

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

**Egf perekonna ligandide ja ErbB perekonna retseptorite ekspressioon hiire keskajus**

Bakalaureusetöö  
12 EAP

Keith Kukkela

Juhendajad  
PhD Annely Lorents  
MSc Taavi Vanaveski

TARTU 2018

## INFOLEHT

### **Egf perekonna ligandide ja ErbB perekonna retseptorite ekspressioon hiire keskajus**

Egf perekonna ligandid stimuleerivad läbi ErbB perekonna retseptorite rakukasvu ja diferentseerumist. Egf omab keskajus dopaminergiliste neuronite suhtes elulemust suurendavat mõju. Nii dopaminergiliste süsteemide häireid kui ka Egf perekonna ekspressiooni muutusi seostatakse nii psühhoosi kui ka skisofreeniaga. Käesolevas töös uuritakse 11 geeni ekspressioonitaset kahe hiireliini, B16 ja 129Sv keskajus, kasutades amfetamiini poolt indutseeritud psühhoosilaadset loomudelit. Uuritavad geenid on *ErbB1-4*, *Egf*, *HbEgf*, *Nrg1-3*, *Tgfa* ja *D2*. Tulemustest selgus, et amfetamiini saanud gruppides on mõlemas hiireliinis tõusnud Egf ning 129Sv hiireliinis ka ErbB2-e ekspressioon. Tööst järeldub, et nende geenide kompensatoorne ülesreguleerimine võib aidata neuronitel toime tulla amfetamiini manustamisest tingitud neurotoksilisusega ning tegemist võib olla skisofreenia diagnoosiks sobilike markeritega.

Märksõnad: indutseeritud psühhoos, ErbB retseptorid, EGF perekond, geeniekspressioon  
CERCS: B470 Füsioloogia

### **Expression of Egf family of ligands and ErbB family of receptors in mouse midbrain**

Ligands of the Egf family stimulate cell growth and differentiation through the ErbB family of receptors. Egf has a neurotrophic and a proliferating effect on dopaminergic neurons in the midbrain. Dysfunctions in dopaminergic pathways and changes in Egf expression levels are both tied to psychosis and schizophrenia. The expression level of 11 genes in two strains of mice, B16 and 129Sv, were examined in this work using the amphetamine-induced animal model of psychosis. The genes examined are *ErbB1-4*, *Egf*, *HbEgf*, *Nrg1-3*, *Tgfa* and *D2*. Results showed that in both mouse strains Egf expression had increased in the amphetamine groups, in 129Sv the expression of ErbB2 had also increased. From this work it can be concluded that the increased compensatory upregulation of these genes could help neurons to cope with the neurotoxicity resulting from amphetamine administration, and these genes could be suitable diagnostic markers for schizophrenia.

Keywords: induced psychosis, ErbB receptors, EGF family, gene expression  
CERCS: B470 Physiology

## SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	8
1.1. Skisofreenia	8
1.1.1. Haiguse iseloomustus	8
1.1.2. Psühhoos ja skisofreenia	9
1.1.3. Psühhoos ja amfetamiin	10
1.2. Keskaju	11
1.2.1. Ehitus	11
1.2.2. <i>Substantia nigra</i> ehk mustaine ja nigrostriataalne rada	12
1.2.3. Ventraalne tegmentaalne ala ja mesolimbiline ning mesokortikaalne rada	13
1.3. Dopamiini retseptorid	15
1.3.1. Tüübid	15
1.3.2. D <sub>2</sub> retseptori düsfunktsioonid skisofreenias	15
1.3.3. Antipsühhootikumide toime	16
1.4. ErbB retseptorite perekond	16
1.4.1. ErbB retseptorid	16
1.4.2. ErbB retseptorite ligandid	18
1.5. Loommudel	20
1.5.2. Psühhoosi loommudel	20
1.5.4. Loommudeli manipulatsioonid	21
2. EKSPERIMENTAALOSA / UURIMUS	22
2.1. Töö eesmärgid	22
2.2. Materjal ja meetodika	23
2.2.1. Katseloomad	23
2.2.2. Koeproovid	24
2.2.3. RNA eraldamine	24
2.2.4. Dnaasi I töötlus	25

2.2.5. cDNA süntees	25
2.2.6. qPCR	25
2.2.7. Andmete statistiline analüüs	26
2.3. Tulemused ja arutelu	27
2.3.1. Tulemused	27
KOKKUVÕTE	34
RESÜMEE/SUMMARY	36
TÄNUAVALDUSED	37
KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU	38
LIHTLITSENTS	54

## KASUTATUD LÜHENDID

129Sv – 129S6/SvEvTac hiireliin

AK – akuutne katsegrupp

B16 – C57BL/6Ntac hiireliin

BTC – beetatselluliin (ingl *betacellulin*)

KR – krooniline katsegrupp

D<sub>1-5</sub> – dopamiini retseptor 1-5 (ingl *dopamine receptor 1-5*)

D<sub>2</sub>Lh – dopamiini retseptor 2 pikk variant (ingl *dopamine receptor 2, long form*)

D<sub>2</sub>Sh – dopamiini retseptor 2 lühike variant (ingl *dopamine receptor 2, short form*)

DA – dopamiin (ingl *dopamine*)

DSM-V – vaimsete häirete diagnostiline ja statistiline käsiraamat, viies väljaanne

EGF – epidermaalne kasvufaktor (ingl *epidermal growth factor*)

EGFR – epidermaalse kasvufaktori retseptor (ingl *epidermal growth factor receptor*)

ErbB – retseptor-türosiinkinaas ErbB (ingl *ErbB receptor tyrosine kinase*)

HB-EGF – hepariini-siduv epidermaalne kasvufaktor (ingl *heparin-binding EGF-like growth factor*)

Hprt – hüpoksantiin-guaaniin fosforibosüültransferaas (ingl *hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*)

ICD-10 – rahvusvaheline haiguste ja nendega seotud terviseprobleemide statistiline klassifikatsioon, kümnes väljaanne

NRG – neureguliin (ingl *neuregulin*)

PPI – prepulsi inhibeerimine (ingl *prepulse inhibition*)

RTK – retseptor-türosiinkinaas (ingl *receptor tyrosine kinase*)

SAL – kontrollgrupp

SN – mustaine (ladn *substantia nigra*)

TGF- $\alpha$  – transformeeriv kasvufaktor alfa (ingl *transforming growth factor alpha*)

VTA – ventraalne tegmentaalne ala (ladn *area tegmentalis ventralis*)

## SISSEJUHATUS

“A thought, even a possibility, can shatter and transform us.”

— Friedrich Nietzsche

Antud tsitaat iseloomustab hästi skisofreeniahaigete maailmapilti. Nende jaoks on normaalne mõttetegevus killustunud. Esinevad positiivsed sümptomid nagu luulumõtted ja hallutsinatsioonid segavad igapäevaseid toiminguid, negatiivsed sümptomid nagu anhedoonia ja depressioon võtavad ära huvi tegutseda ning ühiskonnas kaasa lüüa. Lisaks, takistab kognitiivne defitsiit skisofreeniahaigetel oma probleemidega toime tulekut. Haiguse diagnoosiga inimeste seas on ka enesetappude arv mitmekordistunud, mis rõhutab veelgi kui võrd invaliidistava haigusega on tegemist.

Tänaseks on skisofreenia kui haiguse esmamainimisest möödunud juba üle sajandi, kuid seni leitud ravimid ehk antipsühhootikumid kontrollivad ainult sümptomeid, peamiselt positiivseid. Tuvastatud on mitmeid haigusega seotud riskigeene, nende seas *Disc1* ja *Nrg1*. Samas täpne arusaam nende geenide rollist jääb ikka veel arusaamatuks ning vajab täiendavaid uuringuid haiguse molekulaarsete mehhanismide välja selgitamiseks. Üks seni formuleeritud hüpotees käsitleb düsfunktsionaalset dopamiini (DA) regulatsiooni, mis on leidnud kandepinda just tänu antipsühhootikumide positiivseid sümptomeid leevendavale mõjule, blokeerides enamasti D2 dopamiini retseptori (DRD2). Kuna peamised dopamiini sünteesi ja signaaliedastusega seotud rajad asuvad keskajus keskendub ka käesolev töö just keskajule.

Käesolev uurimus põhineb amfetamiini poolt indutseeritud psühhoosi loomudelil. Kasutati kahte hiireliini, B16 ja 129Sv. Mõlemad hiireliinid jaotati kolme eraldi uuringugruppi: akuutne, krooniline ja kontroll. Katseperioodi lõpus eraldati hiirte keskaju ning analüüsiti qPCR-i meetodil geeniekspressiooni. Antud töös analüüsiti 12 geeni ekspressiooni keskajus. Uuritavad geenid on seotud nii EGF-perekonna ligandide ja nende retseptorite kui ka dopaminergiliste radadega.

