

**Roti aju organotüüpsete lõikude katsesüsteemi loomine aktiivsuse-
sõltuva transkriptsiooni ja valgusünteesi uurimiseks**

Bakalaureusetöö

Üliõpilane: Liisa Loel

Juhendaja: Indrek Koppel, PhD

Keemia ja biotehnoloogia instituut, vanemteadur

Õppekava: Rakenduskeemia ja geenitehnoloogia

Autorideklaratsioon

Kinnitan, et olen koostanud antud lõputöö iseseisvalt ning seda ei ole kellegi teise poolt varem kaitsmisele esitatud. Kõik töö koostamisel kasutatud teiste autorite tööd, olulised seisukohad, kirjandusallikatest ja mujalt pärinevad andmed on töös viidatud.

Autor: Liisa Loel

/allkirjastatud digitaalselt/

Töö vastab bakalaureusetööle esitatavatele nõuetele.

Juhendaja: Indrek Koppel

/allkirjastatud digitaalselt/

Töö on lubatud kaitsmisele.

Kaitsmiskomisjoni esimees: Indrek Koppel

/allkirjastatud digitaalselt/

**Establishment of an experimental system of rat brain organotypic
slices for the study of activity-dependent transcription and
protein synthesis**

Bachelor's Thesis

Student: Liisa Loel

Supervisor: Indrek Koppel, PhD

Department of Chemistry and Biotechnology, Senior Researcher

Curriculum: Applied Chemistry and Gene Technology

Sisukord

Annotatsioon.....	6
Abstract	7
Lühendid.....	8
Sissejuhatus.....	10
1. Kirjanduse ülevaade	11
1.1 Närvisüsteem ja närvikoe põhilised rakutüübid	11
1.1.1 Neuronid	11
1.1.1.1 Neuronite klassifikatsioonisüsteemid	12
1.1.2 Astrotsüüdid.....	13
1.1.2.1 Astrotsüütide heterogeensus.....	14
1.1.3 Oligodendrotsüüdid ja Schwanni rakud.....	14
1.1.4 Ependüümirakud.....	15
1.1.5 Mikroglia	15
1.2 Närvikoe rakutüüpide klassifitseerimise meetodid	16
1.3 Neuronaalsest aktiivsusest sõltuv geeniekspressioon.....	16
1.4 Kohalik valgusüntees närvikoe rakkudes	17
1.5 Rakutüübispetsiifiline proteoomika.....	18
1.6 Organotüüpsed lõigukultuurid.....	19
1.6.1 Organotüüpsete lõikude valmistamise meetodid.....	20
2. Töö eesmärk.....	22
3. Materjalid ja meetodid.....	23
3.1 Organotüüpsete lõigukultuuride valmistamine ja kasvatamine	23
3.2 Organotüüpsete lõikude töötlemine ja lüsaatide valmistamine.....	23
3.4 Lüsaatide valgukontsentratsiooni määramine bitsinhoniinhappe analüüsiga (BCA)	23
3.5 Konfokaalmikroskoopia.....	24
3.6 RNA eraldus ja cDNA süntees.....	24
3.7 Kvantitatiivne reaalaja polümeraasi ahelreaktsioon.....	24
3.8 <i>Western blot</i> analüüs	24
4. Tulemused ja arutelu.....	26
4.1 GFP reportervalgu konfokaalmikroskoopia roti ajukoore organotüüpsetel lõikudel	26
4.2 Aktiivsus-sõltuvate geenide regulatsioon KCl depolarisatsiooni toimetel	27
4.3 Valgusünteesi aktiivsuse määramine puromütsiinmärgistusega.....	30
Kokkuvõte.....	37

Tänuavaldused	38
Kirjanduse loetelu	39
Lisa 1. <i>BDNF</i> , <i>BDNF</i> ekson IV ja <i>c-Fos</i> amplifitseerimiseks kasutatud praimerid	46
Lisa 2. RT-qPCR Ct väärtused.....	47

Annotatsioon

Organotüüpsete lõigukultuuride katsesüsteemi kasutatakse neurobioloogia valdkonnas nii elektrofüsioloogia, farmakoloogia, neurogeneesi kui ka neurodegeneratsiooni uuringutes – see katsesüsteem on mitmekülgselt omadustega, tagades kontrolli rakuväliste tingimuste üle, võimaldades ligipääsetavuse töötlustele ning samas imiteerides koelist keskkonda oluliselt paremini võrreldes dissotsieeritud primaarkultuuridega.

Organotüüpsete lõigukultuuride valmistamiseks on välja töötatud erinevaid meetodeid ja protokolle, millest levinumateks tehnikateks on rull-katsuti meetod, selle edasiarendus poolläbilaskvate membraanide näol ja vabalt söötmes kultiveerimine. Käesoleva töö eesmärgiks oli leida sobilikud tingimused roti ajukoore ja hipokampuse organotüüpsete lõikude kultiveerimiseks, et uurida aktiivsus-sõltuvat transkriptsiooni ja määrata valgusünteesi aktiivsust.

Töö tulemused panustasid organotüüpsete lõikude süsteemi esmakordsesse rakendamisse molekulaarse neurobioloogia ja neuron-astrotsüüt interaktsioonide tööühmades TalTech keemia ja biotehnoloogia instituudis.

Abstract

Organotypic slice cultures serve as a valuable experimental system in neurobiology. They are utilized for a range of studies in electrophysiology, pharmacology, neurogenesis, and neurodegeneration. This is a versatile system, enabling precise control over extracellular conditions, facilitating treatment access, and significantly better mimicking *in vivo* environment compared to dissociated primary cultures.

Several methods and protocols have been developed to prepare organotypic slice cultures, with the roller-tube method, its enhanced version using semi-permeable membranes, and chambers submerged in medium being the most employed. The aim of this study was to find the optimal conditions for culturing organotypic slices of the rat cerebral cortex and hippocampus to study activity-dependent transcription and to determine the activity of protein synthesis.

The findings of this study contributed to the first-time application of the organotypic slice system in research groups of molecular neurobiology and neuron-astrocyte interactions at TalTech's Institute of Chemistry and Biotechnology.

Lühendid

ACSF – kunstlik tserebrospinaalvedelik (*artificial cerebrospinal fluid*)
AHA – asidohomoalaniin
APS – ammooniumpersulfaat
BCA – bitsinhoniinhappe analüüs (*bicinchoninic acid assay*)
BDNF – aju-päritolu neurotroofne tegur (*brain-derived neurotrophic factor*)
BONCAT – bio-ortogonaalne mittekanooniliste aminohapetega märgistamine (*bio-orthogonal noncanonical amino acid tagging*)
BP – basaalsed eellasrakud (*basal progenitors*)
cDNA – komplementaarne DNA
CREB – cAMP vastuselementi siduv valk (*cAMP-response element binding protein*)
CTAP – rakutüübispetsiifiline märgistamine kasutades aminohapete substraate (*cell-type-specific labeling using amino acid precursors*)
DIV – päev(a) *in vitro* (*days in vitro*)
DMSO – dimetüülsulfoksiid
DTT – ditiotreitool
EGFP – võimendatud roheline fluorestseeruv valk (*enhanced green fluorescent protein*)
FACS – läbivoolutsütomeetria (*fluorescence-activated cell sorting*)
GAPDH – glütseraldehyüd 3-fosfaatdehüdrogenaas
GFAP – gliia fibrillaarne happeline valk (*glial fibrillary acidic protein*)
GFP – roheline fluorestseeruv valk (*green fluorescent protein*)
HBSS – *Hank's Balanced Salt Solution*
HPLC – kõrgsurvevedelikkromatograafia (*high-performance liquid chromatography*)
HRP – määrarõika peroksüdaas (*horseradish peroxidase*)
IEG – ülivarajase vastuse geen (*immediate early gene*)
ISH – *in situ* hübriidatsioon
kDa – kilodalton
miRNA – mikroRNA
NSC – neuraalsed tüvirakud (*neural stem cells*)
NEC – neuroepiteeli rakud (*neuroepithelial cells*)
NOND – loomulikult esinev neuronaalne surm (*naturally occurring neuronal death*)
OPC – oligodendrotsütide eellasrakud (*oligodendrocyte precursor cells*)
OPP – O-propargüül puromütsiin
PAT – puromütsiini atsetüültransferaas
PBS – fosfaatpuhverdatud soolalahus (*phosphate-buffered saline*)
RGC – radiaalglia rakud (*radial glial cells*)
RTF – regulatoorne transkriptsioonifaktor (*regulatory transcription factor*)
RT-qPCR – kvantitatiivne reaalaaja polümeraasi ahelreaktsioon (*real-time quantitative polymerase chain reaction*)
scRNA-seq – ühe-raku RNA sekveneerimine (*single-cell RNA sequencing*)
SDS – naatriumdodetsüülsulfaat
SDS-PAGE – naatriumdodetsüülsulfaat-polüakrüülamiidgeelelektroforees (*sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)

SILAC – stabiilsete isotoopidega aminohapetega märgistamine rakukultuuris (*stable isotope labeling by amino acids in cell culture*)

SVZ – subventrikulaarne tsoon (*subventricular zone*)

TEMED – tetrametüületüleendiamiin

TRAP – transleeriva ribosoomi afiinsupuhastamine (*translating ribosome affinity purification*)

VZ – ventrikulaarne tsoon (*ventricular zone*)

Sissejuhatus

Molekulaarse neurobioloogia valdkonna üks olulisemaid ressursse on primaarsed *in vitro* rakukultuurid, mis võimaldavad uurida närvikoe rakkude elujõulisust ning nii füsioloogilisi, morfoloogilisi kui ka farmakoloogilisi omadusi. Primaarsete rakukultuuride puhul on aga tegemist isoleeritud süsteemiga, mis ei pruugi alati peegeldada koe või organi mikrokeskkonda. Alternatiivse *in vitro* roti ajukoore ja hipokampuse organotüüpsete lõikude katsesüsteemi puhul on säilinud originaalkoe sünaptiline organisatsioon ja struktuur ning samaaegselt ka eelistatumad *in vitro* rakukultuuri omadused. Organotüüpsete lõikude katsesüsteemis on lisaks neuronitele ja astrotsüütidele esindatud ka teised närvikoe rakutüübid ning see mudel on lähedasem *in vivo* keskkonnale.

Organotüüpsete lõikude valmistamiseks on mitmeid viise, millest tuntumateks meetoditeks on rullkatsuti tehnika ning lõikude kultiveerimine kas poolläbilaskvatel membraanidel või vabalt söötmes. Lõigukultuuride prepareerimiseks on loodud erinevaid protokolle, mille tingimusi on modifitseeritud vastavalt uurimiseesmärkide vajadustele. Ka molekulaarse neurobioloogia laboris oleks organotüüpsete lõikude katsesüsteem väärtuslikuks uurimismeetodiks. Sel põhjusel on käesoleva töö eesmärgiks otsida sobilikke tingimusi roti ajukoore ja hipokampuse organotüüpsete lõikude katsesüsteemi loomiseks, et uurida aktiivsus-sõltuvat transkriptsiooni ja valgusünteesi.

Töö teoreetilise osa esimeses pooles antakse ülevaade närvikoe rakutüüpidest, nende klassifitseerimissüsteemidest ja -meetoditest. Järgmiseks keskendutakse neuronaalsest aktiivsusest sõltuvale geeniekspressioonile, kirjeldatakse kohaliku valgusünteesi ning tutvustatakse ka rakutüübispetsiifilisi proteoomikameetodeid. Lisaks iseloomustatakse organotüüpsete lõigukultuuride omadusi ja pannakse rõhku nende valmistamise meetoditele. Töö eksperimentaalses osas kirjeldatakse organotüüpsete lõigukultuuride valmistamist ja nende töötlemist ning lõikude elumuse hindamiseks teostatud GFP reportervalgu konfokaalmikroskoopilist analüüsi. Aktiivsus-sõltuva transkriptsiooni uurimiseks viidi läbi RT-qPCR analüüs kahe neuronaalsest aktiivsusest sõltuva geeni mRNA-de suhteliste avaldumistasemete välja selgitamiseks. Valgusünteesi määramisel märgistati organotüüpseid lõike puromütsiiniga ning analüüsiti lüsaate *Western blot* meetodil.

Antud töö tulemustest selgus, et roti ajukoore ja hipokampuse organotüüpsetes lõikudes toimub kaaliumkloriidi töötamise mõjul neuronaalsest aktiivsusest sõltuvate geenide regulatsioon ning töötlus on tõhusaim, teostades seda teisel kultiveerimise päeval. Lisaks täheldati, et aktiivsus-sõltuva transkriptsiooni uurimiseks on sobivaim kasutada vastündinud rottide ajukoore lõike ning valgusünteesi uurimiseks on kuuepäevaste rottide hipokampuse lõigukultuurid parim variant. Puromütsiinmärgistuse abil tuvastati, et kultiveeritavates lõikudes leiab aset aktiivne valgusüntees kuni vähemalt seitse kultiveerimise päeva ning lõikudes omab funktsionaalsust puromütsiini inaktiveeriv PAT ensüüm – see viitab sellele, et antud eksperimentaalsüsteemis on vastava proteoomikameetodi kasutamine edukas.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1 Närvisüsteem ja närvikoe põhilised rakutüübid

Närvisüsteem on imetajate tegevust koordineeriv keskus, mille eesmärgiks on informatsiooni kodeerimine, töötlemine, salvestamine ja edastamine (Byrne et al., 2014; Maurer & Philbert, 2015). Üldine funktsionaalne eristus jagab närvisüsteemi sensoorseteks süsteemideks, mis hangivad keskkonnast informatsiooni ja vastutavad selle töötlemisprotsesside eest, ning mootorseteks süsteemideks, mis reageerivad informatsioonile tahtlikke ja tahtmatuid liigutusi tekitades. Traditsiooniline närvisüsteemi jaotus hõlmab kesknärvisüsteemi, mille moodustavad aju ning seljaaju, ja perifeerset närvisüsteemi, kuhu kuuluvad sensoorsed neuronid, somaatiline motoorne süsteem ning autonoomne motoorne süsteem. Perifeerse närvisüsteemi autonoomne motoorne haru koosneb sümpaatilisest, parasümpaatilisest ja enteeriilisest närvisüsteemist (Purves et al., 2008).

Närvisüsteemi omaduste ja käitumuslike eesmärkide selgitamiseks on vaja mõista närviahelaid moodustavaid rakutüüpe ja nende rolle. Cajali, Golgi ja teiste neuroteadlaste histoloogiliste uuringute põhjal jagati närvisüsteemi rakud kahte põhikategooriasse: närvirakud ehk neuronid ja neuroglia (Purves et al., 2008).

Neuronid on elektriliselt erutuvad rakud, mis vahendavad informatsiooni liikumist erinevate aju piirkondade ning kesk- ja perifeerse närvisüsteemi vahel kas keemiliste või elektriliste sünapside kaudu (Purves et al., 2008). Neuroneid iseloomustavad väga mitmekesised morfoloogilised ja funktsionaalsed omadused, mille põhjal on neid ka klassifitseeritud (Zeng & Sanes, 2017).

Gliiarakkude peamised rakutüübid on makroglia hulka kuuluvad astrotsüüdid, oligodendrotsüüdid, endopodüümirakud ja Schwanni rakud ning mikroglia (H. G. Lee et al., 2022). Kui algselt arvati, et gliiarakkude ainsaks ülesandeks on neuronite passiivne toetamine, siis nüüdseks on välja selgitatud, et glia omab olulisi rolle nii närvisüsteemi arengus kui ka täiskasvanud närvisüsteemi regulatsioonis (Zuchero & Barres, 2015).

1.1.1 Neuronid

Neuronid on spetsialiseerunud rakkudevahelisele suhtlusele elektrilise signaliseerimise teel – see avaldub nende keerukas morfoloogias dendriitide laialdase hargnemise näol, mis annab aimu sellest, kui palju moodustatakse sünaptilisi ühendusi (Purves et al., 2008).

Neuronite varaseimateks eellasrakkudeks on neuraalsed tüvirakud (NSC), täpsemalt neuroepiteeli rakud (NEC), mis neurogeneesile eelnevalt jagunevad sümmeetriliselt embrüonaalses neuraaltorus NEC rakkude hulga suurendamiseks ja närvisüsteemi laiendamiseks (Agirman et al., 2017; Jin, 2016; Kriegstein & Alvarez-Buylla, 2009). Nende rakkude edasisel asümmeetrilisel jagunemisel moodustuvad radiaalglia rakud (RGC), mille rakukehad paiknevad ajuvatsakeste ümbruses ventrikulaartsoonides (VZ) (Agirman et al., 2017; Kriegstein & Alvarez-Buylla, 2009). Radiaalglia rakkude asümmeetrilisel jagunemisel kortikaalse neurogeneesi alguses moodustuvad kas projektsioonineuronite eellased või uued RGC rakud (Agirman et al., 2017). RGC rakkudele on omased apikaalsed ja basaalsed jätked, mis neurogeneesi jätkudes pikenevad ja mida mööda

vastvalminud neuronid ventrikulaartsoonist välja migreeruvad (Campbell & Götz, 2002; Kriegstein & Alvarez-Buylla, 2009). Kortikaalse neurogeneesi hilisemates etappides moodustuvad RGC rakkudest kas neuronid või basaalsed eellasrakud (BP), mis omakorda jätkavad sümmeetrilist jagunemist subventrikulaarses tsoonis (SVZ), moodustades kas kaks identset BP rakku või neuronit (Agirman et al., 2017; Jin, 2016; Kriegstein & Alvarez-Buylla, 2009).

Neuronite struktuursete komponentide hulka kuuluvad jätked (dendriidid ja aksonid), mis on seotud sünaptilise ülekandega, ning rakukeha, kus asub neuroni tegevust reguleeriv rakutuum. Histoloogiliselt eristatakse aju ja seljaaju piirkondi, kus on akumulunud kas neuronite rakukehad või müeliniseerunud aksonitest koosnevad juhteteed, vastavalt hallaineks ja valgeaineks. Dendriitide hulga ja morfoloogia poolest varieeruvad neuronid suuresti, osadel rakkudel võivad dendriidid puududa ning teistel rakkudel võivad dendriidid jällegi moodustada keerukaid struktuure. Dendriitide hargnemise keerukusest sõltub see, kui palju teisi neuroneid seda rakku innerveerivad. Sünaptilisi kontakte dendriitidega ja ka muude rakutüüpidega loovad neuronite aksonid, erilised jätked, mille kaudu toimub aktsioonipotentsiaali tekkel elektrilise signaali kiire levimine aksoni presünaptilisse terminali (Purves et al., 2008).

