

Tartu Ülikool
Psühholoogia osakond

Grete Kadak

**KROONILISE MUUTLIKU STRESSI MÕJU GEENIEKSPRESSIOONILE
KÕRGE JA MADALA POSITIIVSE AFEKTIIVSUSEGA ROTTIDE
FRONTAALKORTEKSIS**

Seminaritöö

Juhendajad: Kadri Kõiv, Argo Vonk

Läbiv pealkiri: Geeniekspressioon HC/LC mudelis

Tartu 2013

Kokkuvõte

Kroonilise muutliku stressi mõju geeniekspressioonile kõrge ja madala positiivse afektiivsusega rottide frontaalkorteksis.

Indiviididevaheliste erinevuste uurimisel on leitud, et meeldivatele stiimulitele reageerimisel ilmnevad rottidel erinevused registreeritud 50-kHz ultrahelihäälsuste esinemissageduses. Kõrge positiivse afektiivsusega ja kõdile reageerimisel sagedasti 50-kHz häälsusi tegevad rotid (HC – *high chirping*) on kroonilise stressi tingimustes vastupidavamad, kui vähem 50-kHz häälsusi tegevad rotid (LC – *low chirping*). Võimalike indiviididevaheliste erinevuste geneetiliste faktorite hindamisel ei leitud HC/LC rottide kroonilise muutliku stressi depressioonimudelil statistiliselt olulisi erinevusi Tph2, Map1b, Add3, Eaat-2 ja Eaat-3 geenide ekspressioonis (mõõdetud RT-qPCR meetodil). Siiski langes stressi mõjul emaste loomade (kõdile reageeringut arvestamata) frontaalkorteksis Tph2 ja Eaat-3 geeni ekspressioon.

Abstract

Effect of chronic variable stress on gene expression in frontal cortex in rats with high or low positive affect.

Investigating inter-individual differences has revealed that in response to pleasurable stimuli rats differ in registered 50-kHz ultrasonic vocalization rates. Rats with high positive affect and high 50-kHz response to tickling (HC – *high chirping*) are more resistant to chronic variable stress compared to rats with low 50-kHz response to tickling (LC – *low chirping*). Assessing of possible genetic factors of inter-individual differences did not reveal statistically relevant changes in the expression of Tph2, Map1b, Add3, Eaat-2 and Eaat-3 genes in the HC/LC chronic variable stress model of depression (measured with RT-qPCR). However, chronic variable stress affected the expression of Tph2 and Eaat-3 genes in the frontal cortex of female rats (regardless of their response to tickling).

Sissejuhatus

Depressioon on levinud haigus kogu maailmas, mida põeb hinnanguliselt 350 miljonit inimest (WHO, 2012). Eestis pöördus Tervise Arengu Instituudi andmetel psühhiaatri vastuvõtule 2011. aastal ligi 9000 depressiooniga patsienti (naisi umbes kaks korda rohkem kui mehi) (Tervise Arengu Instituut, 2012). Depressioon algab sageli juba noores eas ja on korduva iseloomuga ning seetõttu on üks suurimaid töövõimetuse põhjustajaid (WHO, 2012). See on üheks põhjuseks, miks depressiooni uurimine ning uute ravimite ja ravivõtete leidmine on väga aktuaalne.

Üks võimalus depressiooni uurimiseks on haiguse mudeldamine loomadel. Mudeldamise eesmärk on loomadel esile kutsuda depressiooniga seostatavad sümptomid. Sümptomeid võib esile kutsuda kasutades erinevaid väliseid faktoreid. Nii loomadel kui ka inimestel võib selliseks väliseks stressoriks olla üks konkreetne negatiivne sündmus (inimestel näiteks lähedase kaotus) või pikaajaline suhteliselt nõrgemate stressoritega kokkupuude (inimestel tööta olek, vaesus jms). Sellistest faktoritest tingitud depressioon on näiteks mudeldatav õpitud abituse mudelis (üks tugev stressor) või kroonilise muutliku stressi mudelis (krooniline kokkupuude) (Willner, Scheel-Krüger & Belzung, 2013). Mudeli efektiivsust testitakse spetsiifiliste katsetega (nt sundujumise katse, sabast riputamine, sotsiaalne alistumine jt) (Razafsha jt, 2013), aga uuritakse ka neurobioloogilisi muutusi erinevate meetoditega (Willner, Scheel-Krüger & Belzung, 2013).

Nagu eelnevalt juba mainitud, on üheks depressiooni mudeliks kroonilise muutliku stressi (chronic variable stress–CVS) mudel, milles on katseloomad pikaajaliselt erinevate mõõdukate, kuid ettearvatute stressorite mõju all. Eesmärk on loomad viia seisundisse, mis sarnaneb depressioonis inimestel tekkiva anhedooniaga. CVS mudeli kasutamisel on leitud rida neurobioloogilisi muutusi, mis esinevad depressiooni korral ning seeläbi võib mudel olla sobivaks vahendiks avastamiseks uusi depressiooni korral häirunud süsteeme ja leidmaks uusi depressiooniravi sihtmärke (Hill jt, 2012).