Käesolev töö teostati Tartu Ülikooli meditsiiniteaduste valdkonna Bio- ja siirdemeditsiini instituudi füsioloogia osakonnas.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1. Skisofreenia

### 1.1.1. Haiguse iseloomustus

Skisofreenia on raskeloomuline neuropsühhiaatiline häire, mis on märkimisväärseks koormaks ühiskonnale. Haigus esineb 0.3 - 0.66% populatsioonist. Uusi juhtumeid diagnoositakse 10.2 - 22.0 100 000 inimese kohta aastas. Samas võivad esinemissagedused märkimisväärselt erineda, sõltudes skisofreenia diagnostilistest kriteeriumitest (van Os ja Kapur, 2009). Skisofreenia sümptomeid jaotatakse positiivseteks ja negatiivseteks (Picchioni ja Murray, 2007). Positiivsed ehk aditiivsed sümptomid ei esine tervel inimesel, kuid on olemas haigel (Kay *et al.*, 1987). Negatiivsed sümptomid kujutavad üldiselt häiritud ja puudulikke tunnuseid võrreldes terve inimesega (Buchanan, 2007). Lisaks positiivsete ja negatiivsete sümptomite eristatakse veel kognitiivset düsfunktsiooni, mis väljendub tähelepanu, õppimisvõime, verbaalse väljendusoskuse ja mälu defitsiidina (Bowie ja Harvey, 2006). Haigete eluiga on 15 kuni 25 aastat lühem võrreldes elanikkonna keskmisega (Wildgust *et al.*, 2010). Kõrgem suremus ei tulene otseselt haigusest, vaid sellega kaasnevatest elustiili muutustest, mis viivad südame-veresoonkonna haiguste või metaboolse sündroomi kujunemiseni (Catts V. S. *et al.*, 2008; Koivukangas *et al.*, 2010; Mitchell *et al.*, 2013). Haigete seas on oluliselt tõusnud ka enesetappude arv, mis on tingitud halvenenud sotsiaalsest positsioonist ja vaimsest seisundist (Siris, 2001).

Skisofreenia diagnoos on määratletud sündroomina (Carpenter, 2007). Sündroom on rühm haigustunnuseid, mis esinevad koos ja iseloomustavad teatud kõrvalekallet või seisundit. Kuigi skisofreeniat käsitleti ajalooliselt funktsionaalse häirena, on nüüdseks selgunud, et haigusega on seotud ka teatud struktuursed muutused ajus (Tyrer ja Mackay, 1986; Karlsgodt *et al.*, 2010). Samas ei põhine diagnoos patoloogial nagu näiteks isheemilise insuldi või südameinfarkti korral, vaid kliiniliste sümptomite kooslusel (Chan, 2017). Skisofreenia diagnoosimiseks kasutatakse peamiselt kahte diagnostilist süsteemi: ICD-10 (Rahvusvaheline haiguste ja nendega seotud terviseprobleemide statistiline klassifikatsioon, kümnes väljaanne) ja DSM-V (Vaimsete häirete diagnostiline ja statistiline käsiraamat, viies väljaanne). Mõlemas on esitatud sümptomite nimekiri ja nõue, kui mitu sümptomit peab mingi aja jooksul esinema enne haiguse lõplikku diagnoosimist (American Psychiatric Association. *et al.*, 2013; World Health Organization., 1992)



Skisofreenia sümptomite rohkuse tõttu võib esineda olukord, kus kaks eri patsienti on skisofreenia diagnoosiga, kuigi neil ei esine ühtegi ühist sümptomit. Näiteks vastavalt DSM-Vle võib haiguse diagnoosida nii pettekujutelmade ja hallutsinatsioonidega patsiendil, kui ka patsiendil, kellel esineb ebakorrapärane kõne ja negatiivsed sümptomid (American Psychiatric Association. *et al.*, 2013). Kuigi mõlemad hüpoteetilised patsiendid on oma kliinilistes esitustes vaieldamatult erinevad, saab mõlemale patsiendile osaks sama diagnoos. Teisisõnu võib skisofreenia väljenduda täiesti erinevate kliiniliste fenotüüpidenä. Seetõttu on haigust põhjustavad erinevad patofüsioloogilised mehhanismid hõlmatud laialdase skisofreenia mõistega (Jablensky, 2010). Selge on see, et selline heterogeensus kujutab endast olulist väljakutset häire neurobioloogiliste aluste välja selgitamisel.

### **1.1.2. Psühhoos ja skisofreenia**

Skisofreenia on üks psühhootilistest häiretest, see tähendab haigust iseloomustab psühhootiliste sümptomite esinemine. ICD-10ne kohaselt kuuluvad psühhootiliste häirete alla skisofreenia (F20), skisotüüpne häire (F21), püsivad luululised häired (F22), äge mööduv psühhootiline episood (F23), indutseeritud luululine häire (F24) ja skisoafektiivne häire (F25). Neid kõiki iseloomustab psühhootiliste sümptomite esinemine haiguse vältel (World Health Organization., 1992). Psühhoosi ja selle sümptomeid võivad põhjustada ka mitmed teised seisundid ja ained nagu bipolaarne häire, magamatus, stress, ajukahjustus, teatud ained, alkohol, kannabinooidid (Dunayevich ja Keck, 2000; Petrovsky *et al.*, 2014; Gaebel ja Zielasek, 2015). Olemuselt on psühhoos raskeloomuline psüühikahäire (Gonzalez Vazquez *et al.*, 2017), mis mõjutab ajutegevust, põhjustab seosetuid mõtteid, pettekujutemasid ja hallutsinatsioone (Arciniegas, 2015; Gaebel ja Zielasek, 2015).

Psühhootilisi sümptomeid liigitatakse tavaliselt positiivseteks ja negatiivseteks. Peamised positiivsed sümptomid on pettekujutelmad ja hallutsinatsioonid, ebakorrapärane mõtlemine. Pettekujutelmad on valeuskumused, näiteks haige veendumus, et keegi plaanib midagi tema vastu või nt telerist saadetakse talle salajasi sõnumeid. Hallutsinatsioonid on sensoorsed valearusaamad, häiritud reaalsustaju, näiteks häälte kuulmine, asjade, mida tegelikult ei eksisteeri, nägemine või tunnetamine. Peamised negatiivsed sümptomid on vähenenud kõne, antisotsiaalsus, emotsionaalne nürisus ja anhedoonia. (Kay *et al.*, 1987; Schultz *et al.*, 2007) Skisofreenial esineb tavaliselt prodromaalne ehk haiguse eelne staadium, mida sageli iseloomustab isiku enesega toimetuleku halvenemine. Raskused võivad ilmnedä mälu- ja tähelepanuprobleemidena, sotsiaalsete probleemidena, ebatavalise ja seosetu käitumisena. Lisaks võib esineda veel hallutsinatsioone, millega kaasnevad veidrad ideed, halvenenud

hügieen ja vähenenud huvi igapäevaste tegevuste vastu. Prodromaalsele staadiumile järgneb sageli positiivsete sümptomitega akuutne faas. Kui akuutsed probleemid lahenevad, tavaliselt pärast mõneajalist ravi, võivad ka positiivsed sümptomid kaduda või väheneda. Sageli jäävad püsivalt problemaatiliseks negatiivsed sümptomid (National Institute for Health and Care Excellence (UK), 2014; Larson *et al.*, 2010)

### **1.1.3. Psühhoos ja amfetamiin**

Psühhootiliste seisundite ja häirete tekitamise või süvenemisega seostatakse mitmeid psühhoaktiivseid aineid (Moore *et al.*, 2007; Callaghan *et al.*, 2012). Sagedased psühhootiliste sümptomite indutseerijad on amfetamiin ja selle teisendid, samuti teatud teised dopamiini tagasihaarde inhibiitorid nagu näiteks kokaiin (Brady *et al.*, 1991; Janowsky ja Risch, 1979). Amfetamiin ja amfetamiinide klassi kuuluvad ravimid põhjustavad psühhoosi, kui neid kasutada krooniliselt või suurtes annustes (Glasner-Edwards *et al.*, 2008). Uuringus, milles osales 309 metamfetamiini (amfetamiini analoog) pidevat kasutajat, leiti et nende seas esines psühhoos 11 korda sagedamini kui üldises populatsioonis (McKetin *et al.*, 2006). Stimulantidest sõltuvuses olevad isikud tarbivad tihtipeale just metamfetamiini, mis on lihtsamini kättesaadav ja tugevama efektiga kui amfetamiin, kuid üldjoontes on mõju sarnane (Goodwin *et al.*, 2009; McKetin *et al.*, 2006).

