartu, Estonia

[‡]Institute of Zoology and Hydrobiology, University of Tartu, Tartu, Estonia

*Corresponding author: S. Kõks, Department of Physiology, University of Tartu, 19 Ravila Street, 50411 Tartu, Estonia. E-mail: sulev.koks@ut.ee

The aim of a present study was to identify the genes activated or inactivated in the amygdaloid area after the exposure to cat odor. Cat odor exposure was used to induce the ethologically relevant anxiety reaction in male rats. Differential expression of genes was analyzed using the cDNA Representational Difference Analysis (cDNA RDA). Differentially expressed mRNAs were identified by sequencing combined with database search and subsequently verified by dot blot analysis. Exposure of rats to cat odor induced avoidance of odor stimulus and suppressed the exploratory activity of animals. We found that during the cat odor exposure several genes with various functions were activated in the amygdaloid area of rat. Moreover, reverse subtraction resulted in a different set of genes that are inactivated during anxiety response. These genes can be classified according to their function as the neurotransmission related, enzymes, cell cycle regulating proteins and transcription factors. We found that during anxiety response the genes participating directly or indirectly in the synthesis of neurotransmitters (carboxypeptidase E, tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-mono-oxygenase activation protein, wolframín) were up regulated. Moreover, a number of genes involved in the signal transduction (Rho GTPase, neurochondrin, Ca/calmodulin-dependent protein kinase) were also activated. Additionally, reverse subtraction in control animals identified several up regulated genes having the antagonistic action to these genes (nischarin, Rab geranylgeranyl transferase). In conclusion, we were able to define the possible pathways linked to the regulation of anxiety response.

Keywords: Amygdala, anxiety, cat odor, cDNA-Representational Difference Analysis, fear, rats

Received 31 March 2003, revised 15 September 2003, accepted for publication 16 September 2003

Current understanding of molecular mechanisms of anxiety disorders is based on the effectiveness of drugs, interacting with GABA_A receptor complex and inhibiting 5-HT and NE re-uptake, in the treatment of pathological anxiety. However, the drugs used for the treatment of anxiety are far from being perfect. Benzodiazepine agonists, increasing the affinity of GABA_A receptors for the endogenous GABA, have a high abuse potential and antidepressant drugs, inhibiting 5-HT and NE re-uptake, increase anxiety if too high doses are administered in the beginning of treatment. The application of modern methods of molecular biology helped to discover the site of anxiolytic effect of benzodiazepine agonists since the point mutation of $\alpha 2$ -subunit of GABA_A receptors abolished the anxiolytic action of diazepam in mice (Low *et al.* 2000). Mice lacking this subunit of GABA_A receptor display significantly higher anxiety compared to wild-type littermates (Low *et al.* 2000). Nevertheless it is not known whether the genetic variations of GABA_A receptor $\alpha 2$ -subunit will make people more susceptible to anxiety disorders. Recently the duplication of a part of chromosome 15 (DUP-25) was described in people suffering from panic attacks (Gratacos *et al.* 2001). Due to that duplication several genes are over-expressed including the genes of three subunits of nicotinic acetylcholine receptors and neurotrophin-3 receptor. It is obvious that our understanding about anxiety disorders is mainly based on the regulation of synaptic transmission not considering the other possible mechanisms. Therefore, in the present study an attempt was made to study the changes in gene expression levels due to anxiety response in rats. It is well established that the neural circuits involved in the control of anxiety and fear make the synapses at the level of the amygdala (Davis & Whalen 2001; LeDoux 2000). The functional role of amygdala is related to the regulation of emotional behavior and vigilance. It has been characterized as a convergence site for the input of emotionally significant stimuli and output of behavioural responses. Damage to the amygdala prevents rats and man from the learning of stimuli warning about the presence of danger (LeDoux 1998). Contextual fear conditioning induces c-fos expression in the medial amygdaloid nucleus of rat (Milanovic *et al.* 1998). Similarly, after the cat odor exposure the increased level of c-fos expression has been determined in the medial posteroventral amygdaloid nucleus (Dielenberg *et al.* 2001b). However, the precise nature of biochemical and molecular mechanisms underlying negative emotions and the role of amygdala in that is not fully understood. Therefore,

the aim of the present study was to determine the genes selectively activated in the amygdaloid area after exposure to cat odor.

In our study we used an unconditional anxiety model; anxiety response in rats induced by exposure to cat odor. Anxiety response induced by the odor of a predator is innate behavioral reaction and evolutionary highly conserved (Panksepp 1998). Exposure to predators and their odors is being used increasingly to examine the behavioral and neuroendocrine responses to the natural stressors (Belzung *et al.* 2001; Dielenberg *et al.* 2001a). For example, exposure to either the presence of a cat or the odor of a cat significantly increases plasma corticosterone levels in the male laboratory rats (File *et al.* 1993). Even very brief (for 5 min) exposure to the predator odor activates the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis (Dielenberg *et al.* 2001a; Perrot-Sinal *et al.* 1996). The smell of the predator is a sensory stimulus having direct access to the anxiety circuitry. Most studies have described the robust biochemical changes in the periaqueductal gray (PAG) (Canteras & Goto 1999; Dielenberg *et al.* 2001b). In the present study we focused on the amygdaloid area as it is related to the processing of afferent inputs and it influences the autonomic and hormonal processes, motor behavior and attention.

To establish the cat odor induced genes in the rat amygdala we applied cDNA Representational Difference Analysis (cDNA RDA). This method is a polymerase chain reaction (PCR)-based subtractive hybridization technique for identifying sequences that differ between two populations of DNA (Hubank & Schatz 1999). There are presently a number of methods available to compare gene expression profiles of two different mRNA populations. DNA microarrays are probably the most widely used tool (Khan *et al.* 1999). Another group of methods (e.g. RDA, suppression subtractive hybridization, ADGE) are based on the subtractive hybridization in combination with the PCR amplification (Chen *et al.* 2001; Diatchenko *et al.* 1996). The latter methods have two major advantages over the DNA microarrays. Firstly, they are able to detect very small differences even for rare mRNA transcripts (Diatchenko *et al.* 1996). Secondly, these methods enable us to identify previously unknown genes. Therefore, we decided to use cDNA-RDA in the present study. Accumulating literature demonstrates the efficacy of a technique and its wide range of potential applications. To date, these studies have included the identification of transcriptional changes associated with various treatments, development, gender and cancer (Hubank & Schatz 1999).