Sünapseid on kahte tüüpi: keemilised ja elektrilised. Laialdasemalt levinud keemilise sünapsi puhul on neuroni membraan puhkeolekus polariseeritud, ent aktsioonipotentsiaali tekkel toimub raku pinge-seoseliste naatriumkanalite avanemine, naatriumioonide sissevool rakku ning aksoni piirkonna depolariseerumine (Purves et al., 2008). Aksoni presünaptilises terminalis asuvad neurotransmittereid sisaldavad sünaptilised vesiikulid, mis ühinevad neuroni depolariseerumise korral aksoni membraaniga selleks ette nähtud piirkonnas ja vabastavad oma sisu sünaptilisse pilusse (Dittman & Kreitzer, 2009; Takamori, 2009). Sihtmärkrakkude postsünaptilistel membraanidel asuvad erinevate neurotransmitterite retseptorid. Harvemini esineva elektrilise sünapsi pre- ja postsünaptilised terminalid on omavahel ühendatud aukliidustega, mille kaudu saavad ionid vabalt ühest rakust teise liikuda (Purves et al., 2008).

1.1.1.1 Neuronite klassifikatsioonisüsteemid

Neuronite klassifitseerimisega eri klassidesse ja alamtüüpidesse alustati esmalt neuronaalse anatoomia põhjal. Morfoloogiliste omaduste hulka kuuluvad neuronite rakukeha suurus ja asukoht, nii dendriitide kui ka aksonite kuju ning hargnemine ja dendriitide näsade hulk (Ecker et al., 2017). Rakkude peamised tüübid on järgnevad: unipolaarsed, pseudounipolaarsed, bipolaarsed või multipolaarsed neuronid (Purves et al., 2008). Kui bipolaarsetel neuronitel pikenevad rakukehast välja üks akson ja üks dendriit, siis pseudounipolaarsete neuronite puhul väljub rakukehast vaid üks jätke, mis jaguneb kaheks aksoniks (Gardner, 2010). Unipolaarsetel neuronitel on üks jätke, mille alumine osa moodustab aksoni, ent mille ülemisest osast võivad väljuda ka dendriitide jätked (Conn, 2016). Multipolaarsete neuronite soomast väljub mitmeid dendriitide jätked ja üks akson (Purves et al., 2008).

20. sajandil kaasati klassifitseerimisse ka funktsionaalsed ja molekulaarsed kriteeriumid. Informatsiooni liikumise suuna põhjal jaotatakse neuroneid sensorseteks ehk aferentseteks ja mootorseteks ehk eferentseteks neuroniteks – nende omavahelisi interaktsioone vahendavad interneuronid ehk vaheneuronid. Neurotransmitterite põhjal eristatakse inhibitoorseid ja eksitatoorseid neuroneid, vastavalt esile kutsutavale postsünaptilisele efektile (Purves et al., 2008).

Füsioloogilised omadused, nagu neuronite puhkepotentsiaal, neuraalse signaliseerimise kiirus ja ka teised biofüüsikalised omadused, on olulised faktorid neuronite klassifitseerimisel. Tänu võimalusele analüüsida sadu kuni kümneid tuhandeid neuroneid kiiresti ja efektiivselt ühe-raku RNA sekveneerimise (scRNA-seq) abil, saab neuroneid klassifitseerida ka nende transkriptoomide põhjal (Zeng & Sanes, 2017).

1.1.2 Astrotsüüdid

Astrotsüüdid pärinevad aju subventrikulaarse tsooni neuraalsetest eellasrakkudest, mis vahetuvad kortikaalse neurogeneesi lõppedes gliogeneesi diferentseerumisprogrammidele (Farhy-Tselnicker & Allen, 2018). Astrotsüüdid siirduvad mööda radiaalgliaat erinevatesse kesknärvisüsteemi osadesse ning läbivad terminaalset diferentseerumisetapi (Molofsky & Deneen, 2015). Kõpsete astrotsüütide põhiroll on kesknärvisüsteemi homöostaasi tagamine, sealhulgas sünaptoogeneesi ja sünaptilise ülekande moduleerimine, neurotransmitterite taaskasutamine, ioonse tasakaalu tagamine ja hematoentsefaalbarjääri säilitamine (H. G. Lee et al., 2022).

Neuronid, gliia ja veresooned on üksteisega tihedas ühenduses, moodustades aju füsioloogia jaoks olulisi neurovaskulaarseid üksuseid. Astrotsüüdid interakteeruvad veresoonkonnaga vaskulaarsete otsjätete kaudu ning mõjutavad verevoolu kiirust vastavalt neuronalse tegevuse vajadustele. Neuronite signaliseerimine võib astrotsüütides käivitada mitmeid signaaliradu, millest on paremini uuritud rakusiseses kaltsiumi vabanemisega seotud protsesse, sealhulgas kapillaaride läbilaskvuse reguleerimist vasodilataatorite ja -konstriktorite abil (Allen & Barres, 2009; Barres, 2008). Astrotsüüdid toodavad ja sekreteerivad ka mitmeid ekstratsellulaarse signaliseerimise faktoreid. Mõnedes astrotsüütides on iseloomulikud sekretoorsed vesiikulid ja lüsoosoomid, mis vabastavad peamiselt Ca-sõltuvate signaaliradade vahendusel ekstratsellulaarsesse ruumi keemilisi transmittereid, muuhulgas näiteks ATP molekule ja D-seriini. Astrotsüütide sekretoorsete organellide eksotsütoosi protsessid on aga neuronitega võrreldes teisiti reguleeritud ja sealhulgas ka palju aeglasemad (Barres, 2008; Verkhratsky et al., 2016). Närvisüsteemi varajase arengu käigus moodustub rohkem sünapseid, kui hiljem vaja on ning üheks astrotsüütidele iseloomulikuks funktsiooniks arenevas organismis on nende sünapside kärpimine fagotsütoosi teel (see roll on omane ka mikrogliale – vt pt 1.1.5). Sünapside ümberkujundamine sõltub neuronalsest aktiivsusest – nõrgema aktiivsusega sünaptid kärbitakse selektiivselt ning allesjäävaid sünapseid tugevdatakse veelgi (Zuchero & Barres, 2015).

Kesknärvisüsteemi patoloogiate, näiteks põletiku, neurodegeneratiivsete haiguste ja traumast põhjustatud vigastuste tagajärjel muutuvad astrotsüüdid reaktiivseteks. Toimub astrotsüütide funktsionaalne, morfoloogiline ja molekulaarne ümberkujundamine – seda protsessi nimetatakse astrogliosisiks või astrotsütoosiks. Patoloogilistes seisundites on gliia fibrillaarse happelise valguga (GFAP) immunovärvimise tulemusena täheldatud selle ülesregulatsiooni, mistõttu kasutatakse seda värvingut sagedasti astrotsüütide morfoloogiliste muutuste välja selgitamiseks (H. G. Lee et al., 2022; Preston et al., 2019; Verkhratsky & Nedergaard, 2018; Zhou et al., 2019). Lisaks GFAP valgule on füsioloogias ja patoloogias astrogliia markerina kasutusel valk S100B, mis on tähtis astrotsüüdi rakusiseses signaliseerimises ning võib toimida ka rakuvälise signaalikandjana. Patoloogiliste seisundite puhul muutub S100B ekspressioon ning selle tase vereseerumis ja tserebrospinaalses vedelikus tõuseb. Lisaks kahele eelnevale markerile kasutatakse laialdaselt ka aldehüüdi dehüdrogenaasi 1 perekonna liiget, ALDH1L1 valku (Matute-Blanch et al., 2017; Preston et al., 2019;

Verkhatsky & Nedergaard, 2018). Astrotsüüdi-spetsiifilisi fluorestseeruvaid markereid on võimalik selektiivselt ekspresseerida raku-spetsiifiliste promootorite abil. Fluorestseeruvate markeritena kasutatakse näiteks rohelist fluorestseeruvat valku (GFP) ja selle võimendatud homoloogi (EGFP), mida ekspresseeritakse fluorestseerivate sondidena inimese GFAP promootori abil või lentiviirustega astrotsüüte transdutseerides (Verkhatsky & Nedergaard, 2018).

1.1.2.1 Astrotsüütide heterogeensus

Astrotsüüdid jaotatakse morfoloogia, asukoha ja antigeense fenotüübi põhjal kahte põhiklassi (Barres, 2008). Protoplasmaatilised astrotsüüdid, mida leidub enim hallaines, osalevad imetaja aju sünaptilises arengus ja moodustavad perisünaptilisi astrotsüüdi jätkeid, mis ümbritsevad neuronite poolt moodustatavaid pre- ja postsünaptilisi struktuure (Zhou et al., 2019). Protoplasmaatilised astrotsüüdid moodustavad iseloomulikke mittekattuvaid territoriaalseid domeene (Verkhatsky & Nedergaard, 2018). Nende astrotsüütide täidetavad ülesanded – rakuväliste kaaliumiioonide puhverdamine, neurotransmitterite eemaldamine sünaptilisest pilust ja nende taaskasutamine – suurendavad sünaptilise ülekande täpsust (Zuchero & Barres, 2015). Fibroastrotsüüdid valgeaines moodustavad pikki jätkeid, mis asetsevad paralleelselt neuronite aksonitega. Valgeolluse astrotsüüdid on morfoloogiliselt mitmekesised ning nende jätked kattuvad suures osas, mis viitab protoplasmaatilistele astrotsüütidele iseloomuliku territoriaalsuse puudumisele fibroastrotsüütides (Verkhatsky & Nedergaard, 2018).

1.1.3 Oligodendrotsüüdid ja Schwanni rakud

Oligodendrotsüüdid ja Schwanni rakud võtavad aktiivselt osa närvisüsteemi funktsioneerimisest, moodustades neuroneid ümbritsevat isoleerivat müeliinkihti (Barres, 2008). Müeliniseerimine mõjutab neuronite struktuurseid ning elektrilisi omadusi müeliinkihitide vaheliste ionikanalite klasterdumist kontrollides – tänu sellele toimub müeliniseeritud aksonites kiire, saltatoorne elektriimpulsi levik (Barres, 2008; Lubetzki et al., 2020). Aksonite müeliniseerimine algab seljaajus ja perifeerses närvisüsteemis embrüonaalse arengu käigus ning jätkub sünnijärgselt ajus ja nägemisnärvis (Zuchero & Barres, 2015).

Lisaks isoleeriva müeliinkihi moodustamisele pakuvad oligodendrotsüüdid müeliniseeritud aksonitele troofilist tuge ja reguleerivad arengu käigus valgeaine angiogeneesi (Valério-Gomes et al., 2018). Arengu käigus ja vigastuste järgselt diferentseeruvad oligodendrotsüütide eellasrakud (OPC) oligodendrotsüütideks ning vabanevad idutsoonidest (Barres, 2008). Diferentseerumise käigus migreeruvad oligodendrotsüüdid jätkeid moodustades nendesse kesknärvisüsteemi piirkondadesse, kus asuvad müeliniseerimata aksonid, ent ei alusta koheselt müeliniseerimist (Zuchero & Barres, 2015). Nii OPC rakkude diferentseerumist kui ka müeliniseerimist mõjutab neuronite ja oligodendrotsüütide omavaheline sünaptiline signaliseerimine (Moura et al., 2022). Neuraalse aktiivsuse tulemusena võib muutuda müeliini struktuur ja esineda neuroplastilisus (Zuchero & Barres, 2015). Kontakteerumisel piisava arvu neuronite aksonitega hakkavad oligodendrotsüüdid lühikese ajavahemiku jooksul suurt hulka aksoneid korruga müeliniseerima (Barres, 2008). Müeliniseerimisel mässivad oligodendrotsüüdid oma jätke laienenud, aga kompaktset rakumembraani spiraalselt aksonite ümber – moodustunud müeliinkihid liituvad homofiilsete müeliinivalkude abil (Fields & Dutta, 2019). Müeliniseerimise hilisemates etappides

toetavad protsessi ka astrotsüüdid, nii läbi rakk-rakk signaalimise kui ka otseselt lipiididega varustamisega (Barres, 2008).

Schwanni rakkude eellasrakud migreeruvad spinaalganglionidest perifeersetesse närvidesse ning diferentseeruvad kas müeliniseerivateks või mitte-müeliniseerivateks Schwanni rakkudeks (Zuchero & Barres, 2015). Rakkude ränne ja diferentseerumine juhindub neuronite aksonite signaliseerimisest ning interaktsioonist ekstratsellulaarse maatriksiga (Mirsky et al., 2008; Muppurala et al., 2021). Schwanni rakud on väga plastilised, transdiferentseerudes perifeerse närvi vigastuse korral parandusprotsesse koordineerimaks ning fagotsüteerides ka kahjustunud müeliini või kaasates abiks makrofaage. Perifeerse närvisüsteemi arengu käigus moodustunud üleliigsete aksonite ja sünapside kõrvaldamine kuulub samuti Schwanni rakkude ülesannete hulka (Zuchero & Barres, 2015).

Schwanni rakud kasutavad perifeerse närvisüsteemi aksonite müeliniseerimiseks oligodendrotsüütidega samu molekulaarseid mehhanisme, ent mõningate erinevustega. Schwanni rakud ekspresseerivad oligodendrotsüütidest erinevaid müeliinikomponente ning nende moodustatav müeliinkiht on oluliselt paksem kui kesknärvisüsteemi müeliin (Zuchero & Barres, 2015). Üks Schwanni rakk mässib end tervikuna ümber aksoni ning moodustab ühe müeliini soonisevahe, samas kui üks oligodendrotsüüt võib müeliniseerida kuni 60 aksonit (Miller, 2002).

1.1.4 Ependüümirakud

Ependüümirakud on postmitoetilised rakud, mis põlvnevad ventrikulaartsooni radiaalglia rakkudest (Fame & Lehtinen, 2019). Tegemist on spetsialiseerunud gliiarakkudega, mis vooderdavad ajuvatsakeste sisemust ja seljaaju kanalit. Neil on oluline roll aju ja seljaaju homöostaasi säilitamises ning nende talitlushäiretel võivad olla tõsised tagajärjed närvisüsteemi normaalsele talitlusele (Verkhatsky & Butt, 2013).

Ependüümotsüüdid võtavad osa aju-seljaaju vedeliku tootmise regulatsioonist, ringlemisest ja imendumisest. Ependüümirakkude pinnal on iseloomulikud ripsmed, mis rütmiliselt pulseerides kindlustavad aju-seljaaju vedeliku ringlemise – selle regulaarne vool on oluline jääkainete eemaldamiseks ajust ja seljaajust. Piirkondades, kus endoteliaalset hematoentsefaalbarjääri ei esine, moodustavad ependüomogliia rakud tserebrospinaalvedeliku-aju barjääri – osaliselt tänu ependüümirakkude aktiivsele ionide transpordile läbi oma membraanide. Patoloogilistes seisundites, näiteks seljaaju vigastuste puhul, võib olla ependüümirakkude funktsioon häiritud, mis võib põhjustada aju-seljaaju vedeliku voolu häireid ning viia vedeliku kogunemiseni ajus või seljaajus (Kettenmann & Ransom, 2013).

1.1.5 Mikroglia

Mikroglia rakud on kesknärvisüsteemi mesodermaalse päritoluga immuunrakud, mis valmivad embrüogeneesi käigus. Loote rebukotis olevatest vereloome tüvirakkudest diferentseeruvad need esmalt primitiivseteks makrofaagideks, mis migreeruvad arenevasse kesknärvisüsteemi (Zuchero & Barres, 2015). Diferentseerunud mikroglia rakud asetsevad aju parenhüümis puhkeolekus ning vastuseks kohaliku mikrokeskkonna muutustele võtavad vajadusel omaks põletikulise fenotüübi (Hu et al., 2015; Mehl et al., 2022).

Mikroglia morfoloogilisteks tunnusoonteks on väike rakukeha ja mitmed peened jätked – see on morfoloogiline fenotüüp, mida omistatakse puhkeolekus mikrogliale. Mikroglia aktivatsioon toimub vastuseks närvisüsteemi muutustele ja vigastustele ning hõlmab intensiivseid muutuseid rakkude kujus, geeniekspressioonis ja funktsionaalses käitumises. Rakud muutuvad liikuvaks, pöördudes tagasi makrofaagi vormi ning migreeruvad vigastuse piirkonda, kus võivad aktiivselt fagotsüteerida kahjustunud koe rakke või mikroobe. Mikroglia rakud sekreteerivad immuunvastuseid vahendavaid ja põletikku soodustavaid faktoreid, näiteks tsütokiine ja kemoatraktante, mis kaasavad immuunrakke ja juhivad neid kesknärvisüsteemi. Mikroglia funktsioonide hulka kuuluvad samuti mõningate neurotroofsete faktorite süntees ja suhtlus kahjustatud neuronitega (Helmut et al., 2011). Mikroglia mängib olulist rolli ka närvisüsteemi arengus üleliigsete sünapside kõrvaldamisel. Sünapssid, mida on vaja elimineerida, märgistatakse mitmesuguste komplemendi valkudega, näiteks C3 ja C1q valkudega, ning mikroglia ülesandeks on need fagotsüteerida (Zuchero & Barres, 2015).

1.2 Närvikoe rakutüüpide klassifitseerimise meetodid

Rakutüüpide varasem jaotus põhines närvisüsteemi rakkude morfoloogilistel, neurokeemilistel ja elektrilistel omadustel. Morfoloogilise informatsiooni hankimiseks märgistatakse rakke geneetiliselt ning elektrilise aktiivsuse uurimiseks kasutatakse optilist pildistamist molekulaarsete pinge ja kaltsiumi indikaatoritega. Umbes alates 2015. aastast on aga kõige võimsamaks tehnikaks kujunenud ühe-raku RNA sekveneerimine, mida kasutatakse rakutüüpide mitmekesiste transkriptomide koostamiseks ja selle alusel rakkude klassifitseerimiseks (Jovic et al., 2022; Zeng & Sanes, 2017). Ühe-raku RNA sekveneerimise teostamiseks eraldatakse esmalt kudedest rakud ja isoleeritakse need kas manuaalselt mikropipetiga, mikrofluidika või läbivoolutsütomeetria (FACS) meetodite abil. Rakkude RNA ekstraheeritakse, konverteeritakse komplementaarseks DNA-ks (cDNA), mida amplifitseeritakse ja seejärel sekveneeritakse (Zeng & Sanes, 2017).

Ühe-raku RNA sekveneerimise meetodeid kasutades viidi hiljuti läbi hiire närvisüsteemi rakutüüpide põhjalik klassifitseerimine ja kirjeldamine, kus koostati 160 796 raku kvaliteetsed transkriptomid. Saadud andmete põhjal koostati põhjalik analüüs närvisüsteemi rakutüüpide molekulaarsetest omadustest ning moodustati vastav rakkude klassifikatsioonisüsteem (Zeisel et al., 2018). Ka Ameerikas loodud BRAIN projekti raames täiustati mitmed scRNA-seq meetodid, mida kasutades plaanitakse luua inimese ja hiire ajurakkude atlased (Ecker et al., 2017).