Teatud ajupiirkondades suurendab amfetamiin dopamiini kontsentratsiooni sünaptilises pilus. Amfetamiin siseneb presünaptilisse neuronisse kas dopamiini transporterite kaudu või otse läbi neuroni membraani difundeerudes. Dopamiini transporterisse sisenemise tagajärjel tekitab amfetamiin konkureerivat absorptsiooni inhibitsiooni dopamiini suhtes ehk takistab dopamiinil transporteriga seondumist. Dopamiini transporterite funktsioon on dopamiini reabsorptsioon sünaptilisest pilust. Presünaptilises neuronis aktiveerib amfetamiin teatud signaalraja, mis viib dopamiini transporterite fosforüülimiseni, mille tulemusena toimub dopamiini vool sünaptilisse pilusse (Calipari ja Ferris, 2013; Johnson *et al.*, 2005). Seega amfetamiin indutseerib dopamiini väljavoolu transporterist ning blokeerib ka reabsorptsiooni.

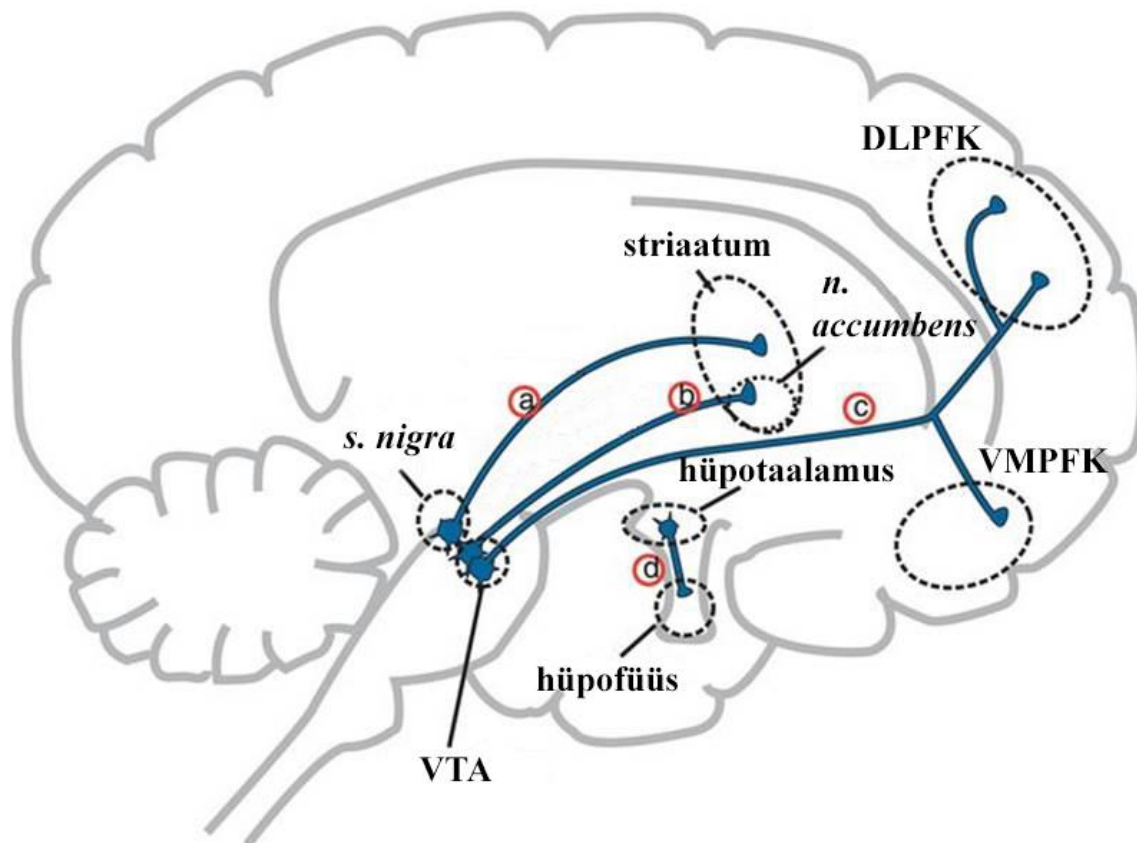
Stimulant-indutseeritud psühhoosi sümptomid varieeruvad sõltuvalt tarbitud ainest, kuid reeglina on väga sarnased skisofreenia omadega (Jönsson ja Sjöström, 1970). Tavaliselt esinevad sellised sümptomid nagu hallutsinatsioonid, meelepetted ja paranoia. Kognitiivsed häired on pigem haruldased (Bell, 1973). Varasemalt on leitud, et metamfetamiini-psühhoosi ja skisofreeniahaigete psühhoosi sümptomid ja nende ägedus on praktiliselt samad (Srisurapanont *et al.*, 2011). Seega on pakutud välja amfetamiin-indutseeritud psühhoosi

model (Hermens *et al.*, 2009; Snyder, 1973). See farmakoloogiline psühhoosi mudel põhineb suure osas just amfetamiini efektil dopamiini süsteemidele ajus (Robinson ja Becker, 1986; Featherstone *et al.*, 2007). Dopamiini süsteemid ehk dopaminergilised rajad on projektsioonineuronid ajus, mis sünteesivad ja vabastavad dopamiini. Enamus kesknärvisüsteemi DA neuronitest asub just keskajus (Tritsch and Sabatini, 2012; Speed, 2010).

## **1.2. Keskaju**

### **1.2.1. Ehitus**

Keskaju on kesknärvisüsteemi osa, mis asub peaaegu ja on väikseim osa ajutüvest. Kaudaalselt ühendub see tagaaju (*metencephalon*), ajusilla (*pons*) ja rostraalselt vaheajuga (*diencephalon*). Keskaju peamised osad on kaks suurajuvart (*pedunculi cerebri*), keskajukatus (*tectum mesencephali*), keskajukatend (*tegmentum mesencephali*), Sylviuse juha (*aqueductus mesencephali (cerebri)*), nelikkeha (*corpora quadrigemina*) ja mustaine (*substantia nigra*) (SN). Keskaju on seotud selliste funktsioonidega nagu nägemine, kuulmine, motoorne kontroll, uni ja ärkvelolek, erutus ning temperatuuri regulatsioon. Keskaju ventraalsest tegmentaalsest alast ja mustainest saavad alguse kolm neljast peamisest dopaminergilisest rajast: mesolimbiline, mesokortikaalne ja nigrostriataalne (Ruchalski ja Hathout, 2012; Bissonette ja Roesch, 2016).



**Joonis 1.** Dopaminergilised rajad ajus ja nende poolt innerveeritavad alad: a - nigrostriataalne rada, b - mesolimbiline rada, c - mesokortikaalne rada, d - tuberoinfundibulaarne rada (Vaughan ja Asbury, 2008 alusel)

### 1.2.2. *Substantia nigra* ehk mustaine ja nigrostriataalne rada

Keskaju ventraalses osas asub mustaine (*substantia nigra*), üks basaalganglionitest (Ruchalski ja Hathout, 2012). Basaalganglionid on suuraju allosas subkortikaalselt paiknevad hallainelised tuumad, mis on tihedalt seotud korteksi, ajutüve ja mitmete teiste ajupiirkondadega (Clarençon *et al.*, 2017; Lanciego *et al.*, 2012). Mustaine nimetus tuleneb sellest, et see sisaldab kõrgel tasemel dopamiinergilistes neuronites esinevat tumedat pigmenti neuromelaniini (Zecca *et al.*, 2001). Mustaine on jaotunud vasakuks ja paremaks piirkonnaks vastavates ajupoolkerades. Funktsionaalselt jaotub mustaine samuti kaheks. *Substantia nigra pars reticulata* (SNr), mis sisaldab peamiselt GABAergilisi neuroneid ja on väljundiks basaalganglionitest tulevatele signaalidele, edastades neid teistele ajuosadele ning *Substantia nigra pars compacta* (SNc), mis sisaldab peamiselt dopaminergilisi neuroneid ja on sisendiks basaalganglionitele, edastades dopamiini striatumisse (Zhou ja Lee, 2011). SNc-st saab alguse nigrostriataalne dopamiinirada (Tritsch ja Sabatini, 2012).

Nigrostriataalne rada ühendab SNC-d dorsaalse striatumiga (Menegas *et al.*, 2015). Selle raja dopamiinergiliste neuronite sünapsid projekteeruvad GABAergilistele inhibitoorsetele neuronitele dorsaalses striatumis (Watabe-Uchida *et al.*, 2012). Antud alas jaotuvad GABAergilised neuronid dopamiini retseptor 1 (D<sub>1</sub>) tüüpi ja dopamiini retseptor 2 (D<sub>2</sub>) tüüpi neuroniteks (Gagnon *et al.*, 2017). Häireid nigrostriataalses rajas on seostatud skisofreeniaga (Kuepper *et al.*, 2012). Tomograafilistes uuringutes on leitud, et skisofreeniahaigetes indutseerib amfetamiin võrreldes tervete kontrollgrupiga suurenenud dopamiini vabastamist striatumis (Nakao, 2017). Täpsemalt just dorsaalse striatumi *nucleus caudatus*'e ja putameni rostraalsetes osades. Limbilises ehk ventraalses striatumis oli efekt tunduvalt väiksem kui dorsaalses striatumis (Fusar-Poli ja Meyer-Lindenberg, 2013; Weinstein *et al.*, 2017). Ka on leitud, et nigrostriataalse raja funktsionaalne ühenduvus on positiivses korrelatsioonis psühhoosi tugevusega (Yoon *et al.*, 2014). Kui varasemalt seostati skisofreenia positiivsete sümptomitega seotud striataalset hüperdopaminergiat peamiselt mesolimbilise rajaga, siis nüüd on hakatud nigrostriataalset rada pidama isegi rohkem häirituks (Kuepper *et al.*, 2012).