Materials and methods

Subjects and behavioral analysis

The subjects were male rats (Han/Kuo: WIST) weighing 250–280 g at the time of testing. They were housed in groups of six in a temperature-controlled (21 ± 2 °C) facility under a 12 h/12 h

light/dark cycle (lights on at 07.00). Tap water and food pellets were available *ad libitum*. All animal procedures were approved by the University of Tartu Animal Care Committee in accordance with the European Communities Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC). Animals were divided into two groups with 12 rats in each. The first group was exposed to the cloth impregnated with the smell of predator (cat); the other group was exposed to clean cloth. As our aim was not related to the detection of immediate early genes, which are rather unspecific indicators of transcriptional changes, the exposure to cat odor and simultaneous video recording lasted 30 min. The exposure was performed in two separate, but similar rooms (lighting conditions, humidity, ventilation, etc.) and animals were habituated to these rooms three days before the experiment. Videotaped behavioral responses were analyzed by an observer who was not aware of the manipulations performed with rats. At the end of each minute, the videotape was paused and the number of animals sniffing the cloth, in the proximity of the cloth or touching the cloth were recorded. We also evaluated the number of animals grooming in each group. These behavioral measures have been shown to reflect the avoidance and anxiety of the unpleasant object (Belzung *et al.* 2001). The results are expressed as mean values \pm SEM and were analyzed using Mann–Whitney U-test. After the behavioral testing the rats were decapitated, the brains were rapidly removed from the skull and sliced. Dissection of amygdala was performed using a round-shape puncher (Fig. 1) according to the coordinates of rat brain atlas of Swanson (Swanson 1998). Our tissue samples contained the basolateral, central and medial nuclei of amygdala. The preparations from six animals were pooled to minimize the fluctuations coming from the individual differences.

cDNA Representational Difference Analysis (cDNA-RDA)

mRNA was purified from the tissue samples of amygdala (QIAGEN (Hilden, Germany) RNeasy and Oligotex mRNA kit)

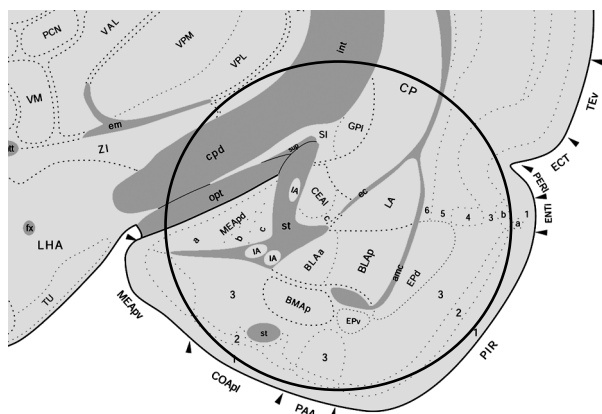


Figure 1: Preparation of amygdala to screen for genes induced after exposure to the predatory odor.

followed by cDNA synthesis (Gibco BRL (Paisley, UK) Superscript Choice System for cDNA Synthesis). Differential gene expression analysis was performed in two directions. In the 'forward' subtraction experiment the animals with anxiety response were the 'tester' group; in 'reverse' subtraction, the 'tester' group consisted of control animals. RDA was performed according to the protocol of Hubank and Schatz (Hubank & Schatz 1999) with minor modifications (O'Neill & Sinclair 1997; Pastorian *et al.* 2000). Briefly, double-stranded cDNA was digested with *DpnII* (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) and ligated to annealed R-adaptors (sequences of primers are in Table 1). Amplicons for both 'tester' and 'driver' were generated with Vent DNA Polymerase in appropriate buffer (New England Biolabs). For tester 5 and for driver 20, 200- μ l PCRs were performed. *DpnII* digestion was used to remove the R-adaptors from both driver and tester amplicons, followed by ligation of J-adaptors. Subtractive hybridizations were performed in 5- μ l reactions at 67 °C for 24 h in a thermocycler. To generate difference product 1 (DP1), 0.4 μ g of tester cDNA was mixed with 40 μ g of driver cDNA at a ratio of 1:100. DP1 was digested with *DpnII* to remove J-adaptors before ligation of N-adaptors. To generate DP2, 50 ng of tester cDNA was mixed with 40 μ g of driver cDNA at a ratio of 1:800. DP2 was digested with *DpnII* to remove N-adaptors before ligation of J-adaptors. To generate a third difference product (DP3), 100 pg J-ligated DP2 was mixed with 40 μ g driver (stringency 1:400 000). Another experiment was performed where 4 ng of DP2 was mixed with 40 μ g of driver cDNA to get a ratio of 1:10 000 for DP3. DP3 was digested finally with *DpnII* to obtain *Bam*HI compatible ends. For removal of digested adapters, spin column purification with Qiagen PCR purification kit was applied. The subtracted library was fractionated by agarose gel electrophoresis. Fractions in 1.5% low-melting agarose gels were cut and QIAEX II Gel Extraction was performed. Fractions were ligated into the *Bam*HI site of vector pGEM-7. The libraries were plated onto agar plates (with 50 μ g/ml ampicillin) and incubated at 37 °C overnight. After brief incubation at 4 °C the blue/white staining became clearly distinguishable. The plasmids were purified from 2-ml cultures of the white colonies by alkaline lysis protocol. 300 ng of each plasmid DNA was used to perform cycle sequencing on ABI310 sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA) with M13 forward primers according to the manufacturer's instruc-

tions. Sequence alignments were performed with the UK-HGMP software *NIX* (Williams *et al.* 1998).