1.3 Neuronaalsest aktiivsusest sõltuv geeniekspressioon

Neuronaalsest aktiivsusest sõltuvat geeniekspressiooni eristatakse basaalsest geeniekspressioonist ja see on mehhanism, mis tagab postmitootilistele neuronitele kohanemisvõimelisuse ning dünaamilisuse – need on vajalikud omadused väliskeskkonna muutustele reageerimiseks (Yap & Greenberg, 2018). Eristatakse kahte tüüpi geeniekspressiooni mõjutavat neuronaalset aktiivsust – kas sensoorsed stiimulid või spontaanselt tekkinud, kindla mustri esinevad neuronaalse aktiivsuse lained (Pumo et al., 2022).

Aktiivsus-sõltuvad ülivarajase vastusega geenid (IEG) aktiveerivad järgmiseid transkriptsioonilisi ning epigeneetilisi radu, mille eesmärk on reguleerida sünaptoogeneesi, neuronaalset plastilisust ja palju muid närvisüsteemi arenguks ja funktsioneerimiseks kriitilisi protsesse (Lu, 2003; Pumo et al.,

2022; Yap & Greenberg, 2018). IEG-sid jaotatakse kahte klassi: reguleerivaid transkriptsioonifaktoreid (RTF) kodeerivateks geenideks ja defineerituma funktsiooniga efektorvalke kodeerivateks IEG-deks (Guzowski et al., 2001). IEG-de kiire induksioon viitab nende sõltuvusele olemasolevatest transkriptsioonifaktoritest; näiteks *Fos* geeni induksioon toimub kaltsiumi signaaliseerimise kaudu, mida vahendab cAMP vastuselementi siduv valk/transkriptsioonifaktor CREB (Greenberg et al., 1986). Intratsellulaarne kaltsiumi signaalimine on esmaseks membraani depolarisatsiooni ja sünaptilist aktiveerumist molekulaarseks signaaliks muundavaks mehhanismiks, mis mõjutab rakutuuma jõudes geenide transkriptsiooni ning modifitseerib mRNA molekulide transporti, arvukust ja translatsiooni (P. R. Lee & Fields, 2021; Yap & Greenberg, 2018). Ka BDNF neurotroofne tegur on neuronaalsest aktiivsusest sõltuv geen ning ekspresseerub samuti kaltsium-vahendatud signaalimise tulemusena (Hughes et al., 1993; Timmusk et al., 1993). *BDNF* geeni ekspressiooni kontrollivad mitmed aktiivsus-sõltuvad ja koe-spetsiifilised promootorid; roti *BDNF* geen on tuvastatud üheksa erinevat promootorit, mis kontrollivad 5' mittekodeerivaid eksoneid (I-VIII) sisaldavate ja ühise 3' kodeeriva IX eksoniga splaissitud *BDNF* mRNA-de transkriptsiooni (Aid et al., 2007; Timmusk et al., 1993, 1995). Inimese *BDNF* geen sisaldab üheksat promootorit ning 11 eksonit (I-IX, Vh ja VIIIh) (Q. R. Liu et al., 2005; Pruunsild et al., 2007).

1.4 Kohalik valgusüntees närvikoe rakkudes

Sünapside terviklikuks arenguks, sünaptogenesiks ning plastilisuse ja elumuse tagamiseks on mRNA lokaliseerimine ja kohalik valgusüntees vajalikud protsessid. Nende eesmärgiks on kindlustada neuronite dendriitide ja aksonite uute valkudega varustus. Ka astrotsüütides on täheldatud nii transkriptsioonilist kui ka translatsioonilist reaktsiooni neuronaalsele stimulatsioonile (Holt et al., 2019; Sapkota et al., 2022).

Neuronite distaalsed ehk rakukehas kauged piirkonnad, sealhulgas sünapsid, on võimelised oma proteoomi iseseisvalt reguleerima lokaalse valgusünteesi teel. Seetõttu ei pruugi nende piirkondade geeniekspressiooni regulatsioon rakukehas toimuvate protsesside poolt (sh transkriptsioon rakutuumas) olla alati peamine mehhanism. Hipokampuse püramidaalneuronite transkriptomuuringutega on dendriitides ja aksonites tuvastatud ligikaudu 2500 lokaalset mRNA molekuli. Neuronid võivad mõjutada ka naaberraku proteoomi, transportides mRNA ja miRNA molekule ühest rakust teise rakuvälise vesiikulite abil (Holt et al., 2019).

Kohalik valgusüntees neuronites on väga spetsiifiline, seda eriti väliste signaalidega reguleeritud translatsiooni puhul – signaalmolekulid aktiveerivad kindlaid retseptoreid, millest mõned võivad olla otseselt seotud ribosoomidega, ning üks signaal võib reguleerida kuni sadat erinevat valku (Holt et al., 2019; Kim & Jung, 2015). On täheldatud, et mingi kindla lokaliseeritud mRNA molekuli hulga vähendamisel on sünapsi välja kujunemine takistatud ehk antud mRNA sünaptiline translatsioon on vajalik sünapsi moodustumiseks. Lokaalne translatsioon on oluline muuhulgas ka võrkkesta ganglionirakkude aksonite arengu käigus juhtmolekulidele reageerimiseks – näiteks kindlasse suunda pööramiseks (Holt et al., 2019). Vastuseks neuronaalse aktiivsuse modulaatoritele, näiteks BDNF-ile või membraani depolarisatsioonile kaaliumkloriidi abil, toimub ka astrotsüütides kiire translatsiooniline aktivatsioon nii rakukehas kui ka jätketes. Selline aktivatsioon toimub vaid neuronite juuresolekul, ent mitte puhastatud astrotsüütide kultuuris (Sapkota et al., 2022)

Valgusünteesi lokalisatsiooni tuvastamiseks kasutatakse subtsellulaarsete komponentide füüsilist puhastamist, metaboolset märgistamist ja fluorestseeruvatel valkudel põhinevaid valgusünteesi reportereid. Laialdaselt on kasutus leidnud antibiootikum puromütsiin, mis võimaldab märgistada translatsiooni käigus tekkivaid peptiidahelaid ning mida saab visualiseerida antikehadega (Aviner, 2020; Holt et al., 2019).

1.5 Rakutüübispetsiifiline proteoomika

Proteoomiuuringute teostamisel on sobilike proteoomika meetodite puudumise tõttu varasemalt levinud praktikaks olnud valkude vastavate mRNA-de analüüs, eeldusel, et transkriptide ja valkude hulgas on proportsionaalsed (Vogel & Marcotte, 2012). Rakutüübispetsiifilised proteoomika meetodid oleksid aga väärtuslikumad, sest tihtipeale valkude ja mRNA-de tasemed siiski ei kattu (Maier et al., 2009). Viimase aja arengud valkude märgistamise, massispektromeetria ja andmeanalüüsi tehnoloogiates võimaldavad teostada ka rakutüübispetsiifilisi proteoomiuuringuid (Stone et al., 2017).

Esimesed kasutusele võetud proteoomika meetodid eeldavad enne analüüsietappi huvipakkuvate rakkude eraldamist ja puhastamist. Rakke saab sorteerida kas ekspresseerides rakuspetsiifilise promotori alt mingit kindlat transgeeni või värvides markerite epitoope antikehadega. Rakutüübispetsiifilisi uuringuid võimaldavad teostada mitmed nii translatoomika (ehk ribosoomidega seotud mRNA-de) kui ka proteoomika meetodid (Stone et al., 2017). Translatoomika analüüsimine on transkriptide ja valkude hulga korrelatsioonist paremini aimu andnud, kui transkriptoomika uuringud (Ingolia, 2016). Transleeriva ribosoomi afiinsuspuhastamise (TRAP) meetodit ja ribosoomide profileerimist kasutades on loodud väga spetsiifilisi translatoome (Gonzalez et al., 2014). TRAP meetodi puhul märgistatakse ribosoomid EGFP epitopidega – märgistatud ribosoomid ja nendega seotud transkriptid eraldatakse afiinsuspuhastamise teel ning transleeritud mRNA-d tuvastatakse mikrokiibi tehnoloogiat kasutades *in situ* (Heiman et al., 2008). Ribosoomide profileerimise käigus saadakse teada ribosoomidega seotud mRNA hulk ja ribosoomide positsioon vastavatel ahelatel, mis võimaldab määrata translatsiooni toimumist ja tuvastada mittekanoonilisi algussaite (Ingolia, 2014).

Alternatiivne RiboTag meetod võimaldab märgistada ribosoomi hemaglutiniini epitoobiga Cre valku ekspresseerivates rakkudes. Selleks on loodud hiirte liin, kes kannavad hemaglutiniini epitoobiga märgistatud ribosomaalse valgu alleeli. Seda on võimalik spetsiifilistes rakutüüpides aktiveerida, paaritades neid hiiri Cre rekombinaasi ekspresseerivate hiirtega. Epitopidega märgistatud polüribosoomide on võimalik rakkudest eraldada immunosadestamise teel ning mRNA transkripte saab isoleerida ja analüüsida (Koppel & Fainzilber, 2018; Sanz et al., 2009).

Metaboolse märgistamise meetoditega on võimalik tuvastada sekreteeritud valke, kasutades selleks kas aminohapete isotopoloogide, mittekanoonilisi aminohappeid või valgusünteesi inhibiitoreid. Stabiilsete isotoopidega aminohapetega märgistamine rakukultuuris (SILAC) on levinud proteoomika tehnika, mida modifitseerides on saadud rakutüübispetsiifiline märgistamismeetod CTAP ehk rakutüübispetsiifiline märgistamine kasutades aminohapete substraate. Selle meetodi puhul ekspresseeritakse rakkudes transgeenselt biosünteesilisi ensüüme, mis katalüüsivad lüsiini isotoopmärgistatud prekursorite sünteesi lüsiiniks. Lüsiin inkorporeeritakse

sünteesitavatesse valkudesse ning rakutüüp-spetsiifiliselt isotoopmärgistatud valke tuvastatakse kvantitatiivse mass-spektromeetrilise analüüsi teel (Gauthier et al., 2013; Stone et al., 2017).

Bio-ortogonaalne mittekanooniliste aminohapetega märgistamismeetod (BONCAT) kasutab sünteesitavate valkude märgistamiseks väikeste bio-ortogonaalsete funktsionaalrühmadega mittekanoonilisi aminohappeid (Dieterich et al., 2006). Enamasti kasutatakse sünteetilisi, kas alküüni või asiidiga funktsionaliseeritud metioniini asendusaminohappeid, tüüpiliselt asidohomoalaniini (AHA). Neid aminohappeid on võimalik *click* keemia meetodil konjugeerida kas fluorofooridega või biotiiniga (afiinsusmärgisena) ning eraldada ülejäänud valkude hulgast (Koppel & Fainzilber, 2018). BONCAT meetodi rakutüübispetsiifiliseks muutmiseks kasutatakse mutantse metionüül-tRNA süntetaasi rakutüübispetsiifilist ekspressiooni – see mutantne ensüüm lisab endogeensele tRNA-le asidonorleutsiini, mida tavalised rakud ei ole võimelised kasutama (Ngo et al., 2009).

Puromütsiinmärgistamise korral siseneb aminoatsüleeritud tRNA-le sarnanev puromütsiin ribosoomi A-saiti, võtab üle kasvava peptiidahela ja lahkub ribosoomilt. Puromütsiini fluorofooridega konjugeerides või puromütsiini vastaseid antikehasid kasutades on võimalik valgusünteesi visualiseerida (Koppel & Fainzilber, 2018). Laialdaselt on kasutatud leidnud puromütsiini derivaat O-propargüül puromütsiin (OPP), mis inhibeerib valgusünteesi sarnaselt puromütsiinile ning moodustab polüpeptiid-OPP konjugaate (J. Liu et al., 2012). OPP rakutüübispetsiifiline analoog sisaldab inaktiveerivat, α -aminorühma blokeerivat gruppi, mida on võimaline eemaldama ja seeläbi OPP analoogi funktsionaalseks muutma ortogonaalne ensüüm, ekspresseerituna kindlates rakupopulatsioonides (Barrett et al., 2016).

1.6 Organotüüpsed lõigukultuurid

Primaarsete *in vitro* rakukultuuride kasutamine on neuroteadlaste hulgas üks olulisemaid meetodeid suure hulga homogeensete närvisüsteemi rakkude uurimiseks isoleeritud keskkonnas (Humpel, 2015). Primaarsed rakukultuurid võimaldavad uurida rakkude elujõulisust, morfoloogiat, füsioloogiat ja rakkude farmakoloogilisi omadusi (Gähwiler et al., 1997). Lisaks vähendab *in vitro* rakukultuuride kasutamine *in vivo* loomkatsete teostamise vajadust suurel määral (Humpel, 2015). Sellegipoolest on primaarrakkude näol tegemist isoleeritud süsteemiga, mis ei ole võrdväärne koe või organi keeruka ehitusega ja ei peegelda vastavat mikrokeskkonda (Daviaud et al., 2013).

Seetõttu on üha enam püütud täiustada erinevatest aju piirkondadest valmistatavaid lõigukultuure, kus on säilinud originaalkoe sünaptilise organisatsiooni ja struktuuri aspektid ning mis võimaldavad uurida närvikoe keerukaid võrgustikke (Humpel, 2015). Valmistatakse nii akuutseid kui ka organotüüpsid lõigukultuure, millest esimene variant on kasutuses lühiajalisteks uuringuteks (Bakmand et al., 2015). Organotüüpsid kultuure kasutatakse aga peamiselt eksperimentideks, mille eelduseks on prepareeritava kultuuri pikemaajaline kultiveerimine, alates kahepäevastest kuni kahekuiste lõigukultuurideni (Gähwiler et al., 1997; Humpel, 2015). Organotüüpsete lõigukultuuride katsesüsteemi kasutatakse nii elektrofüsioloogia, farmakoloogia, neurogeneesi kui ka neurodegeneratsiooni uuringutes – see mudel on mitmekülgsete omadustega, tagades kontrolli rakuväliste tingimuste üle, võimaldades ligipääsetavuse töötlustele ning samas imiteerides *in vivo* keskkonda oluliselt paremini võrreldes *in vitro* primaarkultuuridega (Bakmand et al., 2015; Daviaud et al., 2013; Lossi et al., 2009; Rambani et al., 2009; Sundstrom et al., 2005).

Organotüüpsete koelõikude katsesüsteemil on siiski omad puudused, näiteks aksotoomia põhjustatud neuronite surm – eriti embrüonaalse või vastsündinu närvikoe puhul, mille arengus on oluline roll innerveeritavates kudedes toodetavatel neurotroofsetel faktoritel (Humpel, 2015; Lossi et al., 2009). Seda probleemi püütakse lahendada neuroni-spetsiifiliste kasvufaktorite lisamisega, mille kombinatsiooni ja koguseid määratakse eksperimentaalselt. Seevastu on aksotoomitud koes hea uurida reaktiivset sünaptogeneesi ja neuronite jätkete reorganisatsiooni (Humpel, 2015).

1.6.1 Organotüüpsete lõikude valmistamise meetodid

Organotüüpsete lõigukultuuride kasutamine sai alguse 1950ndatel, kui esmakordselt kultiveeriti kana embrüo organeid, sealhulgas süda ja kopse, ning 1960ndatel roti hüpofüüsi fragmente (Daviaud et al., 2013). Hetkel valmistatakse neurobioloogia uuringuteks lõigukultuure enamasti vastsündinud, harvemini sünnieelsete näriliste ajuosadest. Kuigi embrüonaalsete staadiumite puhul on rakkude elumus kõrgeim, siis organotüüpne organisatsioon on selles eas siiski puudulik (Gähwiler et al., 1997). Vastsündinud loomade aju tsütoarhitektuur on enamikes ajupiirkondades juba välja kujunenud, aju on embrüonaalsete staadiumitega võrreldes suurem ja kergemini dissekteeritav ning närvirakud elavad eksplantatsiooni paremini üle kui täiskasvanud looma puhul (Gähwiler et al., 1997; Lossi et al., 2009).

Vastsündinu koe kultiveerimisel on suurimaks väljakutseks aga neuronite elujõulisuse tagamine; astrotsüütide ja endoteelirakkude puhul ei ole olukord nii kriitiline (Humpel, 2015; Lossi et al., 2009). Neuronite elumust mõjutavad mitmed faktorid, muuhulgas prepareerimise kiirus, steriilsus, doonorloomade tervis ja vanus ning söötme koostis (Humpel, 2015). Kultiveerimisel vastsündinud loomade kude, tuleb arvestada loomulikult esineva neuronaalse surma (NOND) perioodiga, mis saavutab tipptaseme kahel esimesel sünnijärgsel nädalal – see on üks peamisi põhjuseid, miks vastsündinu koe neuronaalne diferentseerumine on gliiarakkude arenguga võrreldes tundlikum (Lossi et al., 2009).

Koelõikude valmistamine toimub protokoll järgi, kus esmalt looma aju dissekteeritakse ning valmistatakse 100-400 µm paksused lõigud kas vibratoomi või koelõikuriga (Gähwiler et al., 1997). Organotüüpsete lõigukultuuride kultiveerimiseks on mitmeid meetodeid, millest tuntumad on rull-katsuti tehnika ning lõikude kultiveerimine kas poolläbilaskvatel membraanidel või vabalt söötmes (Gähwiler, 1981; Khalilov et al., 1997; Stoppini et al., 1991).

Rull-katsuti tehnika puhul asetatakse üksikud koelõigud klaasist katteklasaidele plasmatilkadesse, millele lisatakse trombiini, et plasma koaguleeruks ning koelõik kinnituks klaasile (Humpel, 2015). Kultuuridega katteklasad asetatakse kultiveerimiskatsutitesse, mis sisaldavad väikest kogust söödet ning katsutite aeglase pöörlemisega tagatakse ühtlane söötme ja hapnikuga varustus (Gähwiler, 1981). Selle meetodi negatiivne aspekt on see, et mõned koelõigud võivad liikumise mõjul hukkuda, laguneda või klaasidelt lahti tulla (Gähwiler et al., 1997). Koelõike on võimalik kultiveerida ka spetsiaalsetes kunstliku tserebrospinaalvedelikuga (ACSF) täidetud kambrites, kus lõigud asetatakse nailonvõrgule ning varustatakse peenete torukeste kaudu hapnikuga küllastatud ACSF vedelikuga (Khalilov et al., 1997).