Ometi ei teki stressiga kokkupuute tagajärjel kõikidel inimestel depressioon. Osad inimesed on oluliselt vastuvõtlikumad afektiivsete häirete tekkimise suhtes kui teised, see sõltub nii geneetilisest kui ka keskkonnast tingitud faktoritest. Loomadel võib eeldada sama efekti ja seega on stressi mõju uurimisel oluline mudeldada ka loomkatsetes indiviididevahelisi erinevusi (Harro, 2010).

Indiviididevaheliste erinevuste uurimisel on leitud, et meeldivatele stiimulitele

reageerimisel ilmnevad rottidel erinevused registreeritud 50-kHz ultrahelihäälitsuste esinemissageduses. Näiteks on meeldivaks stiimuliks kõditamine, sest imiteerib rottide omavahelist mängimist (Harro, 2010) ning lisaks on ärevuse ja depressiooni uurimisel rottidel ilmnenu ka kõditamise anksiolüütiline toime (Mallo jt, 2007, Popik jt, 2012). Üksikmajutuses rotipoegade igapäevasel kõditamisel kahe nädala jooksul kujuneb välja rotile iseloomulik püsiv 50-kHz häälitsuste tegemise tase. Nii võib 50-kHz häälitsuste esinemissageduse põhjal katseloomad jagada kahte tinglikku rühma: kõrgema positiivse afektiivsusega sagedasti 50-kHz häälitsusi tegevad rotid (*high-chirping*, HC) ja vähem 50-kHz häälitsusi tegevad rotid (*low-chirping*, LC), kes on madalama positiivse afektiivsusega. See erinevus võimaldab HC ja LC rottidega mudeldada indiviididevahelisi erinevusi positiivses emotsionaalsuses (Harro, 2010).

Sagedasti 50-kHz häälitsusi tegevad rotid on kroonilise stressi tingimustes vastupidavamad, kui vähem 50-kHz häälitsusi tegevad rotid (Harro, 2010; Mällo jt, 2009). HC ja LC rotte uurides on leitud, et krooniline muutlik stressi mõjutab rottide käitumist (käitumine sundujumiskatses, sukroosi tarbimine, muutused kehakaalus) ja aju oksüdatiivset metabolismi (tsütokroom c oksüdaas aktiivsus) aju erinevates osades ning leitud erinevused on sõltuvad rottide soost ning 50-kHz häälitsuste tegemisest (Mällo jt, 2009).

Samuti on leitud, et aretatud LC rotid on vähem sotsiaalsed juba varasest east alates, neid iseloomustab ka väiksem liikumisaktiivsus ja madalam agressiivsus sotsiaalse alistumise katses – need tunnused sobivad depressiooni, aga ka näiteks autismispektri häirete mudeldamiseks (Burgdorf jt, 2013). Veelgi enam, leitud on, et teatud geenid, mida seostatakse inimese autismiga, avalduvad just LC rottidel (Moskal jt, 2011).

Geeniekspressiooni määramine rottide depressioonimudelites on näidanud, et indiviididevahelised erinevused stressiga toimetulemises korreleeruvad teatud geenide ekspressiooniga (Kanarik jt, 2011) ning erinevates ajuosades, mida seostatakse meeleoluhäiretega, nagu *raphe* tuum, hipokampus ja frontaalkorteks, on geeniekspressioon paljuski kattuv või samasuunaline (Altoa jt, 2010).

Eesmärk

Antud töö eesmärgiks on saada uusi andmeid geeniekspressiooni kohta HC ja LC rottide frontaalkorteksis. Uuritakse, kas stressi rakendamine mõjutab valitud sihtmärkgeenide ekspressiooni HC ja LC loomade puhul erinevalt ning kas ilmnevad geeniekspressioonis erinevused sõltuvalt rottide soost. Nii uuritakse võimalikke süstemaatilisi muutusi ühe ja sama

signaalrajaga seotud valkude kodeerimise eest vastutavate geenide ekspressioonis, mis oleks aluseks hiljem nende valkude ekspressiooni või funktsionaalset aktiivsuse uurimiseks.

Uuritavate sihtmärkgeenide valik põhineb depressioonimudelite ülegenoomse geenikiibi uuringu tulemustel, kus mudeliteks olid kõrge ja madala uudistamisaktiivsusega loomad (Alttoa jt 2010), kroonilise sotsiaalse stressi mudel (Kanarik jt, 2011) ning PCA/stressi mudel (avaldamata andmed). Antud töö sihtmärkgeenid on valitud sama depressiooni HC/LC rottide loomumudeli hipokampuses saadud tulemustel (avaldamata andmed). Valitud sihtmärkgeenide ekspressiooni määratakse HC ja LC katseloomade ajukoos (frontaalkorteksis) kvantitatiivse reaalaja-polümeraasahelreaktsiooni (RT-qPCR) meetodiga.

Töös uuritavad geenid on toodud tabelis 1.

Tabel 1. Sihtmärkgeenid

Geeni nimetus	lühend
Trüptofaani hüdroksülaas 2	Tph2
Mikrotuubuliga seotud valk 1b	Map1b
Adutsiin 3	Add3
Erutusaminohappe transporter 2	Eaat-2
Erutusaminohappe transporter 3	Eaat-3

Meetodist tulenevate juhuslike vigade mõju vähendamiseks ja seeläbi täpsemate tulemuste saamiseks kasutati qPCR meetodiga mõõdetud suhtelist geeniekspressiooni referentsgeenide suhtes (sihtmärkgeenide suhteline ekspressioon määrati ΔC_t meetodil). Seega oli vaja määrata ka referentsgeenide ekspressioone. Referentsgeenideks valitud kandidaadid on toodud tabelis 2.