Dot-blot analysis of clones

After sequencing and alignment, only clones containing different inserts were used for dot blot analysis to confirm the results of RDA. 100 ng of DNA with 0.4 M NaOH and 10 mM EDTA was denatured (10 min at 100 °C) and dotted onto a Hybond N⁺ nylon membrane, followed by UV cross-linking. DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit^l (Roche, Mannheim, Germany) was used for generation of hybridization probes and for hybridization of membranes. An equal amount of cDNA was used for the synthesis of DIG labeled probes. Each set of clones was dotted onto two identical membranes. One membrane was hybridized with starting cDNA from the 'anxiety' group; another was hybridized with starting cDNA from the 'control' group. The membranes containing different set of clones ('anxiety' or 'control' group) were hybridized with an identical probe in one hybridization tube in the identical conditions. Each experiment was repeated twice with newly synthesized probes (from different animals) to avoid fluctuations caused by the experimental situation. Dot blots were scanned and analyzed with QUANTITY ONE Software (GS 710 Calibrated Imaging Densitometer, Bio-Rad, München, Germany). Comparisons of the identical dots (same clones) but hybridized with different probes were performed. To correct for the gray value, a small area in between dots was measured as a local reference. Each gray value of the measured areas was corrected for this local reference. The resulting optical densities of dots were compared to the membrane hybridized with a different probe in the same experiment. Results are expressed as fold changes of respective dots.

Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

RT-PCR was applied to find the differential expression of the c-fos corticotrophin-releasing hormone (CRH) GAMM1 and carboxypeptidase E (CPE) in separate samples (not used for differential cloning). In addition, to confirm the efficiency of subtractive hybridization, we performed RT-PCR analysis of both drivers (amplified cDNA pools) and DP3 products. Total RNA was extracted, DNase-treated and subjected to RT-PCR using specific primers for glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, housekeeper to control the amount of RNA), c-fos and CRH. Primers were the following: GAP1: 5'-CCC TCA AGA TTG TCA GCA ATG C-3', GAP2: 5'-GTC CTC AGT GTA GCC CAG GAT-3' for GAPDH; CFOS2: 5'-TCA CAG GGC TAG CAG TGT GG-3', CFOS3: 5'-ATG ACC TGG GCT TCC CAG AG-3' for c-fos; CRF1S 5'-TGG GTG AAG AAT ACT TCC TC-3', CRF2AS 5'-AGA GAG ATG GGC GGC TCC TC-3' for CRF; GAMM1F: 5'-CTG ACC AAG ACA CTG AGG CAG G-3', GAMM1R: 5'-GCT CCT TGG GCA CAC ACT GG-3' FOR GAMM1; CPEF: 5'-GCT CTC TGC CAA CCT GCA CG-3', CPER: 5'-CTC AAA GCA

Table 1: Sequences of primers used for RDA

Name	Sequence of primer
R-Bgl-24	5'-AGCACTCTCCAGCCTCTCACCGCA
R-Bgl-12	5'-GATCTGCGGTGA
J-Bgl-24	5'-ACCGACGTCG-ACTATCCATGAACA
J-Bgl-12	5'-GATCTGTTCATG
N-Bgl-24	5'-AGGCAACTGTGCTATCCGAGGGAA
N-Bgl-12	5'-GATCTTCCCTCG

GTT GCT GCT CAG G-3' for CPE. First strand synthesis was performed with Superscript II (Gibco BRL) according to manufacturer's guidelines. Briefly, 2 pmole of random primers and 500 ng DNase treated RNA were used. Primers were designed to anneal on the sequences of different exons to avoid the influence of contaminating genomic DNA. PCR was performed from the serial dilutions of the first-strand reaction mix and 10 μ l of products were separated by agarose gel electrophoresis with the results digitally stored. Optical densities of fragments were compared by the densitometric analysis using QUANTITY ONE Software. The amount of mRNA product for c-fos, CRF, GAMMA and CDE was calculated as the ratio to GAPDH mRNA product.

Results

Behavioral experiments

The cloth containing cat odor induced a robust anxiety-like behavior in rats (Fig. 2). The grooming behavior of rats exposed to the cat odor was reduced (1.5 ± 0.26 vs. 0.16 ± 0.09). In addition, after the cat odor exposure they sniffed the cloth less (3.56 ± 0.34 vs. 1.46 ± 0.19), fewer animals spent time in the proximity of the cloth (7.0 ± 0.36 vs. 3.1 ± 0.17) and they did not touch the cloth at all (1.3 ± 0.2 vs. 0). Differences in all recorded measures reached statistically significant levels ($P < 0.01$, Mann-Whitney U-test).

A screen for genes induced in amygdala was performed to find the genes expressed in the amygdala in response to cat odor exposure. When DP3 was generated at high stringency (1:400 000), no detectable bands were observed. Therefore, we applied much lower stringency for the DP3 subtraction (1:10 000) and at the end of differential cloning (DP3) clearly distinguishable bands were observed. This probably indicates that there are no robust changes in gene expression caused by anxiety response, and resulting differences with the relaxed condition reflect moderate quantitative differences

between these two populations. We randomly isolated 288 up-regulated clones and 288 clones down-regulated during anxiety response. All clones were sequenced and analyzed by the NIX application (at the UK HGMP website). A database search (<http://menu.hgmp.mrc.ac.uk/menu-bin/Nix/Nix.pl>) revealed several genes with different functions. There were transcription factors, transporter molecules, enzymes, receptors, expressed sequence tags (ESTs) and recently cloned proteins with unknown function. Dot blot analysis confirmed 41 differentially expressed genes in anxiety responders and 26 differentially expressed genes in control animals (Tables 2 and 3). Examples of the most remarkable differences after dot-blot hybridization are shown in Table 4. Moreover, semiquantitative differences between different dots were measured (Tables 2 and 3). After forward subtraction we found evidence for up regulation of carboxypeptidase E (CPE) and tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase-activation protein (protein 14-3-3), the genes which are involved in the synthesis of neurotransmitters. However, the difference in expression level was rather small (1.1- and 1.2-fold increase). With the highest expression level (1.8-fold increase) we found a gene with unknown function: GAMM1 or *Myg-1* (melanocyte proliferating gene 1). The genes with moderate differences in expression levels were Rho-GTPase, CDCrel-1, NFB42, Ca/calmoduline-dependent protein kinase, $\text{Na}^+/\text{K}^{+/-}$ ATPase. The rest of the genes showed only small differences in the expression levels compared to the control group. After reverse subtraction the highest differences (1.4-fold increase) were found for nectadrin and to general control of amino acid synthesis-like 2 (also named as *LOC303540*, *PCAF-B/GCN5*). All other genes showed only small levels of differences.