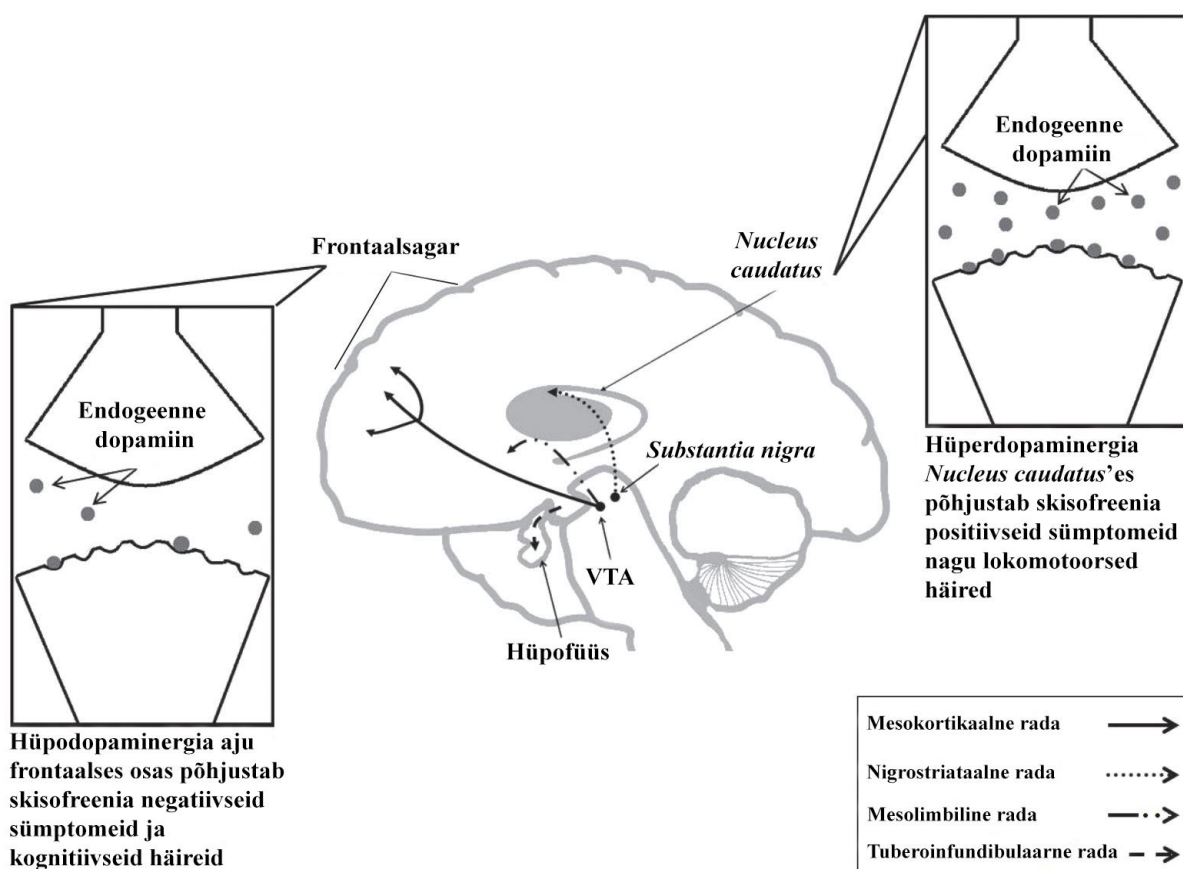
### **1.2.3. Ventraalne tegmentaalne ala ja mesolimbiline ning mesokortikaalne rada**

Ventraalne tegmentaalne ala (VTA) ehk *area tegmentalis ventralis* ehk kõhtmine katendiala on rühm neuroneid, mis asuvad ventraalselt keskaju katendist, mediaalselt *substantia nigra* 'st, keskaju kesktasandil. VTA peamised funktsioonid on seotud selliste protsesside reguleerimisega nagu kognitsioon, motivatsioon, emotsioonid, tasu (*reward*) saamine (Miller, 2000). VTA neuronid projekteeruvad paljudesse ajupiirkondadesse, millest olulised projektsioonialad on prefrontaalne ajukoor ja ajuvarred (Han *et al.*, 2017; Swanson, 1982). VTAs on peamiselt dopamiinergilised neuronid (Johnson ja North, 1992). VTA on mesokortikolimbiliste dopamiiniradade dopamiinergiliste rakukehade alguspunkt (Zimmer *et al.*, 2002). Nende kahe raja häired on seotud skisofreeniaga (Alves *et al.*, 2008)

Mesolimbiline rada on dopamiinergiliste neuronite kogum, mis projekteerub VTAST *nucleus accumbens*i ja *tuberculum olfactoriumi*, mis asuvad ventraalses striatumis. Mesolimbiline rada reguleerib muu hulgas ihalduskäitumist (*incentive salience*), motivatsiooni, hirmu ja kinnistavat õppimist ning võib mängida rolli ka mõnutunde tajumisel. Skisofreeniaga seostatakse mesolimbilise raja hüperdopaminergiat (Walter *et al.*, 2009). Skisofreeniahaigete *post mortem* ajukoe analüüsis on leitud, et DA kontsentratsioon limbilises alas on suurenenud (Howes *et al.*, 2012). Kui varasemalt peeti üheks peamiseks skisofreeniaga seotud düsfunktsiooniks mesolimbiliste dopamiinineuronite hüperaktiivsust (Davis *et al.*, 1991), siis

uuemad uuringud on näidanud, et mesolimbilised ebanormaalsused võivad küll esineda, kuid peamised düsfunktsioonid on seotud dorsaalse striatumiga ja sellesse projekteeruva nigrostriataalse rajaga, kus hüperdopaminergia on oluliselt kõrgemal tasemel (McCutcheon *et al.*, 2017).

Mesokortikaalne rada on dopaminergiline rada, mis ühendab VTA prefrontaalse koorega. See on oluline dorsolateraalne prefrontaalse korteksi (osa otsmikusagarast) normaalseks toimimiseks. Mesokortikaalne rada on seotud kognitiivse kontrolli, motivatsiooni ja emotsioonidega (Miller, 2000). Skisofreeniaga seostatakse mesokortikaalse raja hüpodopaminergiat (Davis *et al.*, 1991). MRI uuringutes on leitud, et skisofreeniahaigetel indutseerib amfetamiin võrreldes tervete kontrollgrupiga vähenenud dopamiini vabastamist dorsolateraalsetes prefrontaalses korteksis (Slifstein *et al.*, 2015). Sellest arvatakse tulenevat skisofreenia negatiivsed sümptomid nagu motivatsioonipuudus ja anhedoonia. Dopamiini hüper- ja hüpoaktiivsuse koosinemine skisofreenia korral seletab negatiivsete ja positiivsete sümptomite koosinemist (Davis *et al.*, 1991). Skisofreenia- ja psühhoosiravimid ehk neuroleptikumid mõjuvad dopaminergilistes süsteemides dopamiini retseptoritele, täpsemalt seisneb nende toime D2 retseptori blokeerimises (Kapur *et al.*, 2000).