Poolläbilaskvate membraanide kasutamisel asetatakse poorsed membraanid harilikele rakukultuuri tassidele ning membraanidele koelõigud (Stoppini et al., 1991). Söödet lisatakse membraanide alla

nii, et lõigud oleksid õhukese söötmekihiga kaetud (Humpel, 2015). See on modifikatsioon rullkatsuti tehnikast, kuid ilma kasvatusanuma liigutamiseta – membraanide kasutamisel puudub oht lõikude kaotamiseks ning see meetod võimaldab korraga kultiveerida nii koelõike membraani pinnal kui ka rakke membraani all söötmes (Lossi et al., 2009; Stoppini et al., 1991). Ko-kultiveerides koelõike endoteelirakkudega toimub läbi membraani pooride ainete difusioon rakkude ja lõikude vahel, moodustades nii omamoodi hematoentsefaalbarjääri (Duport et al., 1998). Paari päeva möödudes kinnituvad koelõigud membraanide külge, muutuvad lamedamaks ja värvuselt läbipaistvamaks – lõigud on täielikult membraani külge kinnitunud pärast kahte nädalat kultiveerimist *in vitro*. Koelõikude paksus on makroskoopiliseks elujõulisuse indikaatoriks – kui lamemist ei ole mitme päeva möödudes toimunud, siis viitab see rakkude surmale (Humpel, 2015).

2. Töö eesmärk

Igapäevaselt kasutatakse neurobioloogia laboris primaarseid *in vitro* rakukultuure, mis on oluline meetod närvisüsteemi rakkude uurimiseks isoleeritud keskkonnas, ent mis ei ole võrdväärne koe või organi rakutüüpide keerukusega. Aju organotüüpsete lõikude katsesüsteem on lähedasem *in vivo* keskkonnale ning sel on mitmeid eeliseid primaarsete rakukultuuride ees.

Sellest tulenevalt otsitakse antud töös sobilikke tingimusi roti ajukoore ja hipokampuse organotüüpsete lõikude katsesüsteemi loomiseks, et uurida aktiivsus-sõltuvat transkriptsiooni ja valgusünteesi.

Töö eesmärkideks on:

1. valmistada GFP transgeeni ekspresseerivaid roti ajukoore organotüüpseid lõike ning hinnata lõikude elumust GFP reportervalgu konfokaalmikroskoopilisel analüüsil;
2. kirjeldada aktiivsus-sõltuvate geenide regulatsiooni kaaliumkloriidi depolarisatsiooni toimel organotüüpsetes lõikudes, võrreldes vastavate geenide mRNA-de suhtelisi avaldumistasemeid sünnieelsete, vastsündinud ja täiskasvanud rottide ajukoore ning hipokampuse lõigukultuurides;
3. määrata valgusünteesi aktiivsus sünnieelsete, vastsündinud ja täiskasvanud rottide ajukoore ning hipokampuse organotüüpsetes lõikudes puromütsiinmärgistusega.

3. Materjalid ja meetodid

3.1 Organotüüpsete lõigukultuuride valmistamine ja kasvatamine

Tiined Sprague Dawley rotid eutaniseeriti süsinikdioksiidiga, 21 päeva vanused embrüod koguti jääkülma 1x fosfaatpuhverdatud soolalahusesse (PBS) ning täiskasvanud roti pea säilitati jääl. Lõigukultuuride valmistamiseks dissekteeriti nii sünnieelsete, vastsündinud kui ka täiskasvanud rottide aju hipokampused ning ajukoor, millest tehti koelõikuri abil 400 µm koronaalsed frontaalkorteksi ja hipokampuse koelõigud. Koelõike kasvatati 12-kaevulisel või 6-kaevulisel plaadil kas vabalt söötmes või poorsetel poolläbilaskvatel membraanidel (polüeteentereftalaat, poori suurus 0,4 µm, Greiner 657640 ja 665640) – ühel juhul primaarsete neuronite täissöötmes, mis sisaldas Neurobasal-A söödet (NBA, Gibco), millele oli lisatud 2% lisandit B-27 (Gibco), 1 mM L-glutamiini (Gibco) ning 1x Primocin antibiootikumide segu (Invivogen); teisel juhul spetsiaalses koelõikude söötmes, mis sisaldas 50% MEM söödet (Gibco), 25% hobuse seerumit (Gibco), 25% HBSS puhvrit (*Hank's Balanced Salt Solution*) ning millele oli lisatud 36 mM glükoosi ja 25 mM HEPES (Sigma) puhvrit, pH tiitriti 6M HCl abil väärtuseni 7,2. Koelõigud kas jäeti viirusega transdutseerimata või transdutseeriti samal päeval AAV1/2-[Syn]-GFP, AAV1/2-[GFAP]-GFP, AAV1/2-[Syn]-mCherry, AAV1/2-[Syn]-DREADD-mCherry või AAV1/2-[Syn]-PAT-mCherry viirustega ([Syn] tähistab neuron-spetsiifilist inimese sünapsiini promootorit ja [GFAP] astrotsüüdi-spetsiifilist inimese gliia fibrillaarse happelise valgu promootorit; DREADD on kemogeneetiline retseptor, mida sisaldav viirus on võrdväärne AAV1/2-[Syn]-mCherry kontrollviirusega). AAV viirusvektorid olid valmistatud Indrek Koppeli, Florencia Cabrera-Cabrera ja Helena Tulli poolt. Indrek Koppel transdutseeris töös kasutatud lõigud AAV-dega.

3.2 Organotüüpsete lõikude töötlemine ja lüsaatide valmistamine

RT-qPCR jaoks valmistatud koelõike töödeldi kas samal päeval, kahe või seitsme päeva pärast neuroneid depolariseeriva 25 mM kaaliumkloriidiga kaks tundi rakukultuuri inkubaatoris 37°C ja 5% CO₂ juures. Töötlemata lõikude proove kasutati kontrollidena.

Western blot analüüsi jaoks valmistatud koelõike märgistati kaks tundi 5 µM puromütsiiniga rakukultuuri inkubaatoris 37°C ja 5% CO₂ juures. Koelõigud homogeniseeriti 250 või 500 µl-s RIPA puhvris, mis sisaldas 150 mM NaCl, 1% Nonidet 40, 0,5% Na-deoksükolaati, 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) ning kuhu oli lisatud 0,1% SDS-i ja 1x proteaaside inhibiitorite segu (Complete, EDTA-free, Roche). Rakulüsaatide ettevalmistamiseks *Western blot* analüüsiks lisati homogeniseeritud proovidele kas 2x või 5x Laemmli puhvrit – 2x Laemmli puhver sisaldas 4% naatriumdodetsüülsulfaati (SDS), 20% glütserooli ja 120 mM Tris-HCl (pH 6,8), kuhu oli lisatud 100 mM ditiotreitooli (DTT).

3.4 Lüsaatide valgukontsentratsiooni määramine bitsinhoniinhappe analüüsiga (BCA)

Lüsaatide totaalse valgukontsentratsiooni määramiseks viidi läbi kolorimeetriline bitsinhoniinhappe analüüs (BCA) Pierce™ BCA Protein Assay Kit-iga (Thermo Scientific). Selleks pipeteeriti plaadi kaevudesse (96-kaevu formaadis) lüsaate, veise seerumi albumiini standardlahuseid (Pierce™ Bovine Serum Albumin Standard, Thermo Scientific) kontsentratsioonides 2, 1, 0,5 ja 0,25 mg/ml ning RIPA puhvrit kahes korduses. Lisati BCA töölahus, mis sisaldas BCA reagente A ja B (suhe: 50:1) ning inkubeeriti 30 minutit inkubaatoris 37°C juures.

Mikroplaadilugejaga Tecan GENios Microplate Reader mõõdeti lahuste optilise tiheduse väärtused ning tulemuste põhjal koostati kalibratsioonigraafik valgusisalduste leidmiseks.

3.5 Konfokaalmikroskoopia

AAV1/2-[Syn]-GFP ning AAV1/2-[GFAP]-GFP viirustega transdutseeritud roti ajukoore lõike analüüsiti 7. *in vitro* päeval (DIV) konfokaalmikroskoopiaga. AAV1/2-[GFAP]-GFP viirusega transdutseeritud lõikude puhul kasutati rakutuumade visualiseerimiseks Hoechst 33342 fluorestseeruvat värvi (Thermo Scientific), millega inkubeeriti 15 minutit rakukultuuri inkubaatoris 37°C ja 5% CO₂ juures. Koelõigud asetati mikroskopeerimiseks alus- ja katteklaaside vahele HBSS lahusesse ning mikroskoobiga Zeiss LSM 900 tehti 5 µm sammuga järjestikused pildid, kasutades 10x suurendusega objektiivi. Visualiseerimiseks tehti Z-projektsioon üksikutest tasanditest Fiji programmiga „max intensity“ režiimis.

3.6 RNA eraldus ja cDNA süntees

RNA ekstraheeriti kas 1 ml-s TRIzol reagentis (Invitrogen) või 500 µl-s RLT puhvris (QIAGEN), kuhu oli lisatud 40 mM DTT ning puhastati RNEasy Mini kolonnidega (QIAGEN). Sünteesiti mRNA-le komplementaarne DNA (cDNA), milleks valmistati sünteesisegu 1 µg RNA-st, kasutades oligo(dT)₂₀ (Microsynth) ja juhuslike heksameeride (Microsynth) praimerite segu (suhe: 1:1), ensüümiga SuperScript IV (Invitrogen).

3.7 Kvantitatiivne reaalaaja polümeraasi ahelreaktsioon

Roti ajukoore ja hipokampuse organotüüpsetest lõikudest ekstraheeritud mRNA-le komplementaarseid cDNA proove lahjendati neli korda tüüp I veega ning analüüsiti RT-qPCR meetodil. Selleks valmistati reaktsioonisegu, mis sisaldas 5x segu (HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus, Solis Biodyne), päri- ja vastassuunaliste praimerite segu (vt lisa 1) ning tüüp I vett. Reaktsioonisegu pipeteeriti PCR plaadi kaevudesse (96-kaevu formaadis) ning lisati matriits-DNA.

RT-qPCR analüüs teostati Roche LightCycler® 480 II masinas ning tuvastati neuronaalsest aktiivsusest sõltuvate geenide suhtelised avaldumistasemed. Saadud tulemused normaliseeriti koduhoidjageeni *GAPDH* suhtes.

3.8 Western blot analüüs

Valkude eraldamine toimus naatriumdodetsüülsulfaat-polüakrüülamiidgeelelektroforees (SDS-PAGE) meetodil, milleks kasutati geeli, mille 6% kontsentreeriv osa sisaldas: 6% akrüülamiid/bisakrüülamiidi (suhe: 29:1, AppliChem), 0,1% ammoonimpersulfaati (APS), 0,1% tetrametüületüleendiamiini (TEMED) ja Tris-SDS puhvrit (pH 6,8). Geeli 10% lahutav osa sisaldas: 10% akrüülamiid/bisakrüülamiidi (suhe: 29:1, AppliChem), 0,1% APS-i, 0,05% TEMED-it ja Tris-SDS puhvrit (pH 8,8). Enne geelelektroforeesi kuumutati valguproove 95°C juures viis minutit. Geeli voolutati 10 kuni 15 minutit 100 V juures ning siis 150 V juures 1x jooksupuhvris (25 mM Tris-HCl, 0,1% SDS, 250 mM glütsiin). Valgumarkerina kasutati kas PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) või PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) markerit.

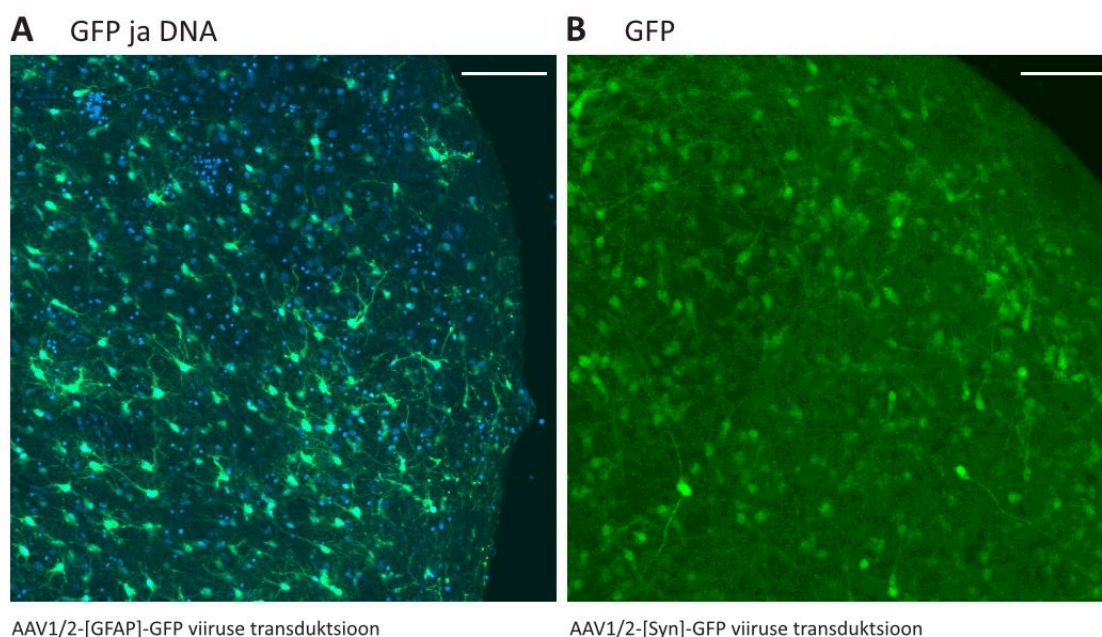
SDS-PAGE järgselt kanti valgud polüvinülideendifluoriidmembraanile 100 V juures 10 minuti jooksul, kasutades Trans-Blot Turbo Mini ülekande pakke (0,2 µm, Bio-Rad) ning seejärel blokeeriti membraani 60 minutit 5% piimalahuses (rasvavaba piimapulber lahustatud TBS 0,1% Tween 20 lahuses). Membraane inkubeeriti erinevate primaarsete antikehadega: hiire puromütsiini vastane antikeha (MABE343, Millipore), hiire glütseraldehüüd 3-fosfaatdehüdrogenaasi (GAPDH) vastane antikeha (MAB374, Millipore), küüliku mCherry vastane antikeha (NBP2-25157, Novus Biologicals). Antikehasid lisati lahjenduses 1:2000, 2% rasvavabas piimas. Sekundaarsete antikehadena kasutati mädarõika peroksüdaasiga (HRP) märgistatud kitse hiire antikeha vastast sekundaarset antikeha (A16066, Invitrogen) ning HRP-ga märgistatud kitse küüliku antikeha vastast sekundaarset antikeha (32460, Invitrogen). Sekundaarseid antikehasid lisati lahjenduses 1:5000, 2% rasvavabas piimas.

Valkude visualiseerimiseks kasutati SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity (Thermo Scientific) või SuperSignal™ West Atto Ultimate Sensitivity (Thermo Scientific) substraate. Kemoluminestsentsi signaalid tuvastati ja pildistati ImageQuant™ LAS 4000 kaamerasüsteemiga ning kvantiseeriti ImageQuant™ TL analüüsitarkvaraga. Proovide laadimise kontrolliks kasutati kas koduhoidjageeni *GAPDH* või värviti membraani Coomassie Blue värviga.

4. Tulemused ja arutelu

4.1 GFP reportervalgu konfokaalmikroskoopia roti ajukoore organotüüpsel lõikudel

Sünnieelsetest rottidest (embrüonaalne päev 21) valmistatud ja seitse päeva organotüüpses kultuuris kasvatatud ajukoore lõikude elumuse visuaalseks hindamiseks teostati GFP reportervalgu konfokaalmikroskoopiline analüüs. Selle käigus vaadeldi kahte koelõiku, transdutseeritud kahe erineva viirusega: neuronispetsiifiline AAV1/2-[Syn]-GFP (Syn: sünapsiini promootor) ning astrotsüüdispetsiifiline AAV1/2-[GFAP]-GFP (GFAP: gliia fibrillaarse happelise valgu promootor). Astrotsüüdispetsiifilise viirusega transdutseeritud lõiku inkubeeriti mikroskopeerimisele eelnevalt Hoechst 33342 fluorestseeruva värviga. Preparaadid valmistati fikseerimata kujul HBSS puhvrise alus- ja katteklasi vahele.



Joonis 1. GFP reportervalgu ekspressioon sünnieelsete rottide ajukoore lõikudes: konfokaalmikroskoopiline analüüs. Koelõike transdutseeriti AAV1/2-[GFAP]-GFP ja AAV1/2-[Syn]-GFP viirustega, millelt ekspresseerus GFP valg. Kultiveerimise seitsmendal päeval teostati konfokaalmikroskoopiline analüüs. Paneelil (A) on detekteeritud astrotsüüdid roheliselt fluorestseeruva valgu (GFP) ekspressiooni põhjal. DNA on värvitud Hoechst värvinguga ning see on nähtav siniselt. Paneelil (B) on detekteeritud neuronid GFP valgu ekspressiooni põhjal, mis on visualiseeritud roheliselt. 5 µm sammuga järjestikused pildid tehti mikroskoobiga Zeiss LSM 900, kasutades 10x suurendusega objektiivi. Mõõt – 100 µm.

Konfokaalmikroskoopiline analüüs näitas, et koelõikudel avaldus nii neuronispetsiifiliselt kui ka astrotsüüdispetsiifiliselt viiruselt GFP valg, sest fluorestsentsi signaal oli tugev mõlemal juhul terve koelõigu ulatuses. Hoechst 33342 värviga inkubeeritud koelõigu puhul esines samuti tugev fluorestsentsi signaal ning DNA oli hästi visualiseeritud (joonis 1A). Kuna lõikudes esines tugev GFP valgu ekspressioon, siis saab järeldada, et viirusvektoritega GFP reportervalgu ekspresseerimine õnnestus nii neuronites sünapsiini promootori kontrolli alt kui ka astrotsüütides GFAP promootori alt. See viitab teatud määral ka koelõikude elujõulisusele antud tingimustes, kuna GFP valgu detekteerimine fluorestsentsmikroskoobis nõuab paar päeva aega. Elujõulisuse kinnitamiseks oleks aga oluline teostada ka elumuse analüüse, kasutades selleks rakusurma-spetsiifilisi värvingumeetodeid (Humpel, 2015).