Most of the differentially expressed genes were with unknown function. However, in some cases there is limited data about their possible function and the results were interpreted according to the published data to understand a possible role for these genes in the regulation of anxiety.

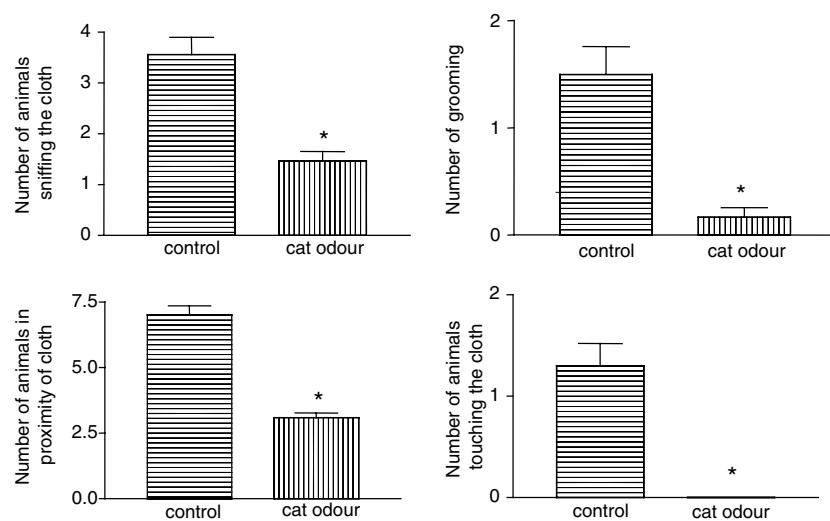


Figure 2: Behavioral changes in rats during exposure to cat odor. Rats were exposed to the cloth impregnated with cat odor for 30 min and behavior was recorded. At the end of each minute the videotape was paused and the number of animals performing certain behavioral patterns was evaluated. (* $P < 0.01$, Mann-Whitney U-test).

Table 2: Transcripts increased in amygdala of rat during fear response. Each clone was dotted onto two identical membranes; equal amount of cDNA was used for the synthesis of DIG-labeled probes and hybridization. The cDNA of six animals in each group was pooled and used as hybridization probes. In order to minimize false positive results we used cDNA for hybridization that was not used for RDA. Experiments were repeated twice, only genes giving positive signals in both experiments are listed in Tables 2 & 3. In order to evaluate semiquantitative differences corrected gray values of the dots were compared to the membrane hybridized with a different probe.

Gene name	GenBank Acc	Fold increase
GAMM1 M musculus protein, Myg-1	AF252871	1.8
CDCre1-1 A	AB027143	1.5
KIAA0337 protein, Rho-specific guanine-nucleotide exchange factor 164 kDa	NM_014786	1.5
Rattus norvegicus Rho GTPase activating protein 4 (Arhgap4)	NM_144740	1.5
Neural F box protein NFB42	AF098301	1.4
Putative transmembrane protein 2c	AF282981	1.4
BEC1 protein	AF035814	1.3
Ca/calmoduline-dependent protein kinase alpha	AB023658	1.3
KIAA0408 protein	AL096711	1.3
Mus musculus expressed sequence A1428855	A1428855	1.3
Na ⁺ ,K ⁺ ATPase alpha(+) isoform catalytic subunit	M14512	1.3
NADH-ubiquinone oxidoreductase B17 subunit	XM_204158	1.3
NIR1	AF334586	1.3
Rattus norvegicus calmodulin III (Calm3)	AF231407	1.3
Rattus norvegicus CaM-kinase II inhibitor alpha	AF271156	1.3
Rattus norvegicus neurochondrin, norbin	NM_053543	1.3
Apolipoprotein E gene	J02582	1.2
Carboxypeptidase E (EC 3.4.17.10)	X51406	1.2
DXImx39e, M. musculus	AF229636	1.2
Homeobox protein HOX-4.4 and HOX-4.5	X62669	1.2
Limbic system associated membrane protein (LsAMP)	NM_017242	1.2
Myelin-associated glycoprotein precursor (I-MAG/S-MAG)	M14871	1.2
NCI-CGAP-Lu29, M. musculus cDNA clone 601102606F1	BE305755	1.2
ODZ3	AF195418	1.2
T-type calcium channel alpha-1 subunit	AF051947	1.2
WFS1, wolframin	AF136378	1.2
Beta-spectrin III	AB008551	1.1
EST 196451 Normalized rat kidney, cDNA clone RKIAV31	AA892648	1.1
EST349530 Rat gene index, cDNA clone RGIEO08	AW918226	1.1
Gelsolin (actin-depolymerizing factor – ADF), brevin	J04953	1.1
Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2813462	AW303350	1.1
KIAA0429 protein	XM226503	1.1
KIAA0771 protein	AB018314	1.1
Mus musculus cDNA clone IMAGE:575778	AA120430	1.1
NCI-CGAP-Lu29, M. musculus cDNA clone IMAGE: 3989880, 601770406F1	BF161425	1.1
NIH_MGC_71 Homo sapiens cDNA clone	BE889795	1.1
Rattus norvegicus Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, theta polypeptide	NM_013053	1.1
Transketolase (EC 2.2.1.1)	U09256	1.1
Rattus norvegicus similar to hypothetical protein MGC25696	XM229276	1.1
KIAA0014 protein	NM_014665	1.1