**Joonis 2.** Dopaminergiliste radade häired skisofreenias (Patel *et al.*, 2014 alusel)

### 1.3. Dopamiini retseptorid

#### 1.3.1. Tüübid

Dopamiini retseptorid on G-valguga seotud retseptorite perekond, mis ekspresseeruvad peamiselt KNSs. Nende peamine endogeenne ligand on neurotransmitter dopamiin. KNS-is on dopamiiniretseptorite funktsioon seotud neuroendokriinse sekretsiooni, tahtliku mootorika, motivatsiooni, õppimise, mälu ja tasu (*reward*) saamisega. Dopamiiniretseptorite, eelkõige D<sub>2</sub>, stimulatsiooni kõrge taseme DA poolt seostatakse skisofreeniaga. (Abi-Dargham *et al.*, 2000; Jaber *et al.*, 1996; Missale *et al.*, 1998). Dopamiiniretseptorid jagunevad viieks, neid tähistatakse D<sub>1</sub> - D<sub>5</sub>. Omakorda jaotuvad need kaheks perekonnaks, D<sub>1</sub>-sarnasteks, kuhu kuuluvad retseptorid D<sub>1</sub> ja D<sub>5</sub> ning D<sub>2</sub>-sarnasteks, kuhu kuuluvad retseptorid D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> ja D<sub>4</sub>. D<sub>1</sub> ja D<sub>2</sub> retseptorid esinevad KNS-i rohkemates alades ja suuremal hulgal, kui teised dopamiini retseptorid, mis võib anda märku nende suuremast funktsionaalsest mitmekesisusest (Mansour ja Watson Jr., 2000). D<sub>1</sub>-sarnased retseptorid paiknevad ainult postsünaptiliselt, D<sub>2</sub>-sarnased retseptorid paiknevad nii pre- kui postsünaptiliselt. Seetõttu osalevad D<sub>2</sub> retseptorid ka DA taseme regulatsioonis. D<sub>1</sub> retseptoreid ekspresseeritakse peamiselt nigrostriataalses, mesolimbilises ja mesokortikaalses rajas, täpsemalt striatumis, *n. accumbensis*, *s. nigras*, haistesibulas, amügdalas ja frontaalkorteksis. D<sub>2</sub> retseptoreid ekspresseeritakse peamiselt striatumis, *n. accumbensis* ja olfaktoorses kõrbukeses. Ka SN-as, VTA-s, hüpotalamuses, kortikaalsetes alades, *s. pellucidum*is ehk läbipaistvas vaheseinas, amügdalas ja hippokampusel leidub neid olulisel määral. D<sub>2</sub> retseptorite kaks vormi on D<sub>2</sub>Lh ehk pikk vorm, mis on post-sünaptiline retseptor ja D<sub>2</sub>Sh ehk lühike vorm mis on pre-sünaptiline retseptor ehk autoretseptor, mis osaleb sünaptilises pilus oleva DA taseme reguleerimises (Beaulieu ja Gainetdinov, 2011).

#### 1.3.2. D<sub>2</sub> retseptori düsfunktsioonid skisofreenias

Skisofreenia positiivseid sümptomeid seostatakse dopamiini hüperaktiivsusega mesolimbilise ja nigrostriataalse raja D<sub>2</sub> retseptorites (Walter *et al.*, 2009; Kuepper *et al.*, 2012). See seletab ka seda, miks antipsühhootikumid omavad tugevamat efekti just skisofreenia positiivsete sümptomide ravis. Skisofreeniahaigete ajukoe *post mortem* uurimisel on leitud D<sub>2</sub> retseptori kvantitatiivset tõusu striatumis. Antud patsiendid olid saanud antipsühhootilist ravi (Mackay *et al.*, 1982). Arvatakse, et D<sub>2</sub> retseptorite taseme tõus tuleneb antipsühhootikumide kuurist, mitte ei ole haiguse enese kliiniline tunnus (Clow *et al.*, 1980; Seeman ja Kapur, 2000). Siiski peetakse olemasolevate retseptorite funktsiooni häirituks. Varasemalt on leitud, et

olemasolevate postsünaptiliste dopamiini D<sub>2</sub> retseptorite tundlikkus on suurenenud ehk dopamiin stimuleerib retseptoreid tugevamalt. Arvatakse, et see on seotud retseptorite dimeerumisega (Wang *et al.*, 2010). Suurenenud tundlikkus läheb loogiliselt kokku skisofreenia puhul esineva dopaminergiliste neuronite faasilise aktiivsuse suurenemisega (Abi-Dargham *et al.*, 2000). Samuti on suurenenud dopamiini suhtes kõrgeenenud afiinsusega retseptorite proportsioon. Ka on skisofreenia korral leitud, et D<sub>2</sub>Sh retseptorite arv on vähenenud (Seeman, 2013). See võib olla üks põhjustest, miks DA tundlikkus on skisofreenia korral tõusnud – autoregulatsioon on häiritud. Skisofreeniaga seotud negatiivseid ja kognitiivseid sümptomeid seostatakse D<sub>1</sub>-retseptorite hüpostimulatsiooniga (Abi-Dargham ja Moore, 2003).

### **1.3.3. Antipsühhootikumide toime**

Psühhooosi raviks kasutatavad ravimid võib jagada esimese põlvkonna ehk tüüpilisteks ja teise põlvkonna ehk atüüpilisteks antipsühhootikumideks. Need mõjuvad peamiselt dopamiini süsteemidele. Mõlemate näol on tegemist dopamiini retseptori blokeerijate ehk antagonistidega. Tüüpilised antipsühhootikumid blokeerivad tavaliselt just D<sub>2</sub> retseptoreid. Teise põlvkonna antipsühhootikumide hulka kuuluvad ka D<sub>2</sub> osalised agonistid ehk aktiveerijad, mille seondumine ei kutsu esile niivõrd tugevat aktivatsiooni, kui täielik agonist. Antipsühhootikumide efektiivsus on seotud peamiselt nende afiinsusega D<sub>2</sub> retseptori suhtes (Miller, 2009; Horacek *et al.*, 2006; Miyamoto *et al.*, 2004; Lieberman, 2004). Kliiniliselt on oluline D<sub>2</sub> retseptori mõju optimeerimine. Mõned teise põlvkonna antipsühhootikumid nagu klosapiin mõjuvad lühiajaliste antagonistidena, kutsudes siiski esile piisava antipsühhootilise vastuse. Esimese põlvkonna antipsühhootikumid mõjuvad permanentsete antagonistidena, see võib põhjustada patsientidel mootorikaprobleeme, kuna avaldab mõju ekstrapüramidaalsele süsteemile. Ligikaudu 70% D<sub>2</sub>-retseptorite blokeerimine on piisav antipsühhootilise toime saavutamiseks, rohkemate retseptorite blokeerimine on juba seotud ekstrapüramidaalsele häiretega (Horacek *et al.*, 2006; Leucht *et al.*, 2009)

## **1.4. ErbB retseptorite perekond**

### **1.4.1. ErbB retseptorid**

Retseptor-türosiin kinaasid (RTK) on transmembraansed valgud, mis osalevad rakuliste protsesside reguleerimises. Inimeses sünteesitakse 58 erinevat retseptor-türosiin kinaas valku, mis on jaotatud 20 alaperekonda (Robinson *et al.*, 2000). ErbB perekonda kuulub neli RTKd, mis on struktuurselt sarnased. ErbB perekonna liikmed on: ErbB1 ehk epidermaalse



kasvufaktori retseptor (EGFR); ErbB2 ehk HER2 ja närilistel Neu; ErbB3 ehk HER3, ning ErbB4 ehk HER4. Retseptor koosneb ekstratsellulaarsest piirkonnast ehk ligandiga seondumispiirkonnast, transmembraanses piirkonnast ja intratsellulaarsest tsütoplasmas paiknevast türosiinkinaasest domeenist, mis aktiveeritakse aminohappe türosiini fosforüülimisega, see vahendab rakus signaali ülekannet (Fuller *et al.*, 2008). Puudulik ErbB signaaliülekanne on seotud neurodegeneratiivsete haigustega, ülemäärane signaaliülekanne on seotud erinevat tüüpi kasvujate kujunemisega (Gondi *et al.*, 2009). ErbB perekonna liikmed moodustavad homodimeere, heterodimeere ja võimalik, et ka suuremat järku oligomeere. Ligandi sidumine põhjustab konformatsioonilise muutuse, mis võimaldab dimeriseerumist, fosforüleerimist ja signaaliülekanne aktiveerimist (Fuller *et al.*, 2008; Haslekås *et al.*, 2005)

ErbB1 ehk EGFR on esimesena avastatud ErbB-perekonna liige ja on retseptoriks EGF-perekonna valkudele. Seda ekspresseeritakse paljudes kudedes üle kogu organismi, ka mitmetes ajupiirkondades (Chen *et al.*, 2016). Keskaju dopaminergilistes neuronites ekspresseerudes on selle signaal seotud eelkõige rakkude arengu ja elulemusega (Iwakura ja Nawa, 2013). Kõige aktiivsem ErbB1 dimeerne vorm on ErbB1-ErbB2 dimeer, mis omab tugevnenud vastust EGFile (Novak *et al.*, 2001). EGFR üleregulatsiooni on täheldatud koekahjustuste korral (Tanaka ja Nakayama, 2016). Ka vähi korral on EGFR ülesreguleeritud, viidates vajadusele retseptori üleregulatsioonile rakkude jagunemisel (Schrevel *et al.*, 2011; Cronin *et al.*, 2010). Loomuuringutes on leitud, et ErbB1 akuutne aktivatsioon viib striatumis dopamiini vabastamiseni mille tulemusena tekivad skisofreeniaga seostatud käitumuslikud häired (Sotoyama *et al.*, 2011; Tohmi *et al.*, 2005; Futamura *et al.*, 2002).