Tabel 2. Referentsgeenid

Geeni nimetus	lühend
Mikrotubuliin $\beta 2$	B2m
Tsüklofiliin A	CycA/Ppia
Hüpoksantiini fosforibosüültransferaas 1	Hprt1
Ribosoomi valk L13A	Rpl13a

Antud töö autor osales töö eksperimentaalses osa järgmistes etappides: ajukoest RNA eraldamine, RNA üldkontsentratsiooni määramine, pöördtranskriptsioon, geeniekspressiooni mõõtmine ning saadud tulemuste analüüs.

Meetod

Katseloomad

Uurimismaterjaliks on nelja kuu vanuste emaste ja isaste Wistar rottide frontaalkorteksi ajukude. Rotid eraldati pesakonnat 3 nädala vanusena ning majutati üksikult standardsetesse läbipaistavatesse polüpropüleenist puuridesse. Loomaruumis oli kontrollitud valguspimedustsükkel (valgustatud aeg 12 h) ja temperatuur (19–21 °C), loomadele tagati vaba juurdepääs veele ja toidupelletitele. Eksperimendid olid vastavuses Euroopa Nõukogu 24. novembri 1986. aasta direktiiviga 86/609/EMÜ.

Katseloomade grupeerimine kõdile reageeringu alusel

50-kHz häälotsuste esielekutsumiseks kõditati rotte kahe nädala jooksul iga päev, igale rotile tehti 2 minuti jooksul neli 15-sekundilist kõditamissessiooni ning häälotsused salvestati. Seejärel jaotati rotid kolme viimase kõditamissessiooni keskmise häälotsuste arvu alusel gruppidesse – rotid, kes teevad sagedasti 50-kHz häälotsusi (HC – high-chirping) ja rotid, kes teevad vähem 50-kHz häälotsusi (LC – low-chirping).

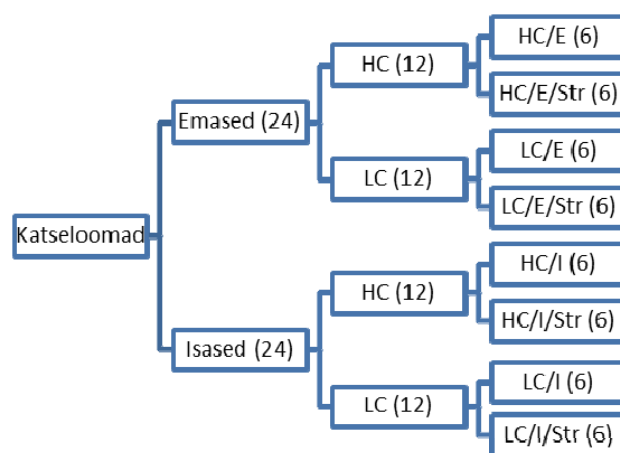
Krooniline muutlik stress (chronic variable stress – CVS)

Pärast kõditamist majutati rotid 4-kaupa ning pooltele rakendati järgneva 4 nädala jooksul kroonilist muutlikku stressi. Stressoriteks olid: stroboskoopvalgus (14 h, 10Hz, 2 lx), pesulõks sabal (5 min), puurikalle 45° (24 h), tugev valgustus oodataval pimedal ajal (900 lx), külm ruum üleöö (4 °C) ja märg allapanu (22 h), rebaseuriini lõhn üleöö ja immobilisatsioon (11X16X7 cm) (2 h). Seejärel rotid dekapiteeriti ning ajud külmutati koheselt veeldatud lämmastikus ja säilitati -80 °C juures kuni RNA eraldamiseni.

Katseloomade grupid

Pärast kõdile reageeringu alusel grupeerimist ja kroonilise muutliku stressi rakendamist oli 8 gruppi katseloomi, millest igas oli 6 looma. Nendest 24 rotti on emased (E) ning 24 on isased (I). Nii emastest kui isastest rottidest pooled ehk 12 looma kuulusid HC ja teine pool LC rottide hulka. Nendest neljast grupist pooltele ehk 6 rotile rakendati kroonilist muutlikku stressi (CVS). Nii saadi lõpuks järgnevad 8 6 katseloomaga gruppi: paljukudisevate emaste grupp (HC/E), paljukudisevate isaste grupp (HC/I), paljukudisevate emaste grupp, kellele rakendati stressi (HC/E/Str), paljukudisevate isaste grupp, kellele

rakendati stressi (HC/I/Str), vähekudisevate emaste grupp (LC/E), vähekudisevate isaste grupp (LC/I), vähekudisevate emaste grupp, kellele rakendati stressi (LC/E/Str), vähekudisevate isaste grupp, kellele rakendati stressi (LC/I/Str) (Joonis 1).