RT-PCR analysis

Reverse transcriptase PCR was performed with the aim of finding differences in the expression levels of c-fos, CRF, GAMM1 and CPE genes. The ratio of c-fos/GAPDH, CRF/GAPDH, GAMM1/GAPDH and CPE/GAPDH were used to quantify relative expression levels. We did not find

any differences in the c-fos or CRF expression levels in rats after the exposure to cat odor (Fig. 3, CRF data not shown). To confirm dot blot hybridization we performed RT-PCR also from the 3rd differential products (Fig. 3). We did not find any signal of GAPDH and c-fos after the subtraction, which confirms that equally represented transcripts were subtracted

Table 3: Transcripts increased in amygdaloid area of control rats compared to rats with fear response

















Gene name	GenBank Acc	Fold increase
Similar to general control of amino acid synthesis-like 2, LOC303540	NM020004	1.4
Rattus norvegicus heat stable antigen CD24, nectadrin	U49062	1.4
2,3-cyclic nucleotide 3-phosphodiesterase (CNPII)	L16532	1.3
Mus musculus signal recognition particle receptor beta subunit	U17343	1.3
Neural membrane protein 35	AF044201	1.3
Testican-3 protein	AJ278998	1.3
G protein gamma subunit (gamma7 subunit)	L23219	1.2
MAP kinase kinase	Z16415	1.2
Mus musculus, clone IMAGE:3987018	BC019714	1.2
Mus musculus, Similar to hypothetical protein clone MGC:7259 IMAGE:3484751	BC002144	1.2
Nischarin	AF315344	1.2
Plectin	X59601	1.2
Rattus norvegicus voltage-dependent anion channel	AF268469	1.2
rELO1 mRNA for fatty acid elongase 1	AB071985	1.2
Rev-Erb-alpha protein	AF291821	1.2
Sequence specific single-stranded DNA-binding protein 2	AY037837	1.2
Similar to stress-associated endoplasmic reticulum protein 1	BC029067	1.2
Cyclin-dependent kinase homologue	L37092	1.1
EST293447 Normalized rat brain cDNA clone RGIBE57	AW143151	1.1
Mus musculus, predicted gene ICRFP703B1614Q5.3	BC002208	1.1
NCI_CGAP_Mam2 M μ s musculus cDNA clone IMAGE:5374091, 603346543F1	BI697150	1.1
Non-histone chromosomal protein HMG-14	X53476	1.1
Rab geranylgeranyl transferase component B beta	S62097	1.1
SIR2L2	AF299337	1.1
Splicing factor U2AF 65 kDa subunit	X64587	1.1
ZnBP gene for zinc binding protein	X64053	1.1

'out'. Interestingly, in cDNAs (drivers) we detected both GAMM1 and CPE signals without any significant differences. After subtraction, CPE signals were detectable in both samples (higher in the 'cat odor' sample); GAMM1 signal was present only in the 'cat odor' sample. This result shows that RDA is also sensitive to detecting small quantitative differences existing in starting material. However, precise measurements of the levels of transcripts in DP3 were impossible, as no housekeeper signal was detected after subtraction.

Discussion

The results from the studies on anxiety and fear have so far been relatively inconsistent, mostly because the models used by researchers have been too artificial. A remarkable shift towards more natural models having greater ethological relevance has occurred recently (Hendrie *et al.* 1996; Rodgers 1997). Therefore, in our study we decided to use a model with a natural unpleasant stimulus: cat odor. The behavior evoked by cat odor in the present study replicates

Table 4: Results of the dot-blot hybridization. Only samples with the most remarkable differences are shown. 100 μ l of sample (contains 100 ng unamplified plasmid DNA with 0.4 M NaOH and 10 mM EDTA) was denatured (10 min at 100 °C) and dotted onto a Hybond N⁺ nylon membrane. Unsubtracted cDNAs were used as probes and non-radioactive labeling (with DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter *Kit* from Roche) reaction was performed.

Cat probe	Control probe	Clone name
		GAMM-1
		Rho GTPase activating protein 4
		CDCrel-1 A
		Ca/calmoduline-dependent protein kinase alpha
		LOC303540
		Testican-3
		Rev-Erb-alpha protein
		Rab geranylgeranyl transferase

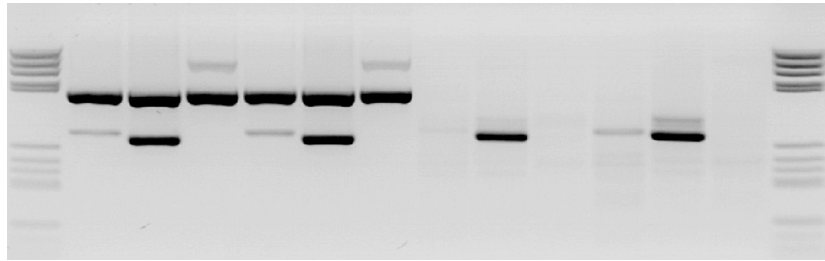


Figure 3: RT-PCR analysis of drivers (amplified cDNA) and 3rd differential product (DP3). GAPDH primers were used to control the loading of DNA in all lanes (product size 409 bp). Lane 1: pBR322 DNA/*Bsu*RI (*Hae*III) Marker; Lane 2: cDNA control, GAMM1 primers (product 303 bp); Lane 3: cDNA control, carboxypeptidase E (CPE) primers (product 289 bp); Lane 4: cDNA control, c-fos primers (product 520 bp); Lane 5: cDNA cat odor, GAMM1 primers; Lane 6: cDNA cat odor, CPE primers; Lane 7: cDNA cat odor, c-fos primers; Lane 8: DP3 Control, GAMM1 primers; Lane 9: DP3 Control, CPE primers; Lane 10: DP3 Control, c-fos primers; Lane 11: DP3 Cat odor, GAMM1 primers; Lane 12: DP3 Cat odor, CPE primers; Lane 13: DP3 Cat odor, c-fos primers; Lane 14: pBR322 DNA/*Bsu*RI (*Hae*III) Marker.

previously described results (Dielenberg *et al.* 2001a). Cat odor-exposed rats expressed behavioral suppression because they spent less time in the close vicinity of the cloth and avoiding contact with the cloth. In addition, the grooming behavior was markedly reduced. This type of behavioral suppression is considered to reflect anxiety rather than fear, as this behavioral reaction persists for some time after the odor exposure (McGregor *et al.* 2002).