4.2 Aktiivsus-sõltuvate geenide regulatsioon KCl depolarisatsiooni toimel

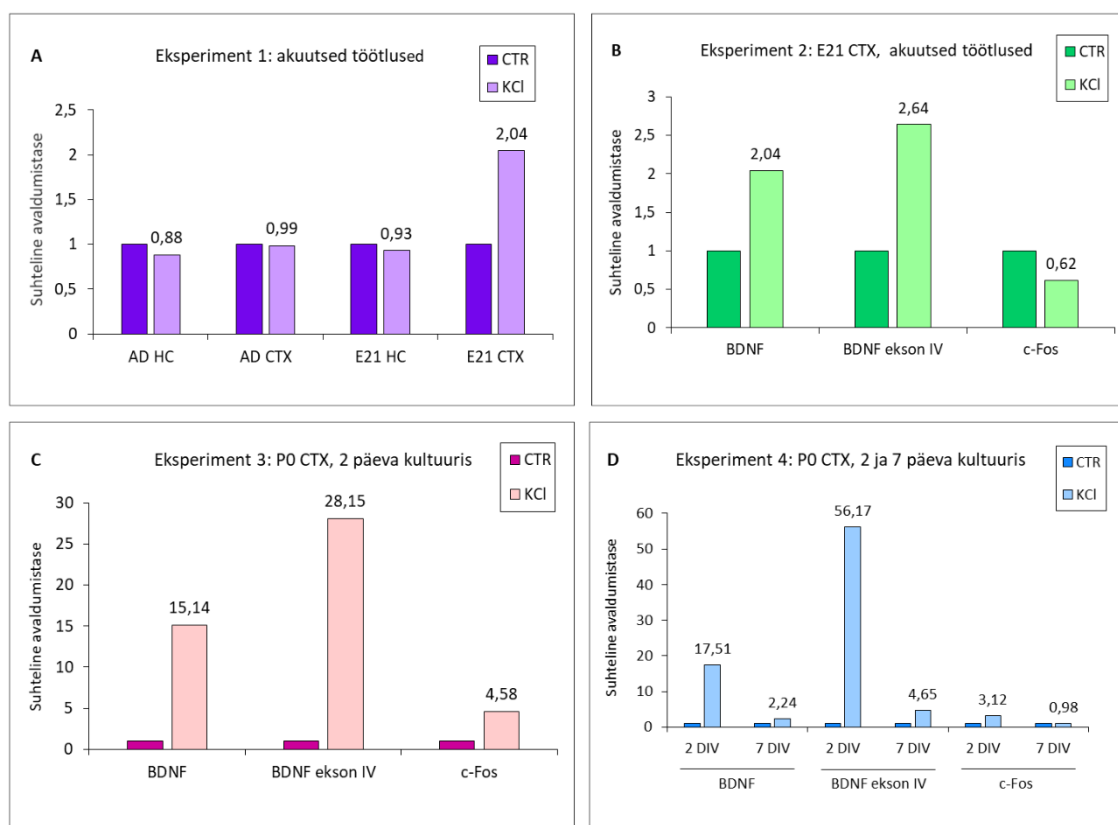
Neuronaalsest aktiivsusest sõltuvate geenide indutseerimiseks töödeldakse neuroneid kaaliumkloriidiga – kõrgendatud rakuvälise kaaliumkloriidi mõjul depolariseerub neuronite membraan rakusisese kaltsiumi signaliseerimise vahendusel (P. R. Lee & Fields, 2021; Rienecker et al., 2020). Antud töös kasutati aktiivsus-sõltuvate geenide ekspressiooni uurimiseks kolmes erinevas vanusejärgus katseloomi: sünnieelseid, vastsündinud ja täiskasvanud rotte. Lõigukultuurid valmistati kas ajukoorest või hipokampusest ning lõike kultiveeriti kas vabalt söötmes või poorsetel poolläbilaskvatel membraanidel. Kultiveeritavaid lõike töödeldi kaaliumkloriidiga kolmel erineval tingimusel – kas kohe lõikude valmistamise järgselt ehk akuutselt, pärast kahte või seitset päeva kultuuris kasvatamist (tabel 1). Lõigukultuurid homogeniseeriti, eraldati mRNA ning sünteesiti komplementaarne cDNA. Kasutades RT-qPCR-i leiti *BDNF* ja *c-Fos* geenide mRNA-de suhtelised avaldumistasemed töödeldud proovides kontrollproovide ehk töötlemata proovide suhtes.

Tabel 1. Aktiivsus-sõltuvate geenide regulatsiooni tuvastamiseks seatud katsetingimused ja vastavate geenide ekspressioonitasemed KCl depolarisatsiooni toimel.

Katselooma vanus	Ajukoor (CTX) / hipokampus (HC)	Kultuuris kasvatamise aeg	Elus/surnud*	KCl regulatsioon (<i>BDNF</i>)	KCl regulatsioon (<i>c-Fos</i>)
Sünnieelne (E21)	CTX	0 DIV	+	+	-
Sünnieelne (E21)	HC	0 DIV	+	-	P/M
Vastsündinu (P0)	CTX	2 DIV	+	++	+
Vastsündinu (P0)	CTX	7 DIV	+	+	-
Täiskasvanu (AD)	CTX	0 DIV	+	-	P/M
Täiskasvanu (AD)	HC	0 DIV	+	-	P/M
Täiskasvanu (AD)	CTX	2 DIV	-	X	X

Ekspriimentides kasutati kas sünnieelseid (E21), vastsündinud (P0) või täiskasvanud (AD) katseloomi ning lõigukultuurid valmistati nii ajukoorest (CTX) kui ka hipokampusest (HC). Koelõike kultiveeriti kas kaks või seitse päeva ning töödeldi seejärel kaks tundi 25 mM KCl-ga, või töödeldi kohe pärast lõikude valmistamist ehk akuutselt. Töötuse järgselt lõigukultuurid homogeniseeriti, eraldati mRNA ning sünteesiti komplementaarne cDNA. Neuronaalsest aktiivsusest sõltuvate geenide mRNA-de analüüsimiseks viidi läbi kvantitatiivne reaalkaasa polümeraasi ahelreaktsioon (RT-qPCR). * - Elumust hinnati RNA saagise olemasolu või puudumise põhjal. KCl regulatsiooni iseloomustavate veergude andmete tähistused: „-“ tähistab kuni 1,5-kordset suhtelist avaldumistasemet kontrollproovi (töötlemata proovi) suhtes, „+“ tähistab 1,5-5-kordset suhtelist avaldumistasemet ning „++“ rohkem kui 5-kordset suhtelist avaldumistasemet. Tähis „P/M“ ehk „pole määratud“ viitab sellele, et vastavat geeni antud tingimustes valmistatud proovide puhul ei analüüsitud. Tähis „X“ viitab RNA saagise puudumisele.

Esimeses eksperimendis testiti *BDNF* mRNA induktsiooni akuutse KCl töötuse tulemusena ehk organotüüpseid lõike töödeldi nende valmistamise järgselt kaks tundi kaaliumkloriidiga. (joonis 2A) Tulemustest selgus, et *BDNF* geen ei indutseerunud akuutsetes täiskasvanud roti ajukoore ja hipokampuse lõikudes ega sünnieelse roti hipokampuse lõikudes – töödeldud proovide *BDNF* mRNA suhtelised avaldumistasemed olid madalamad kontrollproovide väärtustest. Töötuse mõju puudumine võib viidata sellele, et kultiveerimise varajases staadiumis pole neuronid veel võimelised kaaliumkloriidi töötusele reageerima, sest pole toimunud reaktiivset sünaptogeneesi ega reorganisatsiooni, mis võimaldaksid aktiivsus-sõltuvat geeniekspressiooni. Sünnieelse roti ajukoore lõikudes aga täheldati *BDNF* madalat reguleeritavust KCl töötuse mõjul.



Joonis 2. *BDNF* ja *c-Fos* mRNA-de suhtelised induksioonitasemed kaaliumkloriidiga töödeldud proovides kontrollproovide suhtes. Lõigukultuure töödeldi 25 mM kaaliumkloriidiga kaks tundi kas akuutselt (0 DIV), kultiveerimise teisel (2 DIV) või seitsmendal (7 DIV) päeval. Paneel (A) iseloomustab *BDNF* mRNA suhtelist avaldumistaset KCl-ga töödeldud akuutsetes täiskasvanud (AD) ja sünnieelsete (E21) rottide ajukoore (CTX) ning hipokampuse (HC) lõikude proovides, kontrollproovide suhtes (CTR = 1). Paneelil (B) on toodud *BDNF*, *BDNF* ekson IV ja *c-Fos* mRNA-de suhtelised avaldumistasetes akuutselt KCl-ga töödeldud sünnieelse roti ajukoore lõikude proovides, kontrollproovide suhtes (CTR = 1). Paneel (C) iseloomustab *BDNF*, *BDNF* ekson IV ja *c-Fos* mRNA-de suhtelisi avaldumistaseteid teisel kultiveerimise päeval KCl-ga töödeldud vastsündinud (P0) roti ajukoore lõikude proovides, kontrollproovide suhtes (CTR = 1). Paneelil (D) on näidatud *BDNF*, *BDNF* ekson IV ja *c-Fos* mRNA-de suhtelised avaldumistasetes 2 DIV ja 7 DIV KCl-ga töödeldud vastsündinud roti ajukoore lõikude proovides, kontrollproovide suhtes (CTR = 1). Kõik näidatud RT-qPCR tulemused on saadud ühest bioloogilisest kordusest ja on normaliseeritud koduhoidjageeni *GAPDH* suhtes.

Teises eksperimendis (joonis 2B) töödeldi sünnieelse roti ajukoore lõike kaaliumkloriidiga samamoodi nagu esimeses eksperimendis (joonis 2A). RT-qPCR meetodil analüüsiti *BDNF* ja *c-Fos* geenide mRNA-sid. Lisaks kogu *BDNF* mRNA mõõtmisele analüüsiti ka alternatiivse transkripti – *BDNF* ekson IV sisaldava mRNA – induksiooni ning tuvastati, et akuutselt töödeldud lõikudes olid nii *BDNF* kui ka *BDNF* ekson IV mRNA-de avaldumistasetes võrreldes kontrollproovidega madalad, mis kinnitas eelmise katse tulemusi. *c-Fos* geeni induksiooni sünnieelse roti ajukoore lõikudes aga ei toimunud.

Kolmandas eksperimendis (joonis 2C) töödeldi kaaliumkloriidiga vastsündinud roti ajukoore lõike pärast kahte päeva kultiveerimist. Eksperimendi RT-qPCR tulemusi analüüsides ilmnes, et töötluuse toimel indutseerusid nii *BDNF* kui ka *c-Fos* geenid – töödeldud lõikude mRNA-de suhtelised avaldumistasetes ületasid kontrollproovide väärtuseid rohkem kui neljakordselt *c-Fos* geeni puhul ning rohkem kui kümnekordselt *BDNF* geeni puhul. Kõige kõrgem oli aga *BDNF* ekson IV mRNA induksioonitase, mis oli kontrollproovist 28 korda kõrgem. *BDNF* neurotroofne tegur on

hädavajalik närvisüsteemi terviklikuks arenguks, soodustades neuronite elumust ja sünaptilist plastilisust (Fitzgerald et al., 2001; Middlemas, 2007). On teada, et BDNF aitab vältida ka aksotoomiast põhjustatud rakusurma (Alcántara et al., 1997). *BDNF* geeni kõrgem induksioon viitab sellele, et katselooma vanus (sünnieelne/vastsündinu) ning töötamise teostamise aeg mängivad olulist rolli töötamise edukuses – kaks päeva kultiveeritud koe puhul on tõenäolisem, et neuronid on töötamisele vastuvõtlikud tänu neurogeneesile ning taasloodud sünaptilistele ühendustele; seda toetab ka kirjandus (Lossi et al., 2009). Siinkohal tuleb märkida, et kaks päeva kultiveeritud täiskasvanud roti ajukoore lõikudes sisaldunud mRNA kontsentratsioon oli äärmiselt madal, mis viitas kultiveeritavate lõikude elujõulisuse puudumisele ning nendest kultuuridest eraldatud proove RT-qPCR meetodil ei analüüsitud.

Edasiste organotüüpsete lõigukultuuride valmistamisel jätkati vastsündinud roti ajukoore lõikude kasutamist. Neljandas eksperimendis (joonis 2D) kultiveeriti lõike kas kaks või seitse päeva ja töödeldi siis kaaliumkloriidiga. Tulemustest selgus taas, et kaks päeva kultiveeritud ja seejärel töödeldud vastsündinud roti ajukoore lõikudes oli töötlus väga efektiivne, kuna *BDNF* mRNA-de suhteline avaldumistase kontrollproovide suhtes oli 17-kordne. *BDNF* ekson IV puhul oli suhteline avaldumistase 56-kordne, ent *c-Fos* geeni induksioon töötamise mõjul oli madal. Kuna *c-Fos* on regulatoorne transkriptsioonifaktor, mille transkriptsioon toimub väga kiirelt vastuseks neuronaalsele stiimulile, siis kasutatakse seda neuronaalse aktiivsuse tuvastamiseks – ent *c-Fos* geenile on omane ka selle transkriptsiooni kiire allareguleerimine (Barbosa & Silva, 2018; Thompson et al., 1995; Zukin et al., 2004). Seetõttu on tõenäoline, et *c-Fos* geeni ekspressioonitase tõusis tiptasemele enne mõõdetud kahe tunni ajapunkti. Seitse päeva kultiveeritud ja seejärel kaaliumkloriidiga töödeldud vastsündinud roti ajukoore lõikude puhul oli aga töötamise indutseeriv mõju nõrk. Lisaks täheldati, et nii *BDNF* kui ka *c-Fos* geenide avaldumistasemed olid madalad. See tulemus võib osutada osalisele rakkude hukkumisele või nende funktsionaalsuse kadumisele kultiveeritavas koes. Erandiks oli *BDNF* ekson IV, mille avaldumistase oli võrreldes kontrolliga rohkem kui neljakordne – selle põhjenduseks võib olla *BDNF* ekson IV tugevamalt reguleeritud neuronaalne aktiivsus.

BDNF ja *BDNF* ekson IV mRNA-de märkimisväärselt kõrged avaldumistasemed kaaliumkloriidiga töödeldud vastsündinud rottide ajukoore lõikudes, võrreldes kontrollproovidega, viitavad sellele, et antud koes ja vastavas vanuses on töötlus tõhusaim ning seega on antud tingimustes eelistatav kasutada vastsündinud roti ajukoore lõike. Nii sünnieelse kui ka täiskasvanud roti hipokampuse lõigukultuuride puhul ei olnud töötamise mõju täheldatav. Sünnieelse roti aju organotüüpsed lõigud on kultuuris elujõulised, ent nende organotüüpne ja sünaptiline organisatsioon on puudulik; täiskasvanu koe puhul on jällegi põhiprobleemiks rakkude elumuse tagamine (Humpel, 2015; Lossi et al., 2009).

Vastsündinud roti ajukoore lõigukultuurides osutus efektiivseimaks teisel kultiveerimise päeval teostatud kaaliumkloriidi töötlus, sest *BDNF* ja *c-Fos* geenide avaldumistasemed kontrollproovide suhtes olid kõrgeimad, võrdluses akuutselt ja seitsmendal päeval teostatud töötlustega. Kirjanduse andmetel hukkub teatud hulk rakke lõikude valmistamise käigus vigastuse tagajärjel, ent edaspidi, kuni kultiveerimise kolmanda päevani esineb apoptootilist rakusurma vähesel määral (Haydar et al., 1999; Takahashi et al., 1999). Seega saab järeldada, et teisel kultiveerimise päeval töödeldud lõikudes ei toimu massilist rakkude hukkumist ning samuti leiab aset sünaptiline reorganisatsioon. Akutse töötamise puhul esineb rakusurma suuremal määral ning lisaks on tõenäoline, et lõikude

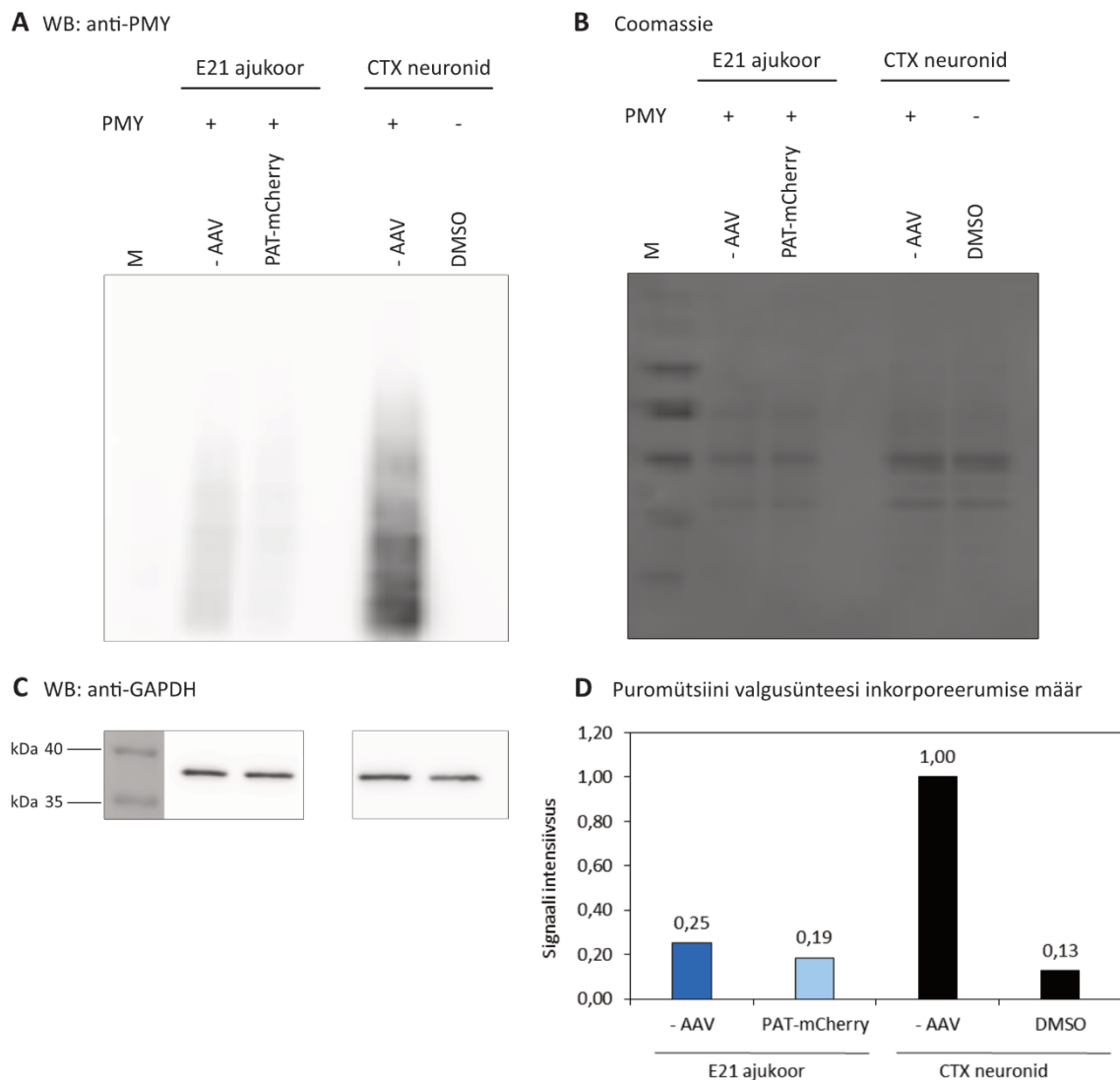
valmistamine omaette põhjustab juba geenide basaaltasemetel tõusu ehk induksiooni kaaliumkloriidi mõjul ei toimu. Seitse päeva kultiveeritud lõikudel esinev puudulik töötamise mõju geenide regulatsioonile tuleneb suure tõenäosusega rakkude hukkumisest. Sobivaimaks kaaliumkloriidi töötamise ajavahemikuks võib seega olla 2-6 DIV vahemik, ent *c-Fos* geeni indutseerimiseks tasuks proovida ka töötamise teostamise aja lühendamist. Kaaliumkloriidi töötamise efektiivne toimimine ja neuronaalsete aktiivsuse-sõltuvate geenide mRNA-de kõrged avaldumistasemed kolmandas ja neljandas eksperimendis viitavad sünaptilise organisatsiooni ning signaliseerimise taastumisele lõikude valmistamise järgselt ehk kultiveeritava koe elujõulisusele.