Joonis 1. Katseloomade grupid

RNA eraldamine ja pöörtranskriptsioon

RNA eraldamiseks kasutati RNeasy Midi reagentide komplekti (Qiagen) järgides tootja poolt ette antud protokoll. Frontaalkorteksi kude kaaluti ja homogeniseeriti valke denatureerivas puhvis suhtes 1:20-le (kaalruumala). Saadud homogenaat säilitati -80°C juures kuni edasiste etappide teostamiseni. RNA eraldamise päeval homogenaat sulatati ja filtreeriti läbi NucleoSpin® filtri eemaldamaks suuremad tükid homogenaadist, mis võivad segada RNA eraldamist. Filtreeritud homogenaadile lisati 1:1-le suhtes 70% etanooli, segati ning filtreeriti läbi silikageelfiltri. Seejärel pesti silikagees filtrit pesupuhvritega kolmel korral ning lõpuks eraldati seostunud RNA Dnaasi-vaba veega. Eraldatud RNA üldkontsentratsioon määrati spektrofotomeetriliselt kasutades NanoDropp 1000 aparaati (Thermo Scientific) ja säilitati -80°C juures kuni pöörtranskriptsiooni läbiviimiseni.

Pöörtranskriptsioon viidi läbi kasutades QuantiTect Reverse Transcription reagentide komplekti (Qiagen) järgides tootja poolt etteantud protokoll. RNA proovid sulatati ning võeti kuni $1\ \mu\text{g}$ RNAd sisaldav alikvoot, milles elimineeriti kõigepealt gDNA kasutades Dnaasiga töötlemist 5 min 42°C juures. Seejärel lisati pöörtranskriptaas ja juhusliku nukleotiidse järjestusega praimerid ning inkubeeriti proove 30 min 42°C juures, millele järgnes 3 minutit kuumutamist 95°C juures denatureerimaks ensüümid. Saadud cDNA-d sisaldavad proovid lahjendati 55 korda Dnaasi-vabas vees, jaotati alikvootideks ja säilitati -20°C juures kuni spetsiifiliste cDNAde kvantifitseerimiseni.

Geeniekspressiooni mõõtmine

Geeniekspressiooni kvantifitseerimise etapp rottide frontaalkorteksis teostati kvantitatiivse reaalaaja-polümeraasahelreaktsiooni (RT-qPCR) meetodiga. cDNA alikvoot (~100-kordne lõpplahjendus) sulatati ja sellele lisati cDNA spetsiifilised praimerid (lõppkonts. 250 nM) ning 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX) qPCR reagenti (Solis Biodyne). Saadud reaktsioonisegu segati ja jagati kvadruplikaatidena katseplaadile, millele lisati kattede ja tsentrifuugiti 3000xg juures 3 min. Spetsiifilise cDNA hulk kvantifitseeriti seejärel ViiA7 aparaadiga (Applied Biosystems) kasutades qPCR-i reagenti tootja poolt ettantud protseduuri. qPCRi protsessi spetsiifilisust analüüsiti amplikonide sulamistemperatuuri määramise meetodil. Kokku määrati 9 erineva geeni ekspressioon frontaalkorteksis: nendest olid 5 sihtmärkgeenid ja 4 referentsgeeni kandidaadid. Sihtmärkgeenide suhteline ekspressioon määrati ΔC_t meetodil (Livak & Schmittgen, 2001).

Referentsgeeni valimine

Määrati 4 referentsgeeni kandidaadi geeniekspressioon RT-qPCRi meetodil. Referentsgeeni kandidaadid: mikroglobuliin $\beta 2$ geen (B2m), tsüklofiilin A geen (CycA), hüpoksantiini fosforibosüültransferaasi 1 geen (Hprt1), ribosoomi valgu L13A geen (Rpl13a).

Referentsgeenide stabiilsust hinnati võrreldes rühmade keskmist lävenditsüklite standardhälvet, rühmades maksimaalse ja minimaalse lävenditsüklite arvu vahe keskmist tulemust ning suurima ja väikseima keskmisega rühma suhet. Kõikide geenide puhul eemaldati üks hälbiv geeniekspressiooni tulemus (rühmast LC/E/stress). Analüüsi tulemusel välistati referentsgeeni kandidaatidest mikroglobuliin $\beta 2$ geen. Tulemuste ülevaade on tabelis 3.

Tabel 3. Referentsi kandidaatide ekspressiooni stabiilsuse analüüs

Geen	Rühmade keskmine standardhälve	Rühmade max ja min vahe keskmine	Suurima ja väikseima keskmisega rühma suhe
B2m[*]	0,46	1,23	1,64
CycA e. Ppia	0,32	0,88	1,29
Hprt1	0,36	0,98	1,39
Rpl13a	0,23	0,64	1,20

* - referentsi arvutamiseks välja jäetud kandidaat

Andmeanalüüs

Spetsiifilise geeni ekspressiooni kirjeldav lävenditsükli väärtus määratu kasutades Applied Biosystems'i programmi ViiA7. Sihtmärkgeenide suhtelise geeniekspressiooni väärtused arvutati kasutades *Microsoft Excel*'it. Korrelatsioonanalüüsid ja T-testi analüüsid teostati *GraphPad Software GraphPad Prism* programmiga. 3-faktoriline ANOVA analüüs teostati kasutades vabavarana saadava *R* programmiga.