We identified a number of genes over-expressed in the rat amygdala due to the cat odor exposure. Taken together they reflect that not only the genes related to the neurotransmission, but also the other genes responsible for functioning of nerve and glial cells are activated. Results from the 'reverse' subtraction (control vs. cat odor group) are considered to show us the genes that are down regulated during the anxiety response. 'Reverse' subtraction gives us additional information to the results obtained from the 'forward' subtraction and is useful as an 'internal control'. Complex analysis of the genes from both subtractions supports the findings from each of the experiments and helps to understand their function, especially when the genes with antagonistic functions were found from the different experiments. As we did not get detectable signals at the high stringency subtractions (1:400 000), but instead more relaxed conditions (1:10 000), we can conclude that the changes in the abundance of these transcripts are moderate quantitative differences and not 'all-or-nothing' qualitative differences. A similar effect of the subtraction stringency has been described earlier (Hubank & Schatz 1994). Another important issue is that subtractive hybridization and subsequent PCR enriches relatively the abundance of rare transcripts in the mRNA population. That can explain why we detected genes with rather small differences in their expression levels. Of course, it is possible that subtraction has not been sensitive and efficient enough. We confirmed our subtraction by means of RT-PCR. Transcripts equally expressed in both samples (housekeepers) should disappear after RDA. Indeed, we were not able to detect

signals for GAPDH and cyclophilin. Even signals for c-fos disappeared after performing RDA. According to published data the genes we were able to clone could be grouped into possible functional subgroups.

The first set includes genes directly related to the neurotransmission. Carboxypeptidase E participates in the synthesis of neuropeptides involved in the regulation of emotional behavior (Berman *et al.* 2001; Gabreels *et al.* 1998). Wolframin is a protein with unknown function, but it seems to be involved in the regulation of emotional behavior. Mutations in the wolframin gene may predispose people to affective disorders (Swift *et al.* 1998). As the activation of the wolframin gene occurs in parallel with the activation of carboxypeptidase E, it is tempting to speculate that wolframin is a protein participating in the synthesis of bioactive peptides, including neuropeptides (Köks *et al.* 2002). Some supportive evidence for that speculation comes from the recent study stating that wolframin patients have defective vasopressin processing with no detectable staining for prohormone convertase 2 (Gabreels *et al.* 1998). However, this hypothesis needs further investigation. The tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase-activation protein (14-3-3) reflects that the synthesis of monoamines is activated. The up-regulation of these genes supports their possible role in stress coping. On the other hand, we found in the control animals the increase of genes of neural membrane protein 35 (NMP35) and G protein gamma 7 subunit. These genes are involved in signal transduction in many types of neurons. NMP35 is a novel protein expressed in dendrites and at the postsynaptic membrane (Schweitzer *et al.* 2002). These genes reflect the down-regulation of certain signaling pathways during the anxiety response.

Rho GTPase activating protein and Rho-specific guanine-nucleotide exchange factor are both involved in growth cone guidance (Dickson 2001). We were able to detect the activation of several different genes involved in that pathway (Rho GTPase activating protein 4, Rho-specific guanine-nucleotide

exchange factor) during the anxiety response. In addition, we established that the Ca/calmodulin-dependent protein kinase alpha and neurochondrin (norbin) were up regulated during the exposure to cat odor. Both these genes have been shown to participate in the formation of LTP (Kasahara *et al.* 2001; Shinozaki *et al.* 1997). Several genes, having suppressive action on the Rho GTP-ase pathway, are down-regulated during the anxiety response. After 'reverse' subtraction we found that the Rab geranylgeranyl transferase and nischarin genes were up-regulated in control rats compared to the cat odor exposure rats. These genes have been shown to inhibit the activity of the Rho GTP-ase pathway (Alahari *et al.* 2000; Holstein *et al.* 2002). The inhibition of these genes is in agreement with the finding that the Rho GTP-ase pathway is activated during the anxiety response. Recent evidence suggests the involvement of Rho GTP-ase in the fear memory formation (Lamprecht *et al.* 2002). Therefore, it is likely that the exposure of rats to the cat odor for 30 min also activates the memory pathways in the amygdala.

Apolipoprotein E is related to the pathogenesis of Alzheimer's disease. Recent findings suggest a role of apolipoprotein E in the regulation of neurotransmission and especially in the synaptic plasticity. Namely, an apolipoproteinE4-induced disruption of phosphoinositide hydrolysis has been established (Cedazo-Minguez & Cowburn 2001). Interestingly, we found the activation of gelsolin, an actin-depolymerizing factor, in response to cat odor exposure. Gelsolin has been shown to interact with apolipoprotein E and is related to the amyloidosis (Fadika & Baumann 2002). On the other hand, Rev-Erb-alpha protein, down regulated during cat odor exposure, is an orphan nuclear hormone receptor and has been described as a negative transcriptional regulator for the apolipoproteinE gene (Coste & Rodriguez 2002).

Limbic system-associated membrane protein (LsAMP) is a glycoprotein expressed on the surface of somata and proximal dendrites of neurons in cortical and subcortical regions of the limbic system (Zacco *et al.* 1990). Functional and biochemical studies indicate that LsAMP selectively promotes neurite outgrowth of neurons comprising limbic pathways and mediates proper circuit formation (Pimenta *et al.* 1995). LsAMP seems to be an important determinant to proper limbic system development and function. The present study demonstrates the over-expression of LsAMP gene in the amygdala due to the anxiety response. Interestingly, the selection of rats according to their exploratory behavior also revealed the increased expression of LsAMP gene in the periaqueductal grey of anxious rats (our unpublished data).

Another interesting finding was the robust overexpression of unknown protein GAMM1 (also known as melanocyte proliferating gene 1, Myg1, AF252871). There is no data about its function other than it is a highly conserved gene and is related to the proliferation of melanocytes. Its high

up-regulation in the amygdala during anxiety response is remarkable and needs further study.