4.3 Valgusünteesi aktiivsuse määramine puromütsiinmärgistusega

Järgnevate katsete eesmärk oli uurida erinevate organotüüpsete lõikude kultiveerimisviiside sobivust valgusünteesi aktiivsuse mõõtmiseks puromütsiinmärgisega (Schmidt et al., 2009). Lisaks uuriti neuronites puromütsiinmärgist inaktiveeriva ensüümi puromütsiini atsetüültransferaasi (PAT, (Vara et al., 1985)) efektiivsust. Valgusünteesi aktiivsuse määramiseks kultiveeriti nii sünnieelse kui ka vastsündinud roti ajukoore lõike ning täiskasvanud roti hipokampuse lõike kaspoortel poolläbilaskvatel membraanidel või vabalt söötmes. Organotüüpeid lõike transdutseeriti adeno-assotsieerivate viirustega, mis avaldavad neuron-spetsiifilise inimese sünapsiini (Syn) promotori alt mCherry-ga liitvalgus olevat PAT ensüümi, ainult mCherry valku (vastavalt: AAV1/2-[Syn]-PAT-mCherry ja AAV1/2-[Syn]-mCherry või AAV1/2-[Syn]-DREADD-mCherry) või jäeti transdutseerimata. Koelõike märgistati kaks tundi 5 µM puromütsiiniga, lõigud homogeniseeriti RIPA valgu ekstraksioonipuhvril ning bitsinhoniinhappe analüüsi (BCA) meetodil mõõdeti proovide valgukontsentratsioonid. Totaalse valgukontsentratsiooni väärtuste põhjal valmistati kõikidest proovidest ühise kontsentratsiooniga lüsaadid 2x või 5x Laemmli puhvril, mida analüüsiti *Western blot* meetodil. Allpool kirjeldatakse detailselt nelja järjestikuselt teostatud eksperimenti.

Esimese eksperimendi (joonis 3A) organotüüpsed lõigud valmistati sünnieelse roti ajukoorest, mida oli kas transdutseeritud AAV1/2-[Syn]-PAT-mCherry viirusega või jäetud transdutseerimata ning kultiveeriti poolläbilaskvatel poortel membraanidel. Lõigukultuure märgistati 7 DIV kaks tundi 5 µM puromütsiiniga ja ekstraheeriti valgud puromütsiini valkudesse inkorporeerumise määramiseks.

Western blot analüüsi tulemusena detekteeriti puromütsiinüleeritud valke hea signaaliga mõlemast lüsaadist (joonis 3A). Puromütsiini abil on võimalik määrata kultiveeritava materjali valgusünteesi aktiivsust – puromütsiini valkudesse inkorporeerumise määr annab otseselt aimu mRNA-de translatsioonist rakukultuuris *in vitro* (Schmidt et al., 2009). Võib väita, et ka kultiveeritud lõikudes toimub aktiivne valgusüntees kuni seitsmenda kultiveerimise päevani ning märgistamise ajahetkel. Puromütsiini tootjaks on grampositiivne bakter *Streptomyces alboniger*, mis samuti ekspresseerib puromütsiini inaktiveerivat puromütsiini atsetüültransferaasi (Pérez-González et al., 1983; Porter et al., 1952). Selle ensüümi inhibeeriv mõju avaldub puromütsiini reaktiivse aminorühma atsetüleerimises – seeläbi ei saa puromütsiini sünteesitavate valkudega peptiidsideid moodustada (Aviner, 2020). (joonis 3A) Teisel rajal, kus oli AAV1/2-[Syn]-PAT-mCherry viirusega lüsaat, oli tuvastatav PAT ensüümi inhibeeriv mõju puromütsiinile, sest teise raja puromütsiini signaal oli mõnevõrra nõrgem esimese raja omast – seda toetavad ka puromütsiinüleeritud valkude signaalide kvantiseerimise tulemused (joonis 3C).

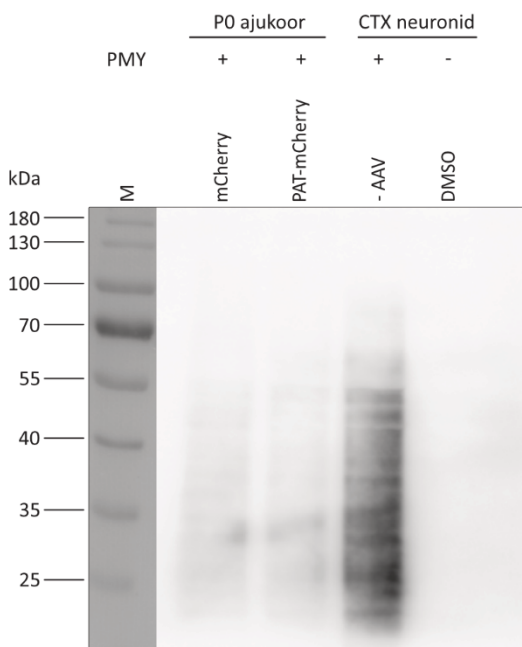


Joonis 3. Sünnieelse roti ajukoore lõikude valgusünteesi aktiivsuse määramine: Western blot analüüs. Sünnieelse roti ajukoore organotüüpseid lõike transdutseeriti valmistamise järgselt AAV1/2-[Syn]-PAT-mCherry viirusega või jäeti transdutseerimata ning kultiveeriti poolläbilaskvatel poorsetel membraanidel. Seitsmendal kultiveerimise päeval märgistati lõike kaks tundi 5 μ M puromütsiiniga, lõigud homogeniseeriti ja valmistati valgulüsaadid. BCA analüüsi teel leiti lüsaatide valgukontsentratsioonid, mille põhjal viidi mõlemad proovid 2x Laemmli puhvrtsi ühise kontsentratsioonini. Koelõikude valgusünteesi aktiivsust analüüsiti Western blot meetodil. Puromütsiin tuvastati puromütsiinivastase antikehaga. Valgumarkerina kasutati PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) markerit. Paneeli (A) esimesel rajal on ilma viirusega proov ning teisel rajal AAV1/2-[Syn]-PAT-mCherry viirusega transdutseeritud proov. Puromütsiini positiivseks kontrolliks kasutati puromütsiiniga märgistatud roti ajukoore neuronikultuuri ning negatiivseks kontrolliks roti ajukoore neuronikultuuri DMSO-s. Proovide laadimise kontrolliks kasutati Coomassie värvikut (paneel B) ja teostati koduhoidjageeni GAPDH valgu Western blot analüüs (paneel C). Paneelil (D) on toodud puromütsiini inkorporeeritud valgude signaalide kvantiseeritud tulemused. kDa – kilodaltonid.

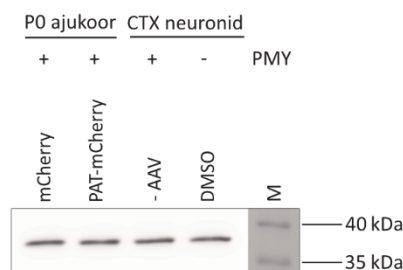
Teises eksperimendis valmistati lõigukultuurid vastündinud roti ajukoorest, mida kultiveeriti samuti poolläbilaskvatel membraanidel. Lõike transdutseeriti AAV1/2-[Syn]-PAT-mCherry viiruse ning AAV1/2-[Syn]-mCherry kontrollviirusega 1 DIV ning märgistati 5 DIV kaks tundi 5 μ M puromütsiiniga. Lõikudest valmistati lüsaadid ning määrati valgukontsentratsioonid BCA analüüsil, mille põhjal viidi proovid ühise kontsentratsioonini 2x Laemmli puhvrtsi. Teise katse Western blot analüüsil (joonis 4A) detekteeriti esimesel, AAV1/2-[Syn]-mCherry prooviga rajal nõrk puromütsiini

signaal. Teisel rajal, kus oli AAV1/2-[Syn]-PAT-mCherry viirusega transdutseeritud lüsaat, oli signaal sarnase intensiivsusega ning kvantiseerimise tulemused (joonis 4C) viitavad hoopis selle raja puromütsinüleeritud valkude kõrgemale signaalile.

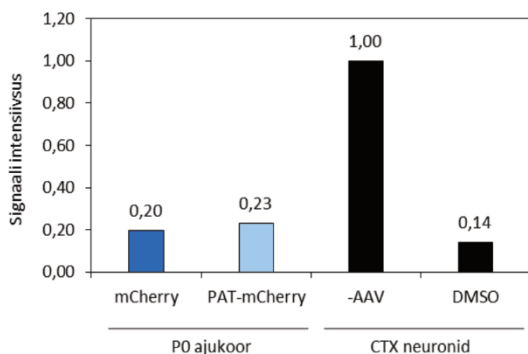
A WB: anti-PMY



B WB: anti-GAPDH



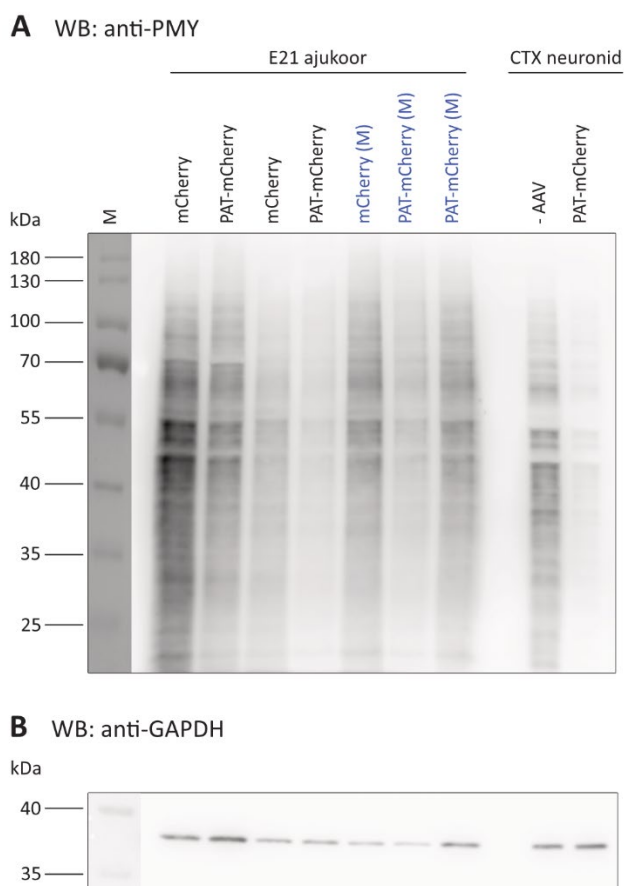
C Puromütsiini valgusünteesi inkorporeerumise määr



Joonis 4. Vastsündinud roti ajukoore lõikude valgusünteesi aktiivsuse määramine: *Western blot* analüüs. Vastsündinud roti ajukoore organotüüpeid lõike transdutseeriti 1 DIV AAV1/2-[Syn]-mCherry ja AAV1/2-[Syn]-PAT-mCherry viirustega. 5 DIV märgistati lõike kaks tundi 5 μ M puromütsiiniga, lõigud homogeniseeriti ja valmistati valgulüsaadid. BCA analüüsi teel leiti lüsaatide valgukontsentratsioonid, mille põhjal viidi proovid 2x Laemmli puhvrtsis ühise kontsentratsioonini. Koelõikude valgusünteesi aktiivsust analüüsiti *Western blot* meetodil. Puromütsiin tuvastati puromütsiinivastase antikehaga. Valgumarkerina kasutati PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) markerit. Paneelil (A) on esimesel rajal AAV1/2-[Syn]-mCherry viirusega lüsaat ning teisel rajal AAV1/2-[Syn]-PAT-mCherry viirusega lüsaat. Puromütsiini positiivse kontrollina kasutati puromütsiiniga märgistatud roti ajukoore neuronikultuuri ning negatiivse kontrollina roti ajukoore neuronikultuuri DMSO-s. Paneelil (B) on proovide laadimise kontrolliks teostatud koduhoidjageeni GAPDH valgu analüüs *Western blot* meetodil. Paneelil (C) on toodud puromütsinüleeritud valkude signaalide kvantiseeritud tulemused. kDa – kilodaltonid.

Kolmandas eksperimendis valmistati organotüüpsed lõigud sünnieelse roti ajukoorest ning transdutseeriti valmistamise järgselt AAV1/2-[Syn]-DREADD-mCherry kontrollviirusega ja AAV1/2-

[Syn]-PAT-mCherry viirusega. Koelõike kultiveeriti nii vabalt söötmes kui ka poolläbilaskvatel membraanidel ning märgistati 5 DIV kaks tundi 5 μ M puromütsiiniga. Lüsaate analüüsiti paarikaupa *Western blot* meetodil nii, et esimesele neljale rajale lisati AAV1/2-[Syn]-mCherry ja AAV1/2-[Syn]-PAT-mCherry viirustega proovid vaheldumisi (joonis 5A). Nende lüsaatide organotüüpseid lõike oli kultiveeritud vabalt söötmes. Kolmel järgmisel rajal on membraanidel kultiveeritud lõikude lüsaadid, millest esimene on transdutseeritud AAV1/2-[Syn]-mCherry viirusega ning viimased kaks proovi AAV1/2-[Syn]-PAT-mCherry viirustega.

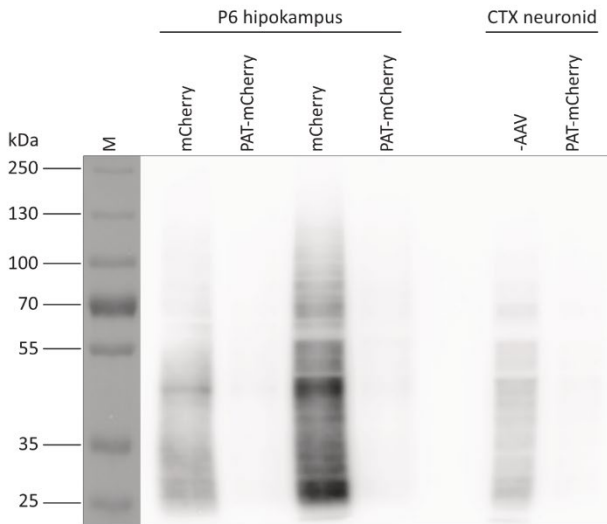


Joonis 5. Sünnieelse roti ajukoore lõikude valgusünteesi aktiivsuse määramine: *Western blot* analüüs. Sünnieelse roti ajukoore organotüüpseid lõike transdutseeriti valmistamise järgselt AAV1/2-[Syn]-mCherry ja AAV1/2-[Syn]-PAT-mCherry viirustega. Lõike kultiveeriti kas poolläbilaskvatel poorsetel membraanidel või vabalt söötmes. 5 DIV märgistati lõike kaks tundi 5 μ M puromütsiiniga, lõigud homogeniseeriti ja valmistati valgulüsaadid. BCA analüüsi teel leiti lüsaatide valgukontsentratsioonid, mille põhjal viidi proovid 5x Laemmli puhvrts ühise kontsentratsioonini. Koelõikude valgusünteesi aktiivsust analüüsiti *Western blot* meetodil. Puromütsiini tuvastati puromütsiinivastase antikehaga. Valgumarkerina kasutati PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) markerit. Paneelil (A) on esimesel kuuel rajal paarikaupa vaheldumisi AAV1/2-[Syn]-mCherry ja AAV1/2-[Syn]-PAT-mCherry viirusega lüsaadid, vastavas järjekorras, ning seitsmendal rajal üksik AAV1/2-[Syn]-PAT-mCherry viirusega lüsaat. Esimesed neli proovi on valmistatud vabalt söötmes kasvatatud lõikudest ning viimased kolm membraanidel kultiveeritud lõikudest (paneelil A märgitud sinise värviga ja (M) tähistusega). Puromütsiini suhtes positiivse kontrollina kasutati OPP-ga märgistatud roti ajukoore neuronikultuuri ning negatiivse kontrollina PAT ensüümiga roti ajukoore neuronikultuuri. Kontrollid olid märgistatud kaks tundi 20 μ M OPP-ga. Paneelil (B) on proovide laadimise kontrolliks teostatud koduhoidja geeni GAPDH valgu analüüs. kDa – kilodaltonid.

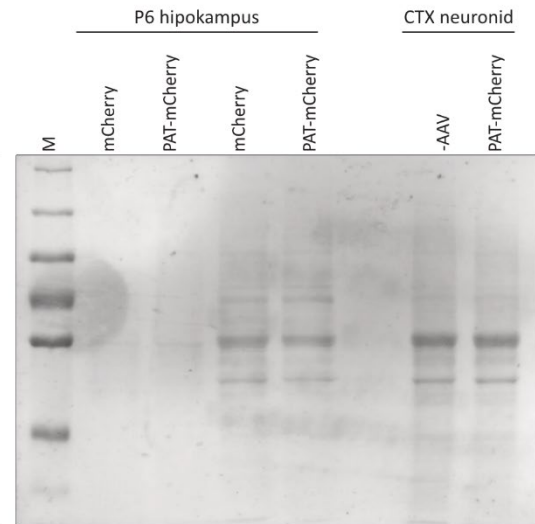
Joonisel 5A on esimesel kahel rajal detekteeritud intensiivsed puromütsiini signaalid, kus esimese raja signaal on märksa tugevam teisest, PAT ensüümiga proovi omast. Ka puromütsiinüleeritud

ensüümi toimisest ning viitab selle funktsionaalsusele antud katsesüsteemis. Kuuepäevase roti hipokampuse organotüüpsete lõikude puromütsiini signaal on ka märgatavalt tugevam positiivse kontrollproovi signaalist, mis kinnitab eelmise eksperimendi puhul tehtud järeldust ka selle katsesüsteemi puhul – valgusünteesi toimumise määr lõigukultuurides on oluliselt kõrgem kui primaarses neuronikultuuris. Küll aga on kahe bioloogilise korduse puromütsiini signaalide intensiivsustes märgatav erinevus, mistõttu oleks korrektne katset korrata rohkem kui kahe prooviga.