Tulemused

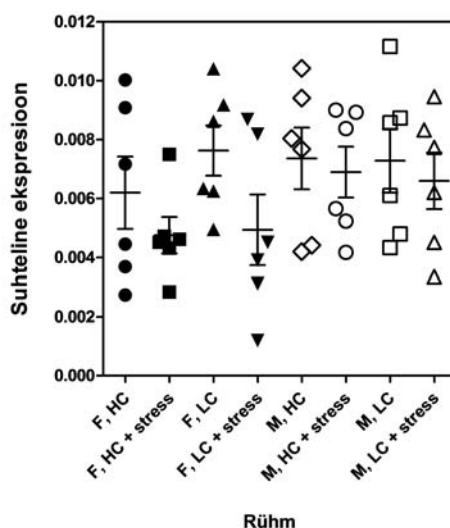
Geenide ekspressiooni korrelatsioon RNA üldkontsentratsiooni ja koe kaaluga

Korrelatsioonalanüüsiga kontrolliti, kas eraldatud RNA üldkontsentratsioon (ng/μl) on oluliselt sõltuv koe kaalust, kuid analüüs näitas et koe kaal ja RNA üldkontsentratsioon ei korreleeru omavahel (Pearsoni koefitsient 0,07, $p>0,05$). Samuti ei korreleeru ühegi mõõdetud geeni ekspressioon (lävenditsükli väärtuste põhjal) ja RNA üldkontsentratsioon (ng/μl), mille puhul jäi Pearsoni koefitsient vahemikku $-0,06$ kuni $-0,26$ (kõikidel juhtudel $p>0,05$). Samuti ei esinenud korrelatsiooni koe kaalu (mg) ja uuritavate geenide ekspressiooni (lävenditsükli väärtuste põhjal) vahel (Pearsoni koefitsendid vahemikus $-0,02$ kuni $0,08$ ja kõikidel juhtudel $p>0,05$).

Seega võib korrelatsioonalanüüsides tulemustest järeldada, et määratud geeniekspressiooni tulemused ei ole oluliselt mõjutatud koe ja RNA eraldamise etappidest.

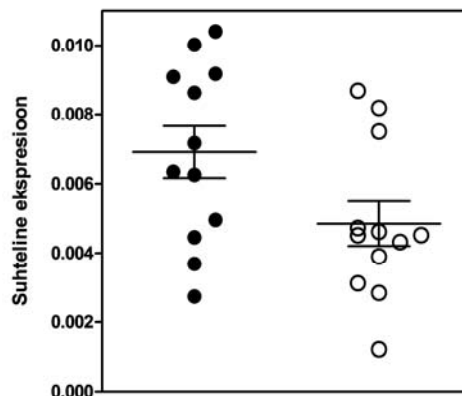
Sihtmärkgeenide suhtelise ekspressiooni tulemused

Trüptofaani hüdroksülaasi 2 geeni (Tph2) suhtelise ekspressiooni suurimad erinevused ilmnese stressi mõjul nii HC kui ka LC emaste loomade puhul (Joonis 2), kuid 3-faktorilise ANOVA analüüsi põhjal polnud need erinevused statistiliselt olulised (Tabel 4). Statistiliselt olulise lähedane tulemus esines faktori sugu ($F=2,96$; $p=0,09$) ning faktorite hääbitsus ja stress koosmõju puhul ($F=3,29$; $p=0,08$) puhul.



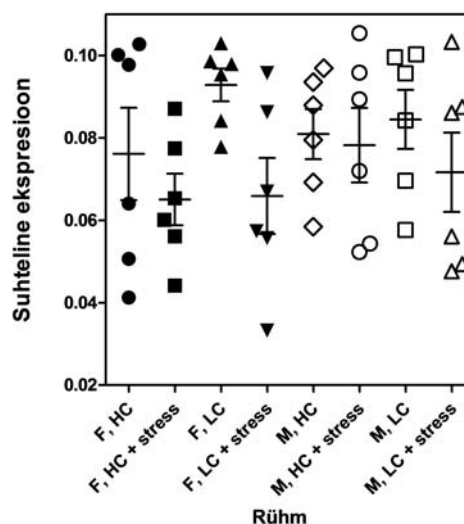
Joonis 2. Trüptofaani hüdroksülaasi 2 geeni suhteline ekspressioon 3 faktori (sugu, reageering kōdile ja stress) alusel.

Analüüsidest T-testiga ainult emaste loomade puhul stressi mõju Tph2 geeni ekspressioonile kõdile reageeringut arvestamata, ilmnes statistiliselt oluline stressi mõju (Joonis 3, Tabel 5).