We could not find any differences in the expression levels of c-fos and CRF after cat odor exposure in amygdala of rats. Both these genes have been shown to be activated during anxiety response induced by predatory odor (Adamec *et al.* 1998; Dielenberg *et al.* 2001b). As c-fos activation has been mostly studied by immunohistochemistry and in our study we used mRNA detection, one possible explanation is a shorter lifetime of mRNA compared to the c-fos protein. On the other hand, we used quite a large area of amygdala in our study. Our sample contained, in addition to the central nucleus; basolateral, basomedial and medial nuclei of amygdala and other subnuclei of amygdala. Therefore the samples of different studies are quite different and in our case 'dilution' of specific mRNA-s might be the case. In addition, gene expression profiles of different genes in amygdala follow its anatomical subdivision (Zirlinger *et al.* 2001). In this study Affymetrix GeneChips comprising 34 325 murine genes and ESTs were used to identify amygdala-enriched genes. The authors found 33 genes to be enriched in amygdala compared to other studied brain areas. Comparison of the list of genes (available online as supplementary information: <http://www.pnas.org/cgi/content/full/98/9/5270/DC1>) revealed some similarities between the study of Zirlinger *et al.* (2001) and our study. For instance we found up-regulation of homeobox protein HOX-4.4 after cat odor exposure and SIR2L2 in control animals. Both of these genes were also found by Zirlinger *et al.* (2001) as enriched in amygdala (D49658 and TC17396, respectively).

The present study demonstrates that the complex differential analysis of gene expression is useful to analyze the molecular mechanisms of anxiety and to find new potential targets for drug discovery. By using natural stimulus to induce anxiety response in rats we were able to define to some extent the genes potentially involved in the anxiety-specific pathways. Most of the identified genes in this study are still with unknown function or their role in relation to the neurobiology of emotions is not yet described. Some of these genes are functionally related and forming the pathways which might be related to anxiety. For instance we defined genes related to the increased neurotransmission along with genes related to the memory formation. However, more detailed analysis of the function of these genes is needed.

References

- Adamec, R., Kent, P., Anisman, H., Shallow, T. & Merali, Z. (1998) Neural plasticity, neuropeptides and anxiety in animals – implications for understanding and treating affective disorder following traumatic stress in humans. *Neurosci Biobehav Rev* **23**, 301–318.
- Alahari, S.K., Lee, J.W. & Juliano, R.L. (2000) Nischarin, a novel protein that interacts with the integrin alpha5 subunit and inhibits cell migration. *J Cell Biol* **151**, 1141–1154.