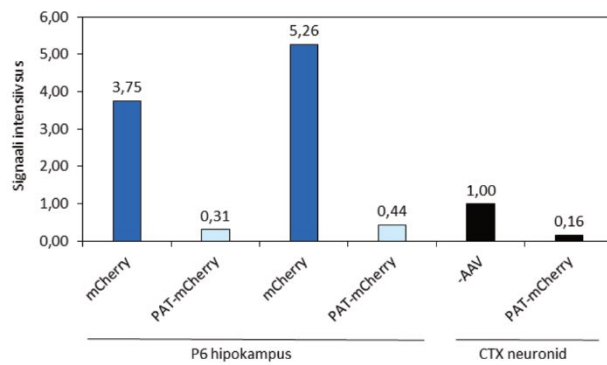
A WB: anti-PMY



B Coomassie



C Puromütsiini valgusünteesi inkorporeerumise määr



Joonis 7. Kuuepäevase roti hipokampuse lõikude valgusünteesi aktiivsuse määramine: Western blot analüüs.

Kuuepäevase roti hipokampuse organotüüpsete lõike transdutsseeriti valmistamise järgselt AAV1/2-[Syn]-mCherry kontrollviiruse ja AAV1/2-[Syn]-PAT-mCherry viirusega. Lõike kultiveeriti poolläbilaskvatel poorsetel membraanidel. 5 DIV märgistati lõike kaks tundi 5 μ M puromütsiiniga, lõigud homogeniseeriti ja valmistati valgulüsaadid. BCA analüüsi teel leiti lüsaatide valgukontsentratsioonid, mille põhjal viidi proovid 5x Laemmli puhvrts ühise kontsentratsioonini. Koelõikude valgusünteesi aktiivsust analüüsiti *Western blot* meetodil. Puromütsiini tuvastati puromütsiinivastase antikehaga. Valgumarkerina kasutati PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) markerit. Paneelil (A) on neljal rajal vaheldumisi AAV1/2-[Syn]-mCherry ja AAV1/2-[Syn]-PAT-mCherry viirusega lüsaadid, vastavas järjekorras. Puromütsiini suhtes positiivse kontrollina kasutati OPP-ga märgistatud roti ajukoore neuronikultuuri ning negatiivse kontrollina PAT ensüümiga roti ajukoore neuronikultuuri. Kontrollid olid märgistatud kaks tundi 20 μ M OPP-ga. Paneelil (B) on proovide laadimise kontrolliks teostatud Coomassie värving. Paneelil (C) on toodud puromütsiinüleeritud valkude signaalide kvantiseeritud tulemused. kDa – kilodaltonid.

Puromütsinüleeritud valkude signaalide olemasolu kahe esimese eksperimendi *Western bloti* analüüsi tulemustes viitab aktiivsele valgusünteesi toimumisele nii sünnieelse kui ka vastsündinud roti ajukoore lõigukultuurides, mis on lõikude elujõulisuse indikaatoriks. Küll aga ei olnud nende mudelite puhul täheldatav PAT ensüümi puromütsiini inaktiveeriv mõju ning vastsündinu ajukoore lõikudes oli puromütsinüleeritud valkude signaal isegi kõrgem PAT-i ekspresseerivas lõigukultuuris. Selgitamaks, kas see tulemus tuleneb viirusega transdutseerimise ebaõnnestumisest või ensüümi mõju puudumisest antud katsesüsteemis, tuleks teha lisanduvaid eksperimente.

Kuuapäevaste rottide hipokampusest valmistatud organotüüpsete lõikude puromütsiini signaalid viitasid aga produktiivsele valgusünteesi toimumisele lõikudes ning kõrgele puromütsiini inkorporeerumise määrale, mistõttu oleksid organotüüpsete lõikude katsesüsteem ning puromütsiinmärgistamine head valgusünteesi uurimismeetodid. Kuuapäevaste rottide aju sünaptiline organisatsioon on sünnieelsete ja vastsündinud rottidega võrreldes selgemini välja kujunenud ning ka muud valgusünteesiks vajalikud komponendid on selles vanuses funktsionaalsemad. PAT ensüümi mõjul vähenes puromütsiini ekspressioonitase, millest saab järeldada, et viirusvektori abil PAT-mCherry liitvalgu ekspresseerimine toimus samuti edukalt ja et PAT ensüüm oli lõikudes funktsionaalne. Kahe korduse omavaheliste erinevuste tõttu tuleks aga jätkata antud lõigukultuuridega katseid, et välja selgitada erinevuste päritolu.

Kokkuvõte

Organotüüpsete lõigukultuuride katsesüsteemi kasutatakse neurobioloogia valdkonnas nii elektrofüsioloogia, farmakoloogia, neurogeneesi kui ka neurodegeneratsiooni uuringutes – see katsesüsteem on mitmekülgselt omadustega, tagades kontrolli rakuväliste tingimuste üle, võimaldades ligipääsetavuse töötlustele ning samas imiteerides koelist keskkonda oluliselt paremini võrreldes dissotsieeritud primaarkultuuridega.

Organotüüpsete lõigukultuuride valmistamiseks on välja töötatud erinevaid meetodeid ja protokolle, millest levinumateks tehnikateks on rull-katsuti meetod, selle edasiarendus poolläbilaskvate membraanide näol ja vabalt söötmes kultiveerimine. Lõigukultuuri mudelid oleksid tõhusad aktiivsus-sõltuva transkriptsiooni ja valgusünteesi uurimiseks ning võiksid rakendust leida ka molekulaarse neurobioloogia ja neuron-astrotsüüt interaktsioonide tööühmades. Sellest tulenevalt oli töö eesmärgiks leida sobilikud tingimused roti ajukoore ja hipokampuse organotüüpsete lõikude kultiveerimiseks, et uurida aktiivsus-sõltuvat transkriptsiooni ja määrata valgusünteesi aktiivsust.

Töö tulemustest ilmnes, et viirusvektoritega GFP reportervalgu ekspresseerimine lõigukultuurides oli edukas nii neuronites kui ka astrotsüütides. Lisaks viitab see koelõikude elujõulisusele antud tingimustes. Aktiivsus-sõltuvate geenide *BDNF* ja *c-Fos* indutseerimine õnnestus kõige paremini vastsündinud roti ajukoore lõikudes teisel kultiveerimise päeval teostatud töötluste järgselt. Kaks päeva kultiveeritud koe puhul on tõenäoline, et neuronid on töötlustele vastuvõtlikud tänu sünaptilisele reorganisatsioonile. Sünnieelsete rottide akuutsete ajukoore lõikude madalad mRNA induktsioonitasemed viitavad geenide madalale reguleeritavusele kaaliumkloriidi depolarisatsiooni mõjul, ent akuutne töötlus võis olla ebatõhus, sest lõikude valmistamine omaette põhjustab juba geenide basaaltasemete tõusu. Aktiivsus-sõltuva transkriptsiooni uurimiseks teostatud katsetest olid edukaimad need, kus organotüüpsete lõikude kultiveerimiseks oli kasutatud poolläbilaskvaid membraane, alternatiivina vabalt söötmes kasvatamisele.

Valgusünteesi aktiivsuse uurimiseks teostatud puromütsiinmärgistamise eksperimendid kuuepäevaste rottide hipokampuse lõigukultuuridega olid viljakaimad, demonstreerides produktiivset valgusünteesi ja kõrget puromütsiini valkudesse inkorporeerumise määra. Samuti oli antud katsesüsteemis funktsionaalne puromütsiini inaktiveeriv PAT ensüüm, mis vähendas märgatavalt valkude puromütsinüleerimise määra.

Antud töö tulemusena selgitati välja peamised tingimused edukate aktiivsus-sõltuva transkriptsiooni ja valgusünteesi aktiivsuse uuringute teostamiseks organotüüpsete lõikude katsesüsteemis. Eksperimentide kordamine suurema valimiga on aga vajalik varieeruvuse minimeerimiseks ning töö edasiarendusena oleks oluline organotüüpsete lõikudega läbi viia ka elumuse analüüse, et kinnitada antud töös saadud tulemusi.

Tänuavaldused

Soovin eeskätt tänada oma juhendajat Indrek Koppelit, kelle pühendumus ja entusiasm olid nakkavad ning suureks inspiratsiooniallikaks minu tööprotsessis. Tema kannatlikkus ja heatahtlikkus vaid suurendasid mu töötahet ning innustasid väljakutsetega silmitsi seisma.

Samuti soovin tänada Florencia Cabrera-Cabrerat ja neurobioloogia uurimisgrupi liikmeid, kes löid laboris meeoluka õhkkonna, olid alati abivalmid ning pakkusid väga teretulnud kogemuslikku ja väärtuslikku nõu. Lisaks olen äärmiselt tänulik oma armsatele kursusekaaslastele ja perekonnale, kes töid toetust ja rõõmu stressirohkesse perioodi.

Kirjanduse loetelu

- Agirman, G., Broix, L., & Nguyen, L. (2017). Cerebral cortex development: an outside-in perspective. *FEBS Letters*, 591(24). <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12924>
- Aid, T., Kazantseva, A., Piirsoo, M., Palm, K., & Timmusk, T. (2007). Mouse and Rat BDNF Gene Structure and Expression Revisited. *Journal of Neuroscience Research*, 85(3), 525–535. <https://doi.org/10.1002/jnr.21139>
- Alcántara, S., Frisén, J., Del Río, J. A., Soriano, E., Barbacid, M., & Silos-Santiago, I. (1997). TrkB signaling is required for postnatal survival of CNS neurons and protects hippocampal and motor neurons from axotomy-induced cell death. *Journal of Neuroscience*, 17(10). <https://doi.org/10.1523/jneurosci.17-10-03623.1997>
- Allen, N. J., & Barres, B. A. (2009). Neuroscience: Glia - more than just brain glue. *Nature*, 457(7230). <https://doi.org/10.1038/457675a>
- Aviner, R. (2020). The science of puromycin: From studies of ribosome function to applications in biotechnology. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.04.014>
- Bakmand, T., Troels-Smith, A. R., Dimaki, M., Nissen, J. D., Andersen, K. B., Sasso, L., Waagepetersen, H. S., Gramsbergen, J. B., & Svendsen, W. E. (2015). Fluidic system for long-term in vitro culturing and monitoring of organotypic brain slices. *Biomedical Microdevices*, 17(4). <https://doi.org/10.1007/s10544-015-9973-6>
- Barbosa, F. F., & Silva, R. H. (2018). Immediate-Early Gene Expression in Neural Circuits Related to Object Recognition Memory. *Handbook of Behavioral Neuroscience*, 27, 261–271. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812012-5.00018-5>
- Barres, B. A. (2008). The Mystery and Magic of Glia: A Perspective on Their Roles in Health and Disease. *Neuron*, 60(3). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.10.013>
- Barrett, R. M., Liu, H. W., Jin, H., Goodman, R. H., & Cohen, M. S. (2016). Cell-specific Profiling of Nascent Proteomes Using Orthogonal Enzyme-mediated Puromycin Incorporation. *ACS Chemical Biology*, 11(6). <https://doi.org/10.1021/acscchembio.5b01076>
- Byrne, J. H., Heidelberger, R., & Waxham, M. N. (2014). From Molecules to Networks: An Introduction to Cellular and Molecular Neuroscience: Third Edition. *From Molecules to Networks: An Introduction to Cellular and Molecular Neuroscience: Third Edition*, 1–675. <https://doi.org/10.1016/C2011-0-07251-4>
- Campbell, K., & Götz, M. (2002). Radial glia: Multi-purpose cells for vertebrate brain development. *Trends in Neurosciences*, 25(5). [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(02\)02156-2](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(02)02156-2)
- Conn, P. M. (2016). Conn's Translational Neuroscience. *Conn's Translational Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/c2014-0-02630-5>
- Daviaud, N., Garbayo, E., Schiller, P. C., Perez-Pinzon, M., & Montero-Menei, C. N. (2013). Organotypic cultures as tools for optimizing central nervous system cell therapies. *Experimental Neurology*, 248. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.07.012>

- Dieterich, D. C., Link, A. J., Graumann, J., Tirrell, D. A., & Schuman, E. M. (2006). Selective identification of newly synthesized proteins in mammalian cells using bioorthogonal noncanonical amino acid tagging (BONCAT). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(25). <https://doi.org/10.1073/pnas.0601637103>
- Dittman, J. S., & Kreitzer, A. C. (2009). Synaptic Plasticity: Short-Term Mechanisms. *Encyclopedia of Neuroscience*, 773–778. <https://doi.org/10.1016/B978-008045046-9.01386-3>
- Duport, S., Robert, F., Muller, D., Grau, G., Parisi, L., & Stoppini, L. (1998). An in vitro blood-brain barrier model: Cocultures between endothelial cells and organotypic brain slice cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(4). <https://doi.org/10.1073/pnas.95.4.1840>
- Ecker, J. R., Geschwind, D. H., Kriegstein, A. R., Ngai, J., Osten, P., Polioudakis, D., Regev, A., Sestan, N., Wickersham, I. R., & Zeng, H. (2017). The BRAIN Initiative Cell Census Consortium: Lessons Learned toward Generating a Comprehensive Brain Cell Atlas. *Neuron*, *96*(3). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.10.007>
- Fame, R. M., & Lehtinen, M. K. (2019). Sister, Sister: Ependymal Cells and Adult Neural Stem Cells Are Separated at Birth by Geminin Family Members. *Neuron*, *102*(2). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.02.040>
- Farhy-Tselnicker, I., & Allen, N. J. (2018). Astrocytes, neurons, synapses: A tripartite view on cortical circuit development. *Neural Development*, *13*(1). <https://doi.org/10.1186/s13064-018-0104-y>
- Fields, R. D., & Dutta, D. J. (2019). Treadmilling Model for Plasticity of the Myelin Sheath. *Trends in Neurosciences*, *42*(7). <https://doi.org/10.1016/j.tins.2019.04.002>
- Fitzgerald, K. A., O'Neill, L. A. J., Gearing, A. J. H., & Callard, R. E. (2001). BDNF. *The Cytokine FactsBook and Webfacts*, 160–165. <https://doi.org/10.1016/B978-012155142-1/50032-4>
- Gähwiler, B. H. (1981). Organotypic monolayer cultures of nervous tissue. *Journal of Neuroscience Methods*, *4*(4). [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(81\)90003-0](https://doi.org/10.1016/0165-0270(81)90003-0)
- Gähwiler, B. H., Capogna, M., Debanne, D., McKinney, R. A., & Thompson, S. M. (1997). Organotypic slice cultures: A technique has come of age. *Trends in Neurosciences*, *20*(10). [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(97\)01122-3](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(97)01122-3)
- Gardner, E. P. (2010). The Senses: A Comprehensive Reference. *The Senses: A Comprehensive Reference*, 1–6. <https://doi.org/10.1016/C2009-1-03845-3>
- Gauthier, N. P., Soufi, B., Walkowicz, W. E., Pedicord, V. A., Mavrakis, K. J., MacEk, B., Gin, D. Y., Sander, C., & Miller, M. L. (2013). Cell-selective labeling using amino acid precursors for proteomic studies of multicellular environments. *Nature Methods*, *10*(8). <https://doi.org/10.1038/nmeth.2529>
- Gonzalez, C., Sims, J. S., Hornstein, N., Mela, A., Garcia, F., Lei, L., Gass, D. A., Amendolara, B., Bruce, J. N., Canoll, P., & Sims, P. A. (2014). Ribosome profiling reveals a cell-type-specific translational landscape in brain tumors. *Journal of Neuroscience*, *34*(33). <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0084-14.2014>
- Greenberg, M. E., Ziff, E. B., & Greene, L. A. (1986). Stimulation of neuronal acetylcholine receptors

- induces rapid gene transcription. *Science*, 234(4772).
<https://doi.org/10.1126/science.3749894>
- Guzowski, J. F., Setlow, B., Wagner, E. K., & McGaugh, J. L. (2001). Experience-dependent gene expression in the rat hippocampus after spatial learning: A comparison of the immediate-early genes Arc, c-fos, and zif268. *Journal of Neuroscience*, 21(14).
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-14-05089.2001>
- Haydar, T. F., Kuan, C. Y., Flavell, R. A., & Rakic, P. (1999). The role of cell death in regulating the size and shape of the mammalian forebrain. *Cerebral Cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 9(6), 621–626. <https://doi.org/10.1093/CERCOR/9.6.621>
- Heiman, M., Schaefer, A., Gong, S., Peterson, J. D., Day, M., Ramsey, K. E., Suárez-Fariñas, M., Schwarz, C., Stephan, D. A., Surmeier, D. J., Greengard, P., & Heintz, N. (2008). A Translational Profiling Approach for the Molecular Characterization of CNS Cell Types. *Cell*, 135(4).
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.10.028>
- Helmut, K., Hanisch, U. K., Noda, M., & Verkhratsky, A. (2011). Physiology of microglia. *Physiological Reviews*, 91(2). <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2010>
- Holt, C. E., Martin, K. C., & Schuman, E. M. (2019). Local translation in neurons: visualization and function. *Nature Structural and Molecular Biology*, 26(7). <https://doi.org/10.1038/s41594-019-0263-5>
- Hu, X., Leak, R. K., Shi, Y., Suenaga, J., Gao, Y., Zheng, P., & Chen, J. (2015). Microglial and macrophage polarization - New prospects for brain repair. *Nature Reviews Neurology*, 11(1).
<https://doi.org/10.1038/nrneurol.2014.207>
- Hughes, P., Beilharz, E., Gluckman, P., & Dragunow, M. (1993). Brain-derived neurotrophic factor is induced as an immediate early gene following N-methyl-d-aspartate receptor activation. *Neuroscience*, 57(2). [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(93\)90065-N](https://doi.org/10.1016/0306-4522(93)90065-N)
- Humpel, C. (2015). Neuroscience forefront review organotypic brain slice cultures: A review. *Neuroscience*, 305. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.07.086>
- Ingolia, N. T. (2014). Ribosome profiling: new views of translation, from single codons to genome scale. *Nature Reviews Genetics*, 15(3).
- Ingolia, N. T. (2016). Ribosome Footprint Profiling of Translation throughout the Genome. *Cell*, 165(1). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.066>
- Jin, X. (2016). The role of neurogenesis during development and in the adult brain. *European Journal of Neuroscience*, 44(6). <https://doi.org/10.1111/ejn.13251>
- Jovic, D., Liang, X., Zeng, H., Lin, L., Xu, F., & Luo, Y. (2022). Single-cell RNA sequencing technologies and applications: A brief overview. *Clinical and Translational Medicine*, 12(3).
<https://doi.org/10.1002/ctm2.694>
- Kettenmann, H., & Ransom, B. R. (2013). Neuroglia. *Neuroglia*.
<https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780195152227.001.0001>
- Khalilov, I., Esclapez, M., Medina, I., Aggoun, D., Lamsa, K., Leinekugel, X., Khazipov, R., & Ben-Ari, Y. (1997). A novel in vitro preparation: The intact hippocampal formation. *Neuron*, 19(4).