ErbB2 ehk HER2 on ainuke ErbB-perekonna liige, millel puudub ligandi siduv domeen (Chen *et al.*, 2016). Ekspresseeritakse samuti paljudes kudedes, ka väikeajus, korteksis ja keskajus. Ekspresseerub oligodendrotsüütides, astrotsüütides ja signaal stimuleerib rakujagunemist ja müelinisatsiooni (Iwakura ja Nawa, 2013). On kõigi teiste ErbBide eelistatud dimeriseerumispartner ja funktsioneerub dimeerides koretseptorina (Tzahar *et al.*, 1996; Graus-Porta *et al.*, 1997). ErbB2 sisaldavad heterodimeerid omavad ligandide suhtes suuremat affiinsust (Karunagaran *et al.*, 1996). ErbB2 on leitud ka paljudes vähirakkudes ja seda peetakse onkogeeniks (Novak *et al.*, 2001; Karunagaran *et al.*, 1996).

ErbB3 ehk HER3 on ainuke ErbB-perekonna liige, millel puudub kinaasne domeen, ega osale seetõttu signaaliülekanne ilma partnerita. Ekspresseeritaks paljudes kudedes, ajus oligodendrotsüütides (Iwakura ja Nawa, 2013). ErbB3 moodustab teiste ErbBidega

heterodimeere, mille korral tekib signaali edastus, signaalid viivad rakujagunemise ja diferentseerumiseni (Lemmon, 2009). Just ErbB2-ErbB3 heterodimeeri seostatakse baastasemel signaali edastamisega (Novak *et al.*, 2001). Skisofreenia korral on tuvastatud ErbB3 alla reguleerimine (*down-regulation*) (Hakak *et al.*, 2001).

ErbB4 ehk HER4 ekspresseerub kõrgel tasemel ajus - korteksis, väikeajus, keskajus (Chen *et al.*, 2016). Keskaju dopaminergilistes neuronites on ErbB4 signaal seotud rakkude elulemuse ning sünaptiliste funktsioonide reguleerimisega (Iwakura ja Nawa, 2013). ErbB4 vahendatud NRG1 ligandi signaali häireid seostatakse skisofreeniaga (Hahn *et al.*, 2006; Silberberg *et al.*, 2006). Ka geeni ennast seostatakse skisofreeniaga (Greenwood *et al.*, 2012). On näidatud, et ErbB4 deletsiooniga hiirtes esinevad neuroloogilise arengu häired, mis viivad skisofreenialaadse fenotüübini (Perez-Garcia, 2015).

#### 1.4.2. ErbB retseptorite ligandid

**Tabel 1.** ErbB perekonna retseptorite ligandid.

Ligand	Retseptor			
	ErbB-1	ErbB-2	ErbB-3	ErbB-4
EGF	+	-	-	-
HB-EGF	+	-	-	+
TGF- $\alpha$	+	-	-	-
AREG	+	-	-	-
BTC	+	-	-	+
EPR	+	-	-	+
EPGN	+	-	-	-
NRG1	-	-	+	+
NRG2	-	-	+	+

NRG3	-	-	-	+
NRG4	-	-	-	+

ErbB retseptoreid aktiveerivad 13 endogeenset ligandi (Fuller et al., 2008). Egf on kasvufaktor mis vastutab paljude rakutüüpide kasvu, proliferatsiooni, diferentseerumist ja elulemuse eest (Chen *et al.*, 2016). Neer on peamine tsirkulatoorse EGF-i allikas. Varasemalt on leitud, et aju vigastuse korral kutsus Egf manustamine esile kognitiivsete funktsioonide paranemist ning vähendab neuronite apoptoosi (Sun *et al.*, 2010). Skisofreeniahaigetel on leitud alanenud Egf tase prefrontaalses korteksis ja striatumis (Futamura *et al.*, 2002). EGF-i on pakutud välja skisofreenia ja depressiooni biomarkerina (Domenici *et al.*, 2010). HB-EGF-i ehk hepariinseonduvat EGF-i leidub kogu aju neuronites ja neurogliaas ning seda peetakse tähtsaks neuraalses funktsioneerimises (Hayase *et al.*, 1998). HB-EGF-i suurenenud ekspressiooni on leitud ajus peale hüpoksiat - see stimuleerib neurogeneesi läbi ErbB1 (Jin *et al.*, 2002). Keskajus omab HB-EGF dopaminergiliste neuronite suhtes elulemust suurendavat efekti (Farkas ja Krieglstein, 2002). Transformeeriv kasvufaktor alfa (TGF- $\alpha$ ) aktiveerib samuti rakujagunemist, arengut ja diferentseerumist esile kutsuvaid signaalradu (Singh ja Coffey, 2014). Seda leidub enamustes neuronites, kaasaarvatud striataalsetes ja kortikaalsetes, kus seda esineb kõrgel tasemel (Ferrer *et al.*, 1996; Lazar ja Blum, 1992). Varasemalt on näidatud, et TGF $\alpha$  stimuleerib närvirakkude proliferatsiooni täiskasvanu vigastatud ajus. (Fallon *et al.*, 2000). TGF $\alpha$  alanenud ekspressiooni on leitud skisofreeniahaigetel (Hayes *et al.*, 2014). Neureguliin 1 (NRG1) on oluline närvisüsteemi arengus ja kutsub esile neuronite migratsiooni ja diferentseerumist, omab ka neurotroofset efekti (Crosland *et al.*, 2008). NRG1 osaleb ka sünaptilise plastilisuse modulatsioonis (Buonanno ja Fischbach, 2001). NRG1e variante seostatakse suurenenud skisofreenia geneetilise riskiga (Agarwal *et al.*, 2014). On näidatud, et NRG1 kadu kortikaalsetes projektsioonineuronites vähendab sünaptilist plastilisust, vähenemist on leitud ka skisofreeniahaigetel (Crabtree ja Gogos, 2014; Agarwal *et al.*, 2014). Skisofreeniahaigete *post mortem* ajukude uurides on leitud suurenenud ErbB4 aktivatsioon NRG1 poolt, samas kui NRG1 tase ei olnud võrreldes kontrollidega suurenenud (Hahn *et al.*, 2006). Neureguliin 2 (NRG2) ja neureguliin 3 (NRG3) on teaduslikus mõttes hiljuti avastatud ja nende bioloogilistest funktsioonidest teatakse vähe (Falls, 2003; Zhang *et al.*, 1997; Ring *et al.*, 1999). Siiski on häireid nii NRG2 kui ka NRG3 geenis juba seostatud skisofreeniaga (Yan *et al.*, 2017; Morar *et al.*, 2010). Lisaks on ErbBide ligandid veel beetatselluliin, amfireguliin, epireguliin ja epigeen, mida selle töö käigus ei uurita.

## **1.5. Loomudel**

### **1.5.1. Loomudel kui tööriist**

Loomudel esindab ligikaudselt konkreetset inimese haigusfenotüübi mudelit. Loomudelit kasutatakse saamaks ülevaade haiguse etioloogiast või töötada välja ravimeid. Mudeli kaks osa on manipuleerimine, mis indutseerib mingi seisundi, ja mõõtmine, mis on indutseeritud seisundi kvalifitseerimine ja kvantifitseerimine (Forrest *et al.*, 2014). Närilised nagu hiired ja rotid on eelistatud loomudelid biomeditsiinilistes uuringutes. Põhjuseks on nende anatoomiline, füsioloogiline ja geneetiline sarnasus inimestega. Samuti on nad väikesed ja lühikese elutsükliga, mis teeb nende kasvatamise ja hooldamise lihtsaks (Bryda, 2013). Kaks uuringutes tüüpiliselt kasutatavat inbriiditud hiireliini on B16 ja 129Sv. (Hedrich ja Bullock, 2004). Inbriidingu ehk sugulasaretuse teel saadud hiireliine kasutatakse uuringutes, kuna ühes liinis on isendite genotüübid praktiliselt identsed. Lisaks on erinevad inbriiditud liinid omavahel heterogeensed. Samuti on võimalik aretada spetsiifiliste fenotüüpidega hiiri. Need faktorid muudavad inbriiditud hiired erinevat tüüpi uuringutes väga olulisteks tööriistadeks (Beck *et al.*, 2000). Tüüpiliselt on B16 hiired liikuvamad ja aktiivsemad kui 129Sv hiired, kes on pigem inhibeeritud iseloomuga. Siiski sõltuvad käitumuslikud erinevused suurel määral ka ümbritsevast keskkonnast (Abramov *et al.*, 2008; Heinla *et al.*, 2014). Uuringud toetavad ka ideed, et 129sv hiireliin on stressile vastuvõtlikum ja seetõttu ka parem mudel (Liu ja Gershenfeld, 2001; Liu ja Gershenfeld, 2003)