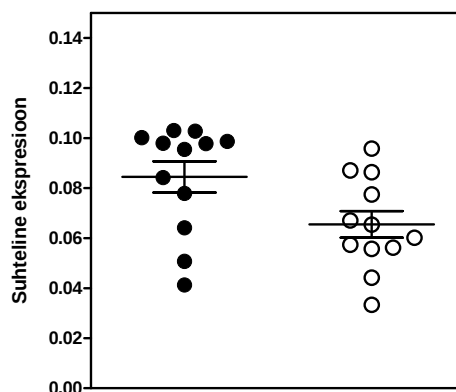
Joonis 3. Trüptofaani hüdroksülaasi 2 geeni suhtelise ekspressiooni tulemused emastel loomadel. ●- kontroll, ○- stress

Erutusaminohappe 3 (Eaat-3) geeni suhtelise ekspressiooni tulemused olid sarnased Tph2 geeni ekspressiooni tulemustele, sest ka Eaat-3 geeni ekspressiooni puhul esinesid suurimad erinevused emaste HC kui ka LC kontrolli ja stressi gruppide vahel (Joonis 4). Kuid ka antud juhul polnud need erinevused 3-faktorilise ANOVA analüüsi põhjal statistiliselt olulised (Tabel 4). Statistiliselt olulise erinevuse lähedane tulemus esines stressi faktori puhul ($F=3,51$; $p=0,07$).



Joonis 4. Erutusaminohappe transporteri 3 geeni suhteline ekspressioon 3 faktori (sugu, reageering kõdile ja stress) alusel.

Tph2 geeni ja Eaat-3 geeni puhul langes emastel stressiga mõjustatud loomadel (Joonis 4 ja 5) suhteline ekspressioon, t-testi tulemus on tabelis 5. Kokku on arvestatud kõik emased loomad sõltumata kõdile reageeringust.



Joonis 5. Erutusaminohappe transporter 3 geeni suhtelise ekspressiooni tulemused emastel loomadel. ●- kontroll, ○- stress.

Teiste geenide suhtelise ekspressiooni tulemustes (Map1b, Add3 ja Eaat-2) ei ilmnenud märgatavaid muutusi ning samuti ei näidanud 3-faktorilise ANOVA analüüs mingeid statistiliselt olulisi erinevusi (Tabel 4). Ka polnud mingeid statistiliselt olulise tulemuse lähedasi tulemusi, nii 3-faktorilise ANOVA kui ka teiste analüüside puhul.

Tabel 4. Sihtmärkgeenide suhtelise ekspressiooni 3-faktoriline ANOVA analüüsi tulemused. Esitatud on faktorite F-väärtus ja sulgudes p-väärtus.

Faktor/Geen	Tph2	Map1b	Add3	Eaat-2	Eaat-3
Häälitsus	0,29(0,60)	0,06(0,81)	1,16(0,29)	0,12(0,73)	0,07(0,80)
Sugu	2,96(0,09)	2,00(0,17)	1,88(0,18)	0,00(0,99)	0,05(0,83)
Stress	2,27(0,14)	0,03(0,87)	0,00(0,99)	1,96(0,17)	3,51(0,07)
Häälitsus/Sugu	0,87(0,36)	0,97(0,33)	0,07(0,80)	0,70(0,41)	0,76(0,39)
Häälitsus/Stress	3,29(0,08)	0,29(0,60)	1,38(0,25)	1,05(0,31)	0,91(0,35)
Sugu/Stress	0,09(0,76)	0,00(0,96)	0,71(0,40)	0,57(0,46)	1,22(0,28)
Häälitsus/Sugu/Stress	0,00(0,96)	0,12(0,73)	0,96(0,33)	0,26(0,61)	0,41(0,53)

Tabel 5. *Stressi mõju geeni ekspressioonile emastel loomadel.*

Geen	T	Df	P
Tph2	2,10	22	0,047
Eaat-3	2,33	22	0,030

Arutelu ja järeldused

Trüptofaani hüdroksülaasi 2 geen (Tph2)

Trüptofaani hüdroksülaas on serotoniini sünteesi kiirust limiteeriv ensüüm, millel on kaks isovormi: Tph1 esineb soolestikus ning Tph2 ajus (Walther jt, 2003). Tph2 on saanud uudne terapeutiline sihtmärk, sest on tugevalt seostatav stressiga seotud neuroloogiliste häirete kujunemisega. Tph2 geeni ekspressioon on väga varieeruv ning sõltub paljudest sisemistest ja välistest faktoritest (endogeensed hormoonid, bioloogiline kell, stress, antidepressandid, toitumine jt faktorid) (Chen & Miller, 2013). Oluline võib olla ka Tph2 polümorfism. Näiteks on vähenenud katalüütilise aktiivsusega Tph2 geeni isovormi ekspressiooni tõusu *raphe* tuumas seostatud depressiooni esinemisega inimestel (Haghighi jt, 2008). On leitud ka, et ravimresistentse depressiooni raskusaste võib sõltuda Tph2 geeni teatud isovormi esinemisest inimese genotüübis (Anttila jt, 2009).

Loomudelites on näiteks sotsiaalse alistumise katses esinenud mõõdukas Tph2 geeni ekspressiooni tõus rottide *raphe* tuumas, kes on varases eas kogenud ebameeldivaid sündmusi ehk rottidel, keda peetakse stressile vastuvõtlikumaks (Gardner jt, 2009). Esinenud on ka Tph2 geeni ekspressiooni langust, näiteks rottide depressioonimudelisel, mis põhineb uudistamisaktiivsusel. Madala uudistamisaktiivsuse ja kõrge ärevustasemega rottide *raphe* tuumas oli Tph2 geeni madalamalt ekspresseerunud (Alttoa jt, 2010). Seega näeme, et depressioonisümptomite korral võib esineda Tph2 geeni ekspressiooni tõus aga ka langus, seega võib sümptomite esinemine tuleneda Tph2 polümorfismist, aga ka paljudest välistest faktoritest.