[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80956-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80956-3)

- Kim, E., & Jung, H. (2015). Local protein synthesis in neuronal axons: Why and how we study. *BMB Reports*, 48(3). <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2015.48.3.010>
- Koppel, I., & Fainzilber, M. (2018). Omics approaches for subcellular translation studies. *Molecular Omics*, 14(6). <https://doi.org/10.1039/c8mo00172c>
- Kriegstein, A., & Alvarez-Buylla, A. (2009). The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annual Review of Neuroscience*, 32. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.051508.135600>
- Lee, H. G., Wheeler, M. A., & Quintana, F. J. (2022). Function and therapeutic value of astrocytes in neurological diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 21(5). <https://doi.org/10.1038/s41573-022-00390-x>
- Lee, P. R., & Fields, R. D. (2021). Activity-Dependent Gene Expression in Neurons. *Neuroscientist*, 27(4). <https://doi.org/10.1177/1073858420943515>
- Liu, J., Xu, Y., Stoleru, D., & Salic, A. (2012). Imaging protein synthesis in cells and tissues with an alkyne analog of puromycin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(2). <https://doi.org/10.1073/pnas.1111561108>
- Liu, Q. R., Walther, D., Drgon, T., Poleskaya, O., Lesnick, T. G., Strain, K. J., De Andrade, M., Bower, J. H., Maraganore, D. M., & Uhl, G. R. (2005). Human brain derived neurotrophic factor (BDNF) genes, splicing patterns, and assessments of associations with substance abuse and Parkinson's disease. *American Journal of Medical Genetics - Neuropsychiatric Genetics*, 134 B(1). <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.30109>
- Lossi, L., Alasia, S., Salio, C., & Merighi, A. (2009). Cell death and proliferation in acute slices and organotypic cultures of mammalian CNS. *Progress in Neurobiology*, 88(4). <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2009.01.002>
- Lu, B. (2003). BDNF and activity-dependent synaptic modulation. *Learning and Memory*, 10(2). <https://doi.org/10.1101/lm.54603>
- Lubetzki, C., Sol-Foulon, N., & Desmazières, A. (2020). Nodes of Ranvier during development and repair in the CNS. *Nature Reviews Neurology*, 16(8). <https://doi.org/10.1038/s41582-020-0375-x>
- Maier, T., Güell, M., & Serrano, L. (2009). Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Letters*, 583(24). <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.10.036>
- Matute-Blanch, C., Montalban, X., & Comabella, M. (2017). Multiple sclerosis, and other demyelinating and autoimmune inflammatory diseases of the central nervous system. *Handbook of Clinical Neurology*, 146. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804279-3.00005-8>
- Maurer, L. L., & Philbert, M. A. (2015). The mechanisms of neurotoxicity and the selective vulnerability of nervous system sites. *Handbook of Clinical Neurology*, 131, 61–70. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-62627-1.00005-6>
- Mehl, L. C., Manjally, A. V., Bouadi, O., Gibson, E. M., & Tay, T. L. (2022). Microglia in brain development and regeneration. *Development (Cambridge)*, 149(8). <https://doi.org/10.1242/dev.200425>

- Middlemas, D. (2007). Brain Derived Neurotrophic Factor. *XPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, 1–4. <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.61338-8>
- Miller, R. H. (2002). Regulation of oligodendrocyte development in the vertebrate CNS. *Progress in Neurobiology*, 67(6). [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(02\)00058-8](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(02)00058-8)
- Mirsky, R., Woodhoo, A., Parkinson, D. B., Arthur-Farraj, P., Bhaskaran, A., & Jessen, K. R. (2008). Novel signals controlling embryonic Schwann cell development, myelination and dedifferentiation. *Journal of the Peripheral Nervous System*, 13(2). <https://doi.org/10.1111/j.1529-8027.2008.00168.x>
- Molofsky, A. V., & Deneen, B. (2015). Astrocyte development: A Guide for the Perplexed. *GLIA*, 63(8). <https://doi.org/10.1002/glia.22836>
- Moura, D. M. S., Brennan, E. J., Brock, R., & Cocas, L. A. (2022). Neuron to Oligodendrocyte Precursor Cell Synapses: Protagonists in Oligodendrocyte Development and Myelination, and Targets for Therapeutics. *Frontiers in Neuroscience*, 15. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.779125>
- Muppirala, A. N., Limbach, L. E., Bradford, E. F., & Petersen, S. C. (2021). Schwann cell development: From neural crest to myelin sheath. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 10(5). <https://doi.org/10.1002/wdev.398>
- Ngo, J. T., Champion, J. A., Mahdavi, A., Tanrikulu, I. C., Beatty, K. E., Connor, R. E., Yoo, T. H., Dieterich, D. C., Schuman, E. M., & Tirrell, D. A. (2009). Cell-selective metabolic labeling of proteins. *Nature Chemical Biology*, 5(10). <https://doi.org/10.1038/nchembio.200>
- Pérez-González, J. A., Vara, J., & Jiménez, A. (1983). Acetylation of puromycin by *Streptomyces alboniger* the producing organism. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 113(3), 772–777. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(83\)91066-5](https://doi.org/10.1016/0006-291X(83)91066-5)
- Porter, J. N., Hewitt, R. I., Hesseltine, C. W., Krupka, G., Lowery, J. A., Wallace, W. S., Bohonos, N., & Williams, J. H. (1952). Achromycin: a new antibiotic having trypanocidal properties. *Antibiotics & Chemotherapy (Northfield, Ill.)*, 2(8).
- Preston, A. N., Cervasio, D. A., & Laughlin, S. T. (2019). Visualizing the brain's astrocytes. *Methods in Enzymology*, 622. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2019.02.006>
- Pruunsild, P., Kazantseval, A., Aid, T., Palm, K., & Timmusk, T. (2007). Dissecting the human BDNF locus: Bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters. *Genomics*, 90(3). <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2007.05.004>
- Pumo, G. M., Kitazawa, T., & Rijli, F. M. (2022). Epigenetic and Transcriptional Regulation of Spontaneous and Sensory Activity Dependent Programs During Neuronal Circuit Development. *Frontiers in Neural Circuits*, 16. <https://doi.org/10.3389/fncir.2022.911023>
- Purves, D., Augustine, G., Fitzpatrick, D., Hall, W., LaMantia, A., McNamara, J., & White, L. (2008). *Neuroscience 4th edition. 4th edition.*
- Rambani, K., Vukasinovic, J., Glezer, A., & Potter, S. M. (2009). Culturing thick brain slices: An interstitial 3D microperfusion system for enhanced viability. *Journal of Neuroscience Methods*, 180(2). <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2009.03.016>

- Rienecker, K. D. A., Poston, R. G., & Saha, R. N. (2020). Merits and Limitations of Studying Neuronal Depolarization-Dependent Processes Using Elevated External Potassium. *ASN Neuro*, 12. <https://doi.org/10.1177/1759091420974807>
- Sanz, E., Yang, L., Su, T., Morris, D. R., McKnight, G. S., & Amieux, P. S. (2009). Cell-type-specific isolation of ribosome-associated mRNA from complex tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(33). <https://doi.org/10.1073/pnas.0907143106>
- Sapkota, D., Kater, M. S. J., Sakers, K., Nygaard, K. R., Liu, Y., Koester, S. K., Fass, S. B., Lake, A. M., Khazanchi, R., Khankan, R. R., Krawczyk, M. C., Smit, A. B., Maloney, S. E., Verheijen, M. H. G., Zhang, Y., & Dougherty, J. D. (2022). Activity-dependent translation dynamically alters the proteome of the perisynaptic astrocyte process. *Cell Reports*, 41(3). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111474>
- Schmidt, E. K., Clavarino, G., Ceppi, M., & Pierre, P. (2009). SUnSET, a nonradioactive method to monitor protein synthesis. *Nature Methods*, 6(4). <https://doi.org/10.1038/nmeth.1314>
- Stone, S. E., Glenn, W. S., Hamblin, G. D., & Tirrell, D. A. (2017). Cell-selective proteomics for biological discovery. *Current Opinion in Chemical Biology*, 36. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.12.026>
- Stoppini, L., Buchs, P. A., & Muller, D. (1991). A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *Journal of Neuroscience Methods*, 37(2). [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(91\)90128-M](https://doi.org/10.1016/0165-0270(91)90128-M)
- Sundstrom, L., Morrison, B., Bradley, M., & Pringle, A. (2005). Organotypic cultures as tools for functional screening in the CNS. *Drug Discovery Today*, 10(14). [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(05\)03502-6](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(05)03502-6)
- Takahashi, T., Bhide, P. G., Goto, T., Miyama, S., & Caviness, V. S. (1999). Proliferative behavior of the murine cerebral wall in tissue culture: cell cycle kinetics and checkpoints. *Experimental Neurology*, 156(2), 407–417. <https://doi.org/10.1006/EXNR.1999.7023>
- Takamori, S. (2009). Synaptic Vesicles. *Encyclopedia of Neuroscience*, 801–808. <https://doi.org/10.1016/B978-008045046-9.01392-9>
- Thompson, M. A., Ginty, D. D., Bonni, A., & Greenberg, M. E. (1995). L-type voltage-sensitive Ca²⁺ channel activation regulates c-fos transcription at multiple levels. *Journal of Biological Chemistry*, 270(9). <https://doi.org/10.1074/jbc.270.9.4224>
- Timmusk, T., Lendahl, U., Funakoshi, H., Arenas, E., Persson, H., & Metsis, M. (1995). Identification of brain-derived neurotrophic factor promoter regions mediating tissue-specific, axotomy-, and neuronal activity-induced expression in transgenic mice. *Journal of Cell Biology*, 128(1–2). <https://doi.org/10.1083/jcb.128.1.185>
- Timmusk, T., Palm, K., Metsis, M., Reintam, T., Paalme, V., Saarma, M., & Persson, H. (1993). Multiple promoters direct tissue-specific expression of the rat BDNF gene. *Neuron*, 10(3). [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(93\)90335-O](https://doi.org/10.1016/0896-6273(93)90335-O)
- Valério-Gomes, B., Guimarães, D. M., Szczupak, D., & Lent, R. (2018). The absolute number of oligodendrocytes in the adult mouse brain. *Frontiers in Neuroanatomy*, 12. <https://doi.org/10.3389/fnana.2018.00090>

- Vara, J., Malpartida, F., Hopwood, D. A., & Jiménez, A. (1985). Cloning and expression of a puromycin N-acetyl transferase gene from *Streptomyces alboniger* in *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Gene*, *33*(2). [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(85\)90094-0](https://doi.org/10.1016/0378-1119(85)90094-0)
- Verkhatsky, A., & Butt, A. (2013). Glial Physiology and Pathophysiology. *Glial Physiology and Pathophysiology*. <https://doi.org/10.1002/9781118402061>
- Verkhatsky, A., Matteoli, M., Parpura, V., Mothet, J., & Zorec, R. (2016). Astrocytes as secretory cells of the central nervous system: idiosyncrasies of vesicular secretion. *The EMBO Journal*, *35*(3). <https://doi.org/10.15252/emj.201592705>
- Verkhatsky, A., & Nedergaard, M. (2018). Physiology of astroglia. *Physiological Reviews*, *98*(1). <https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2016>
- Vogel, C., & Marcotte, E. M. (2012). Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature Reviews Genetics*, *13*(4). <https://doi.org/10.1038/nrg3185>
- Yap, E. L., & Greenberg, M. E. (2018). Activity-Regulated Transcription: Bridging the Gap between Neural Activity and Behavior. *Neuron*, *100*(2). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.10.013>
- Zeisel, A., Hochgerner, H., Lönnerberg, P., Johnsson, A., Memic, F., van der Zwan, J., Häring, M., Braun, E., Borm, L. E., La Manno, G., Codeluppi, S., Furlan, A., Lee, K., Skene, N., Harris, K. D., Hjerling-Leffler, J., Arenas, E., Ernfors, P., Marklund, U., & Linnarsson, S. (2018). Molecular Architecture of the Mouse Nervous System. *Cell*, *174*(4). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.021>
- Zeng, H., & Sanes, J. R. (2017). Neuronal cell-type classification: Challenges, opportunities and the path forward. *Nature Reviews Neuroscience*, *18*(9). <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.85>
- Zhou, B., Zuo, Y. X., & Jiang, R. T. (2019). Astrocyte morphology: Diversity, plasticity, and role in neurological diseases. *CNS Neuroscience and Therapeutics*, *25*(6). <https://doi.org/10.1111/cns.13123>
- Zuchero, J. B., & Barres, B. A. (2015). Glia in mammalian development and disease. *Development (Cambridge)*, *142*(22). <https://doi.org/10.1242/dev.129304>
- Zukin, R. S., Jover, T., Yokota, H., Calderone, A., Simionescu, M., & Lau, C. G. (2004). Molecular and Cellular Mechanisms of Ischemia-Induced Neuronal Death. *Stroke: Pathophysiology, Diagnosis, and Management*, 829–854. <https://doi.org/10.1016/B0-44-306600-0/50049-3>

Lisa 1. *BDNF*, *BDNF* ekson IV ja *c-Fos* amplifitseerimiseks kasutatud praimerid

Tabelis on toodud RT-qPCR analüüsis *BDNF*, *BDNF* ekson IV ja *c-Fos* transkriptide amplifitseerimiseks kasutatud praimerite nimetused ja järjestused. F-täht praimerite nimetuses tähistab pärisuunalist ja R-täht vastassuunalist praimerit.

Praimeri nimetus	Järjestus 5'-3'
BDNF-total_F	GGCCAACGAAGAAAACCAT
BDNF-total_R	AGCATCACCCGGGAAGTGT
BDNF-IV_F	GCTGCCTTGATGTTTACTTTGA
BDNF-IV_R	GCAACCGAAGTATGAAATAACC
c-fos_F	GCTGACAGATACGCTCCAAG
c-fos_R	CATTGGGGATCTTGAGGCAGGTCG
GAPDH F	TGACCACCAACTGCTTAGC
GAPDH R	GGCATGGACTGTGGTCATGAC

Lisa 2. RT-qPCR Ct väärtused

Tabelites on toodud RT-qPCR analüüsiks valmistatud organotüüpsete lõikude katseloomade vanused, ajuosad, kas tegemist on kaaliumkloriidiga töödeldud või kontrollprooviga ning töötuse teostamise aeg. Iga vastava tingimuse kohta on toodud BDNF, GAPDH, BDNF ekson IV ja c-Fos transkriptide RT-qPCR analüüsil saadud keskmised Ct väärtused (kas duplikaatidest või tripliikaatidest) ja nende standardhälbed. Tähis „*“ tähistab neid Ct väärtusi, mille puhul on tegemist ühe tulemusega, mitte keskväärtusega ning „-“ tähistab seda, et standardhälvet ei olnud võimalik nende tulemuste puhul arvutada.

Vanus/ajuosa/töötlus	BDNF Ct väärtus	SD	GAPDH Ct väärtus	SD
AD HC CTR (0 DIV)	24,52	0,06	18,86	0,06
AD HC KCI (0 DIV)	24,63	0,02	18,79	0,03
AD CTX CTR (0 DIV)	27,20	0,08	20,11	0,02
AD CTX KCI (0 DIV)	27,61	0,07	20,50	0,01
E21 HC CTR (0 DIV)	25,60	0,02	18,95	0,05
E21 HC KCI (0 DIV)	25,74	0,01	18,98	0,05
E21 CTX CTR (0 DIV)	26,52	0,05	18,98	0,07
E21 CTX KCI (0 DIV)	26,07	0,01	19,55	0,03
P0 CTX CTR (2 DIV)	27,78	0,06	17,74	0,10
P0 CTX CTR (2 DIV)	28,56	0,00	18,05	0,06
P0 CTX KCI (2 DIV)	23,63	0,04	17,51	0,01
P0 CTX KCI (2 DIV)	24,41	0,04	18,02	0,03
P0 CTX CTR (7 DIV)	26,86	0,12	17,54	0,01
P0 CTX KCI (7 DIV)	25,96	0,04	17,80	0,02

Vanus/ajuosa/töötlus	BDNF ekson IV Ct väärtus	SD	c-Fos Ct väärtus	SD
E21 CTX CTR (0 DIV)	28,42	0,11	22,93	0,03
E21 CTX KCI (0 DIV)	27,59	0,02	24,20	0,02
P0 CTX CTR (2 DIV)	30,06	0,13	26,35	0,08
P0 CTX CTR (2 DIV)	33,34	0,01	23,74	0,09
P0 CTX KCI (2 DIV)	25,01*	-	23,92*	-
P0 CTX KCI (2 DIV)	27,51	0,01	22,07	0,06
P0 CTX CTR (7 DIV)	31,05	0,03	21,25	0,01
P0 CTX KCI (7 DIV)	29,10	0,09	21,55	0,01

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks¹

Mina, Liisa Loel,

1. Annan Tallinna Tehnikaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Roti aju organotüüpsete lõikude katsesüsteemi loomine aktiivsus-sõltuva transkriptsiooni ja valgusünteesi uurimiseks“,

mille juhendaja on Indrek Koppel,

1.1 reprodutseerimiseks lõputöö säilitamise ja elektroonse avaldamise eesmärgil, sh Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogusse lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2 üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tallinna Tehnikaülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogu kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. Olen teadlik, et käesoleva lihtlitsentsi punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest ning muudest õigusaktidest tulenevaid õigusi.

31.05.2023

¹ Lihtlitsents ei kehti juurdepääsupiirangu kehtivuse ajal vastavalt üliõpilase taotlusele lõputööle juurdepääsupiirangu kehtestamiseks, mis on allkirjastatud teaduskonna dekaani poolt, välja arvatud ülikooli õigus lõputööd reprodutseerida üksnes säilitamise eesmärgil. Kui lõputöö on loonud kaks või enam isikut oma ühise loomingulise tegevusega ning lõputöö kaas- või ühisautor(id) ei ole andnud lõputööd kaitsvale üliõpilasele kindlaksmääratud tähtjaks nõusolekut lõputöö reprodutseerimiseks ja avalikustamiseks vastavalt lihtlitsentsi punktidele 1.1. ja 1.2, siis lihtlitsents nimetatud tähtjaja jooksul ei kehti.