### **1.5.2. Psühhoosi loomudel**

Skisofreenia loomudelitel peavad esinema haiguse peamised tunnusjooned ja sümptomid. Skisofreeniaga kaasnevaid defekte simuleerivad mitmed erinevad mudelid. Need jaotatakse nelja kategooriasse: farmakoloogilised, arengulised, kahjustuslikud ja geneetilised mudelid. Mudelites esinevad peamiselt skisofreenia positiivsete sümptomitega analoogsed sümptomid, mõnedel mudelitel ka negatiivsete sümptomitega sarnased sümptomid (Jones *et al.*, 2011). Antud töös kasutatakse farmakoloogilist amfetamiin-indutseeritud mudelit. Farmakoloogilise mudeli korral manipuleeritakse erinevaid neurotransmitterite süsteeme ajus, näiteks dopamiini ja GABA (Löscher, 1985). Selleks, et loomudelilt saadud tulemusi saaks rakendada ravi arendamiseks, peavad tulemused olema ülekantavad skisofreeniahaigetele inimestele. Seega mudel peab olema valideeritud (Arguello *et al.*, 2010). Valideeritavust hinnatakse mitmete erinevate kriteeriumite alusel. Peamised kriteeriumid, mida kasutatakse farmakoloogilise mudeli hindamiseks on prepulsi inhibeerimine (PPI), lokomotoorika ja latentne inhibitsioon

(Moser *et al.*, 2000; Gobira *et al.*, 2013). PPI on ehmatava stiimuli vastuse inhibitsioon, juhul kui antud stiimulile eelneb nõrgem stiimul (Hoffman ja Searle, 1968; Graham ja Murray, 1977). Skisofreeniapatsientidel esinevad PPI häired (Braff ja Geyer, 1990). Latentse inhibitsiooni korral vähendab stiimuli sagedane esitamine stiimuli tähenduse määra. Teisisõnu juba tuttava stiimuli esinemise korral inhibeeritakse antud stiimuliga seotud seoste loomine ja õppimine (Lubow ja Gewirtz, 1995). Latentse inhibitsiooni häireid seostatakse akuutse skisofreeniaga (Swerdlow *et al.*, 1996). Loomudelite kehtivuse katsetamiseks vaadeldakse mõningaid lokomotoorseid muutusi, sealhulgas stereotüüpiat (Korff *et al.*, 2008). Stereotüüpia on mingi tegevuse pidev ja eesmärgitu kordamine (Rapp ja Vollmer, 2005). Skisofreeniapatsientidel esineb sageli lokomotoorseid häireid (Sano *et al.*, 2012).

#### **1.5.4. Loomudeli manipulatsioonid**

Farmakoloogilised mudelid ehk farmakoloogiline manipulatsioon põhineb teatud psühhoootikumide neurotransmitterite süsteeme mõjutaval efektil. Paljud farmakoloogilised mudelid põhinevad dopamiini süsteemi mõjutamisel, mille häireid seostatakse psühhoosiga. (Löscher, 1985). Esimesed skisofreenia loomudelikud põhinesidki dopaminergilise süsteemi mõjutamisel. Laialdaselt kasutatav kaudne dopamiini agonist on amfetamiin, mis võib põhjustada psühhoootilisi sümptomeid (Jones *et al.*, 2011). Neuroloogilised uuringud skisofreeniahaigetel on näidanud suurenenud sünaptilist dopamiini kontsentratsiooni pärast amfetamiini manustamist võrreldes kontrollgrupiga (Breier *et al.*, 1997). Seega manustatakse seda loomadele, et simuleerida psühhoosi bioloogilist seisundit. Pideval amfetamiini manustamisel närilistele esinevad skisofreenia sümptomid nagu hüperaktiivsus, kestvad PPI häired, latentse inhibitsiooni häired ja kognitiivsed häired, mida seostatakse prefrontaalse koorega, sealhulgas defitsiidiga tähelepanus (Fletcher *et al.*, 2005; Tenn *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2011). Amfetamiin mudeldab positiivseid sümptomeid, negatiivseid sümptomeid närilistel amfetamiinimudelil täheldatud ei ole (Sams-Dodd, 1995). Mudelit valideerib veel see, et antipsühhoootikumid vähendavad psühhoootilisi positiivseid sümptomeid (Arndt *et al.*, 1995). Reeglina manustatakse amfetamiini järjest suurenevas doosis, et vältida algsest kõrgest doosist tulenevaid neurotoksilisi efekte (Featherstone *et al.*, 2007).

## **2. EKSPERIMENTAALOSA / UURIMUS**

### **2.1. Töö eesmärgid**

Töö eesmärgid on:

1. Tuvastada B16 ja 129Sv hiireliinide keskajus amfetamiin-indutseeritud psühhoosi mudeli korral ErbB retseptorite perekonna ja nende ligandide ning D<sub>2</sub> retseptori ekspressioon.
2. Ekspressiooniandmete põhjal võrrelda ErbB retseptorite ja nende ligandide ekspressiooni B16 ja 129Sv hiireliinide eri katsegruppides amfetamiin poolt induktsiooniga psühhoosi mudelis.

Töö sooritati Tartu Ülikooli Bio- ja siirdemeditsiini instituudi füsioloogia osakonnas läbi viidava teadusuuringu osana. Uuringu eesmärk on tuvastada psühhoosiga seotud molekulaarseid markereid ning seeläbi arendada arusaamist psühhoosist ja selle tekkemehhanismidest.

## 2.2. Materjal ja meetoodika

### 2.2.1. Katseloomad

Katseloomad olid isased metsiktüüpi 129S6/SvEvTac (129Sv) ja C57BL/6Ntac (Bl6) hiired (Tartu Ülikooli Bio- ja siirdemeditsiini instituudi katseloomakeskuse vivaarium). Hiiri hoiti uuringu vältel 1290D Eurostandard tüüp III puurides mõõtmetega 425 mm × 276 mm × 153 mm (Tecniplast, Itaalia). Ühes puuris hoiti 6-10 hiirt, kokku oli katses 70 isendit (30 129Sv ja 40 Bl6). Hiiri hoiti 12-tunnisel kunstlikul päeva-öö režiimil (valgus 07:00-19:00), temperatuuril 22°C (± 1°C). Allapanu oli haavahake ja pesamaterjal haavalaastud, mõlemaid vahetati kord nädalas. Toitu ja vett ei võimaldatud ühe tunni jooksul enne testi ja ühe tunni testi kestvuse ajal, muul ajal olid need vabalt kättesaadavad. Katse alguses olid loomad 6-9 ja katse lõpus 8-11 nädalat vanad. Katse kestis 13 päeva. Mõlemad liini hiired jaotati kolme gruppi: kontrollgrupp (SAL), kellele manustati kogu katse vältel füsioloogilist lahust; akuutne grupp (AK), kellele manustati füsioloogilist lahust kõigil päevadel, välja arvatud viimasel katsepäeval kui manustati amfetamiinilahust ja krooniline grupp (KR), kellele manustati kogu katse vältel amfetamiinilahust. Hiired kaaluti iga kord enne vastava lahuse manustamist. Selle järgi arvutati vajalik lahuse kogus (10 ml / kg), mis manustati intraperitonaalselt. Amfetamiinigruppidele manustati amfetamiini segatuna füsioloogilises lahuses (3 mg / kg).

**Tabel 2.** Grupid, isendite arv grupis ja manustatud lahus.

Grupp	Isendite arv grupis	1. - 2. päev	3. - 12. päev	13. päev
Bl6 SAL	13	Kohanemine	füsioloogiline lahus (0,9% NaCl)	füsioloogiline lahus (0,9% NaCl)
Bl6 AK	14	Kohanemine	füsioloogiline lahus (0,9% NaCl)	amfetamiin füsioloogilises lahuses
Bl6 KR	13	Kohanemine	amfetamiin füsioloogilises lahuses	amfetamiin füsioloogilises lahuses
129Sv SAL	7	Kohanemine	füsioloogiline lahus (0,9% NaCl)	füsioloogiline lahus (0,9% NaCl)
129Sv AK	12	Kohanemine	füsioloogiline lahus (0,9% NaCl)	amfetamiin füsioloogilises lahuses
129Sv KR	11	Kohanemine	amfetamiin füsioloogilises lahuses	amfetamiin füsioloogilises lahuses

Katse viidi läbi Tartu Ülikooli Bio- ja siirdemeditsiini instituudi katseloomakeskuse vivaariumis. Loomadega töötas pädevustunnistust omav spetsialist. Käesoleva töö autor

osales vaatlejana. Katse läbiviimiseks väljastas Eesti Vabariigi Maaeluministeeriumi Loomkatseprojekti loakomisjon loa nr 87 (4.05.2016).