Antud töös ilmses Tph2 geeni ekspressiooni oluline muutus emaste rottide puhul, kus kroonilise muutliku stressiga mõjustatud rottide frontaalkorteksis oli Tph2 geeni ekspressioon langenud võrreldes kontrollgrupi loomadega (Joonis 3). See kinnitab olemasolevaid andmeid, et Tph2 geenil on osa stressiga seotud muutuste kujunemisel. Siiski ei selgu antud töö tulemuste põhjal Tph2 geeni ekspressiooni roll HC ja LC rottide depressioonimudelisel ega selgita HC ja LC rottide stressile vastuvõtlikkuse individidevahelisi erinevuse põhjust.

Erutusaminohappe transporteri geenid (Eaat-2 ja Eaat-3)

Glutamaat on tähtsaim erutust vahendav virgatsaine, kuid omab potentsiaalset eksitotoksilist toimet. Liigse glutamaadi rakku tagasijuhtimiseks ja seeläbi neuronite kahjustuse vältimiseks on neuronite ja gliiarakkude pinnal glutamaadi transporterid ehk

erutusaminohappe transporterid (Tanaka, 2000; Zink jt, 2013). Teada on viite tüüpi glutamaadi tranportereid: Eaat-1 (GLAST) – põhiline glutamaadi transporter väikeajus, sisekõrvas, võrkkestas; Eaat-2 (GLT) – eesajus; Eaat-3 – hipokampuses, ajukoores jt ajuosades (EAAC); Eaat-4 – väikeajus Purkinje rakkudes; Eaat-5 – võrkkestas (Danbolt, 2001; Kanai & Hediger, 2003).

Depressiooni uurimisel on leitud, et erutusaminohappe transporterite geenide ekspressioon võib depressiooni korral nii tõusta (Goswami jt, 2013) kui ka langeda (Zink jt, 2013). Näiteks depressiooni õpitud abituse loomudel registreeriti abitute rottide hipokampuses ja ajukoores Eaat-2 geeni ekspressiooni langus ning selle tagajärjel halvenenud glutamaadi tagasihaaret ning kõrgeenenud ekstratsellulaarse glutamaadi taset abitutel loomadel seostati suurema vastuvõtlikkusega stressile (Zink jt, 2013).

Samas on täheldatud depressiooniga (retrospektiivne psühhiaatriline hinnang lähedaste küsitlemisel) inimeste *postmortem* uuringus prefrontaalkorteksis Eaat-3 geeni mõõdukat ekspressiooni suurenemist kui ilma depressioonita uuritavatel. Erutusaminohappe transporterite geenide ekspressiooni suurenemist seostati depressiooni patoloogiaga, täpsemalt kompensatsioonimehhanismiga, mis aitab depressiooniga tekkinud liigse glutamaadi rakku tagasi juhtida. Seeläbi väheneb glutamaadi liiast tingitud neuronite kahjustus (eksitotoksilisus) (Goswami jt, 2013). Lisaks on Eaat-3 transporterit varasemates uuringutes seostatud Huntingtoni tõve, epilepsia, isheemia, Alzheimeri tõve ja ka obsessiiv-kompulsiivse häirega (Kanai jt, 2013).

Käesolevas töös mõõdeti rottide frontaalkorteksis nii Eaat-2 ja Eaat-3 geeniekspressiooni, kuid erinevust HC ja LC rühmade vahel ei ilmnunud. Seega toetudes HC/LC kroonilise muutliku stressi depressiooni mudelile, ei saa nende geenide ekspressiooni alusel teha järeldusi stressile vastuvõtlikkuse indiviididevahelise erinevuse kohta. Statistiliselt oluline mõõdukas Eaat-3 geeni ekspressiooni langus esines aga stressiga mõjustatud emastel loomadel kõdile reageeringut arvestamata (Joonis 5). See tulemus võib viidata stressi mõjule emaste loomade glutamaadi tagasihaarde süsteemile ning spetsiifilisemalt Eaat-3 transporterite olulisusele.