- Belzung, C., El Hage, W., Moindrot, N. & Griebel, G. (2001) Behavioral and neurochemical changes following predatory stress in mice. *Neuropharmacology* **41**, 400–408.
- Berman, Y., Mzhavia, N., Polonskaia, A. & Devi, L.A. (2001) Impaired prohormone convertases in Cpe (fat)/Cpe (fat) mice. *J Biol Chem* **276**, 1466–1473.
- Canteras, N.S. & Goto, M. (1999) Fos-like immunoreactivity in the periaqueductal gray of rats exposed to a natural predator. *Neuroreport* **10**, 413–418.
- Cedazo-Minguez, A. & Cowburn, R.F. (2001) Apolipoprotein E isoform-specific disruption of phosphoinositide hydrolysis: protection by estrogen and glutathione. *FEBS Lett* **504**, 45–49.
- Chen, Z.J., Shen, H. & Tew, K.D. (2001) Gene expression profiling using a novel method: amplified differential gene expression (ADGE). *Nucl Acids Res* **29**, E46.
- Coste, H. & Rodriguez, J.C. (2002) Orphan nuclear hormone receptor Rev-erbalpha regulates the human apolipoprotein CIII promoter. *J Biol Chem* **277**, 27 120–27 129.
- Davis, M. & Whalen, P.J. (2001) The amygdala: vigilance and emotion. *Mol Psychiatry* **6**, 13–34.
- Diatchenko, L., Lau, Y.F., Campbell, A.P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E.D. & Siebert, P.D. (1996) Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 6025–6030.
- Dickson, B.J. (2001) Rho GTPases in growth cone guidance. *Curr Opin Neurobiol* **11**, 103–110.
- Dielenberg, R.A., Carrive, P. & McGregor, I.S. (2001a) The cardiovascular and behavioral response to cat odor in rats: unconditioned and conditioned effects. *Brain Res* **897**, 228–237.
- Dielenberg, R.A., Hunt, G.E. & McGregor, I.S. (2001b) 'When a rat smells a cat': the distribution of Fos immunoreactivity in rat brain following exposure to a predatory odor. *Neuroscience* **104**, 1085–1097.
- Fadika, G.O. & Baumann, M. (2002) Peptides corresponding to gelsolin derived amyloid of the finnish type (AGelFIN) adopt two distinct forms in solution of which only one can polymerize into amyloid fibrils and form complexes with apoE. *Amyloid* **9**, 75–82.
- File, S.E., Zangrossi, H.J., Sanders, F.L. & Mabbutt, P.S. (1993) Dissociation between behavioral and corticosterone responses on repeated exposures to cat odor. *Physiol Behav* **54**, 1109–1111.
- Gabreels, B.A., Swaab, D.F., de Kleijn, D.P., Dean, A., Seidah, N.G., Van de Loo, J.W., Van de Ven, W.J., Martens, G.J. & Van Leeuwen, F.W. (1998) The vasopressin precursor is not processed in the hypothalamus of Wolfram syndrome patients with diabetes insipidus: evidence for the involvement of PC2 and 7B2. *J Clin Endocrinol Metab* **83**, 4026–4033.
- Gratacos, M., Nadal, M., Martin-Santos, R., Pujana, M.A., Gago, J., Peral, B., Armengol, L., Ponsa, I., Miro, R., Bulbena, A. & Estivill, X. (2001) A polymorphic genomic duplication on human chromosome 15 is a susceptibility factor for panic and phobic disorders. *Cell* **106**, 367–379.
- Hendrie, C.A., Weiss, S.M. & Eilam, D. (1996) Exploration and predation models of anxiety: evidence from laboratory and wild species. *Pharmacol Biochem Behav* **54**, 13–20.
- Holstein, S.A., Wohlford-Lenane, C.L. & Hohl, R.J. (2002) Isoprenoids influence expression of ras and ras-related proteins. *Biochemistry* **41**, 13 698–13 704.
- Hubank, M. & Schatz, D.G. (1994) Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucl Acids Res* **22**, 5640–5648.
- Hubank, M. & Schatz, D.G. (1999) cDNA representational difference analysis: a sensitive and flexible method for identification of differentially expressed genes. *Meth Enzymol* **303**, 325–349.
- Kasahara, J., Fukunaga, K. & Miyamoto, E. (2001) Activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV in long term potentiation in the rat hippocampal CA1 region. *J Biol Chem* **276**, 24044–24050.
- Khan, J., Saal, L.H., Bittner, M.L., Chen, Y., Trent, J.M. & Meltzer, P.S. (1999) Expression profiling in cancer using cDNA microarrays. *Electrophoresis* **20**, 223–229.
- Köks, S., Planken, A., Luuk, H. & Vasar, E. (2002) Cat odour exposure increases the expression of wolframin gene in the amygdaloid area of rat. *Neurosci Lett* **322**, 116–120.
- Lamprecht, R., Farb, C.R. & LeDoux, J.E. (2002) Fear Memory Formation Involves p190 RhoGAP and ROCK Proteins through a GRB2-Mediated Complex. *Neuron* **36**, 727–738.
- LeDoux, J. (1998) Fear and the brain: where have we been, and where are we going? *Biol Psychiatry* **44**, 1229–1238.
- LeDoux, J.E. (2000) Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci* **23**, 155–184.
- Low, K., Crestani, F., Keist, R., Benke, D., Brunig, I., Benson, J.A., Fritschy, J.M., Rulicke, T., Bluethmann, H., Mohler, H. & Rudolph, V. (2000) Molecular and neuronal substrate for the selective attenuation of anxiety. *Science* **290**, 131–134.
- McGregor, I.S., Schrama, L., Ambermoon, P. & Dielenberg, R.A. (2002) Not all 'predator odours' are equal: cat odour but not 2,4,5 trimethylthiazoline (TMT); fox odour elicits specific defensive behaviours in rats. *Behav Brain Res* **129**, 1–16.
- Milanovic, S., Radulovic, J., Laban, O., Stiedl, O., Henn, F. & Spiess, J. (1998) Production of the Fos protein after contextual fear conditioning of C57BL/6N mice. *Brain Res* **784**, 37–47.
- O'Neill, M.J. & Sinclair, A.H. (1997) Isolation of rare transcripts by representational difference analysis. *Nucl Acids Res* **25**, 2681–2682.
- Panksepp, J. (1998) *Affective Neuroscience: the Foundations of Human and Animal Emotions*. Oxford University Press, New York.
- Pastorian, K., Hawel, L. & Byus, C.V. (2000) Optimization of cDNA representational difference analysis for the identification of differentially expressed mRNAs. *Anal Biochem* **283**, 89–98.
- Perrot-Sinal, T.S., Heale, V.R., Ossenkopp, K.P. & Kavaliers, M. (1996) Sexually dimorphic aspects of spontaneous activity in meadow voles (*Microtus pennsylvanicus*): effects of exposure to fox odor. *Behav Neurosci* **110**, 1126–1132.
- Pimenta, A.F., Zhukareva, V., Barbe, M.F., Reinoso, B.S., Grimley, C., Henzel, W., Fischer, I. & Levitt, P. (1995) The limbic system-associated membrane protein is an Ig superfamily member that mediates selective neuronal growth and axon targeting. *Neuron* **15**, 287–297.
- Rodgers, R.J. (1997) Animal models of 'anxiety': where next? *Behav Pharmacol* **8**, 477–496.
- Schweitzer, B., Suter, U. & Taylor, V. (2002) Neural membrane protein 35/Lifeguard is localized at postsynaptic sites and in dendrites. *Brain Res Mol Brain Res* **107**, 47–56.
- Shinozaki, K., Maruyama, K., Kume, H., Kuzume, H. & Obata, K. (1997) A novel brain gene, norbin, induced by treatment of tetraethylammonium in rat hippocampal slice and accompa-

- nied with neurite-outgrowth in neuro 2a cells. *Biochem Biophys Res Commun* **240**, 766–771.
- Swanson, L.W. (1998) *Brain Maps: Structure of the Rat Brain*, 2nd edn. Elsevier Science B. V., Amsterdam.
- Swift, R.G., Polymeropoulos, M.H., Torres, R. & Swift, M. (1998) Predisposition of Wolfram syndrome heterozygotes to psychiatric illness. *Mol Psychiatry* **3**, 86–91.
- Williams, G.W., Woollard, P.M. & Hingamp, P. (1998) *NIX: A Nucleotide Identification System at the HGMP-RC*. Computer Program. <http://www.hgmp.mrc.ac.uk/NIX/>.
- Zacco, A., Cooper, V., Chantler, P.D., Fisher-Hyland, S., Horton, H.L. & Levitt, P. (1990) Isolation, biochemical characterization and ultrastructural analysis of the limbic system-associated membrane protein (LAMP), a protein expressed by neurons comprising functional neural circuits. *J Neurosci* **10**, 73–90.
- Zirlinger, M., Kreiman, G. & Anderson, D.J. (2001) Amygdala-enriched genes identified by microarray technology are restricted to specific amygdaloid subnuclei. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 5270–5275.

Acknowledgments

This work was supported by research Grants GARFS4562 (Sulev Kõks, Principal Investigator) and GARFS5528 (Eero Vasar, Principal Investigator) and ETF4887 (Hendrik Luuk and Tarmo Areda) from the Estonian Science Foundation.