Kirjandus

- Alttoa, A., Kõiv, K., Hinsley, T.H., Brass, A., Harro, J. (2010). Differential gene expression in a rat model of depression based on persistent differences in exploratory activity. *European Neuropsychopharmacology*, 20, 288–300.
- Anttila, S., Viikki, M., Huuhka, K., Huuhka, M., Huhtala, H., Rontu, R., Lehtimäki, T., Leinonen, E. (2009). Tph2 polymorphism may modify clinical picture in treatment-resistant depression. *Neuroscience Letters*, 464, 43–46.
- Burgdorf, J., Moskal, J.R., Brudzynski, S.M., Panksepp, J. (2013). Rats selectively bred for low levels play-induced 50 kHz vocalizations as a model for Autism Spectrum Disorders: A role for NMDA receptors. *Behavioural Brain Research*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2013.04.022>
- Chen, G-L., Miller, G.M. (2013). Tryptophan hydroxylase-2: An emerging therapeutic target for stress disorders. *Biochemical Pharmacology*, 85, 1227–1233.
- Danbolt, N.C. (2001). Glutamate uptake. *Progress in Neurobiology*, 65, 1–105.
- Gardner, K.L., Hale, M.W., Oldfield, S., Lightman, S.L., Plotsky, P.M., Lowry, C.A. (2009). Adverse experience during early life and adulthood interact to elevate Tph2 mRNA expression in serotonergic neurons within the dorsal raphe nucleus. *Neuroscience*, 163, 991–1001.
- Goswami, D.B, Jernigan, C.S., Chandran, A., Iyo, A.H., May, W.L., Austin, M.C, Stockmeier, C.A, Karolewicz, B. (2013). Gene expression analysis of novel genes in the prefrontal cortex of major depressive disorder subjects. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 43, 126–133.
- Haghighi, F., Bach-Mizrachi, H., Huang, Y.Y., Arango, V., Dwork, A.J., Rosoklija, G., Sheng, H.T., Morozova, I., Ju, J., Russo, J.J., Mann, J.J. (2008). Genetic architecture of the human tryptophan hydroxylase 2 Gene: existence of neural isoforms and relevance for major depression. *Molecular Psychiatry*, 13, 813–820.
- Harro, J. (2010). Inter-individual differences in neurobiology as vulnerability factors for affective disorders: Implications for psychopharmacology. *Pharmacology & Therapeutics*, 125 (3), 492–422.
- Hill, M.N., Hellemans, K.G.C., Verma, P., Gorzalka, B.B., Weinberg, J. (2012). Neurobiology of chronic mild stress: Parallels to major depression. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 36, 2085–2117.

- Kanai, Y., Cl  men  on, B., Simonin, A., Leuenberger, M., Lochner, M., Weisstanner, M., Hediger, M.A. (2013). The SLC1 high-affinity glutamate and neutral amino acid transporter family. *Molecular Aspects of Medicine*, 34, 108–120.
- Kanai, Y., Hediger, M.A. (2003). The glutamate and neutral amino acid transporter family: physiological and pharmacological implications. *European Journal of Pharmacology*, 479, 237–247.
- Kanarik, M., Altho, A., Matrov, D., K  iv, K., Sharp, T., Panksepp, J., Harro, J. (2011). Brain responses to chronic social defeat stress: Effects on regional oxidative metabolism as a function of a hedonic trait, and gene expression in susceptible and resilient rats. *European Neuropsychopharmacology*, 21, 92–107.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. *Methods*, 25, 402–408.
- M  llo, T., Matrov, D., Herm, L., K  iv, K., Eller, M., Rinken, A., Harro, J. (2007). Tickling-induced 50-kHz ultrasonic vocalization is individually stable and predicts behaviour in tests of anxiety and depression in rats. *Behavioural Brain Research*, 184, 57–71.
- M  llo, T., Matrov, D., K  ik, K., Harro, J. (2009). Effect of chronic stress on behaviour and cerebral oxidative metabolism in rats with high or low positive affect. *Neuroscience*, 164, 963–974.
- Popik, P., Potasiewicz, A., Pluta, H., Zieniewicz, A. (2012). High-frequency ultrasonic vocalizations in rats in response to tickling: The effects of restraint stress. *Behavioural Brain Research*, 234, 223–227.
- Razafsha, M., Behforuzi, H., Harati, H., Wafai, R.A.L., Khaku, A., Mpndello, S., Gold, M.S., Kobeissy, F.H. (2013). An updated overview of animal models in neuropsychiatry. *Neuroscience*, 240, 204–218.
- Tanaka, K. (2000). Functions of glutamate transporters in the brain. *Neuroscience Research*, 37, 15–19.
- Tervise Arengu Instituut. (2012) Psühhiaatri poolt ambulatoorselt konsulteeritud isikud diagnoosi, soo ja vanusr  hma järgi. *Tervisestatistika ja terviseuuringute andmebaas*, <http://pxweb.tai.ee/esf/pxweb2008/Database/Haigestumus/05Psyyhika-%20ja%20kaitumishaired/05Psyyhika-%20ja%20kaitumishaired.asp> (13.05.2013)
- Walther, D.J., Peter, J.U., Bashammakh, S., Hortnagl, H., Voits, M., Fink, H., Bader, M. (2003). Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science*, 299, 76.

- Willner, P., Scheel-Krüger, J., Belzung, C. (2013). The neurobiology of depression and antidepressant action. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2012.12.007>
- World Health Organization. (2012.) Depression: A Global Public Health Concern. http://www.who.int/mental_health/management/depression/who_paper_depression_wf_mh_2012.pdf, allalaetud 13.05.2013
- Zink, M., Vollmayr, B., Gebicke-Haerter, P.J, Henn, F.A. (2010). Reduced expression of glutamate transporters vGluT1, Eaata-2 and Eaata-4 in learned helpless rats, an animal model of depression. *Neuropharmacology*, 58, 465–473.

Käesolevaga kinnitan, et olen korrektselt viidanud kõigile oma töös kasutatud teiste autorite poolt loodud kirjalikele töödele, lausetele, mõtetele, ideedele või andmetele.

Olen nõus oma töö avaldamisega Tartu Ülikooli digitaalarhiivis DSpace.

Grete Kadak