### **2.2.2. Koeproovid**

Katseloomad surmati katse 13. päeval, tund pärast viimast lahuse manustamist, kasutades tservikaalset dislokatsiooni. Seejärel eraldati jääl katseloomadelt keskaju, mida uuritakse antud töös, ning ka frontaalkoor, amügdala, hipokampus, dorsaalne striatum ja ventraalne striatum. Ajuosad jahutati vedelas lämmastikus ja hoiti kuni järgmise etapini  $-80^{\circ}\text{C}$  juures. Antud etappi viis läbi pädevustunnistust omav spetsialist. Käesoleva töö autor osales vaatlejana.

### **2.2.3. RNA eraldamine**

RNA eraldamiseks kasutati happelist guanidiin-isotiotsüanaat/fenool/kloroform meetodit. Kasutati TRI reagenti (Molecular Research Center Inc, USA). RNA eraldus viidi läbi jääl, et vältida võimalikku RNAasi degradeerivat efekti (Kuigi TRI reagenti koostises on RNAasi-le inhibeerivalt toimiv guanidiin-isotsüanaat). RNA eraldati Molecular Research Center Inc protokoll (modifitseeritud) alusel. Ajukude (sügavkülmutatud) kaaluti, pandi jääle ning lisati 100  $\mu\text{l}$  külma TRI reagenti. Jääl olev kude purustati uhmerdamisega ning lisati kuni 500  $\mu\text{l}$  mahuni külma TRI Reagenti. Seejärel lasti 5 min. jääl seista. Peale seda lisati 200  $\mu\text{l}$  kloroformi (Sigma-Aldrich, Saksamaa) ja vorteksiti 15 sek (segu roosaks muutumiseni). Seejärel lasti 5 min. jääl seista. Järgnevalt tsentrifuugiti 15 min  $2^{\circ}\text{C}$  ja 12000 g juures (10630 rpm,  $r = 95$  mm, Eppendorf 5810/R Bench Top, Saksamaa). Peale seda tõsteti vesifaas uude tuubi (orgaaniline faasi antud töös ei kasutatud). RNA sadestati vesifaasi supernatandist lisades 500  $\mu\text{l}$  isopropanooli (Sigma-Aldrich, Saksamaa) ja inkubeerides loksutil külmruumis ( $4^{\circ}\text{C}$ ) 30 min. Järgnevalt tsentrifuugiti RNA põhja 15 min  $2^{\circ}\text{C}$  ja 14000 g juures (11481 rpm,  $r=95\text{mm}$ ) (kuni RNA sadenes tuubi põhja). Supernatant valati ära ning alles jäänud RNA sademele lisati pesuks 1 ml 75% etanooli ( $-20^{\circ}\text{C}$ ). Seejärel tsentrifuugiti proove 10 min  $2^{\circ}\text{C}$  ja 7500 g juures (5974 rpm,  $r=95\text{mm}$ ). Lahusti valati ära. Etanoolipesu teostati veel 2 korda. Peale pesu jäeti sade toatemperatuurile kuivama 10 minutiks. Kuivanud sademele lisati 30  $\mu\text{l}$  vett ( $50^{\circ}\text{C}$ ) (MilliQ), seejärel vorteksiti ja tsentrifuugiti põhja (*spin-down*). RNA kontsentratsiooni mõõdeti NanoDrop ND-1000 spektrofotomeetriga (NanoDrop Technologies, USA). Proovid pandi sügavkülma ( $-80^{\circ}\text{C}$ ). Käesoleva ja edasiste etappide läbiviimisel osales töö autor.



#### 2.2.4. Dnaasi I töötlus

cDNA sünteesi alustati eraldatud RNA lahuse DNAas töötusega. See on vajalik lahusesse jäänud genoomse DNA eemaldamiseks. Antud töös kasutati tootjapoolseid protokolle ja reaktsioonikomplekte. Kasutati RNAas-i vaba DNAas I (Life Technologies Corporation) ja SuperScript III pöördtranskriptaasi (Invitrogen). Sügavkülmutatud RNA proovid pandi DNAas töötuseks jääle. Eelnevalt NanoDropiga mõõdetud kontsentratsioonidele vastavalt tõsteti uude tuubi RNA lahust ja vett (Milli-Q) kuni 21 µl mahuni. Seejärel lisati 3 µl 10x DNAas I puhverlahust (Life Technologies Corporation) ning 3 µl DNAas I ensüümi (Life Technologies Corporation). Segu vorteksiti, tsentrifugiti põhja (*spin-down*) ja inkubeeriti 30 min 37°C juures. Reaktsioon peatati lisades 3 µl 50 mM EDTA lahust (Life Technologies Corporation). Seejärel vorteksiti segu ja tsentrifugiti põhja (*spin-down*) ja inkubeeriti 10 min 65°C juures. Peale seda pandi proovid jahtumiseks jääle. Igast proovist võeti kaks korda 1 µl lahust, eraldi tuubidesse (üks cDNA sünteesiks ja teine kvaliteedi hindamiseks, kui selleks peaks vajadus tekkima). Proovid pandi sügavkülma (-20°C)

#### 2.2.5. cDNA süntees

RNAle (DNAas I töödeldud) lisati vett kuni 11 µl lõppmahuni (lõplik RNA hulk cDNA sünteesilahuses 3 µg). Lahusele lisati 2 µl segu I\*. Seejärel inkubeeriti 5 min temperatuuril 65 °C praimerite seondumiseks. Peale seda hoiti 5 min jääs. Lahus tsentrifugiti põhja (*spin-down*). Seejärel lisati 1 µl segu II\*. Peale seda vorteksiti ja tsentrifugiti põhja (*spin-down*) ja inkubeeriti 10 min 25°C juures ning 60 min 50°C juures. Seejärel reaktsioon peatati tõstes 15 minutiks temperatuuri 70°C juurde. Sünteesitud cDNA kontsentratsioonid mõõdeti NanoDrop ND-1000 spektrofotomeetriga (NanoDrop Technologies). Proovid pandi sügavkülma (-80°C)

\*segu I - 1 µl 10 mM dNTP segu (iga nukleotiidi 10mM) (Fermentas, USA), 2 µl 50 µM heksameersete praimerite segu (Applied Biosystems, USA), 1 µl vett (Milli-Q).

\* segu II - 1 µl SuperScript III pöördtranskriptaasi, 4 µl 5X First-Strand Buffer (Invitrogen, USA) + 1 µl 0,1 M DTT (Invitrogen, USA)

#### 2.2.6. qPCR

qPCR analüüsil kasutati tootja protokollit ja reagentide (5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix (Solis Biodyne, Eesti)). Katsed sooritati masinal QuantStudio 12K Flex (Applied

Biosystems, USA). Algseks andmekogumiseks ja töötamiseks kasutati QuantStudio 12K Flex Software (1.2.2 tarkvara). Praimerid disainiti Primer3Plus (vabavara) tarkvaraga. Tellitud praimerite (Biosearch Technologies, Taani) sobivust testiti geelelektroforeesil ja qPCR analüüsiga. Referentsgeeninina kasutatud koduhoidja *Hprt* valiti, kuna varasemalt on tõendatud selle stabiilsus ja efektiivsus (Vanaveski *et al.*, 2017). Ühe geeni uuring tehti ühe qPCR plaadi (Thermo Scientific, USA) peal. Plaadile kanti kõikide isendite proovid neljas korduses. Seeläbi sai selged hälbijad tulemustest eemaldada.

### **2.2.7. Andmete statistiline analüüs**

qPCRi andmed eksporditi QuantStudio 12K Flex Software-ist (1.2.2 tarkvara) Exceli failina. Andmed puhastati ja hälbijad eemaldati tuginedes tarkvara juhiste ja sulamiskõvera kvaliteedile (kvaliteeti hinnati visuaalselt). Excelis viidi andmed  $2^{-\Delta CT}$  kujule koduhoidja *Hprt* suhtes. Kõigepealt analüüsiti andmete normaaljaotusele vastavust ja selle järgi otsustati kasutada mitteparameetrilist (Kruskal-Wallise) testi. Kasutatud Kruskal-Wallise testi *post-hoc* testiks oli Dunni test. Statistiliselt oluliseks loeti tulemused olulisuse nivool  $\alpha = 0,05$ . Statistiliste analüüside läbiviimiseks ja graafikute koostamiseks kasutati tarkvara GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc, USA). Tulemused on välja toodud järgnevas peatükis. Statistiliselt olulised tulemused on ära märgitud tabelis 3. ja joonisel 3.

## 2.3. Tulemused ja arutelu

### 2.3.1. Tulemused

Antud töös uuriti geeniekspressiooni muutust Bl6 ja 129Sv hiireliinide keskajus amfetamiini poolt indutseeritud psühhoosi mudelis. Mõlema liini hiired jaotati kolme gruppi: kontrollgrupp ehk SAL (füsioloogiline lahus kogu katseperioodi vältel), akuutne ehk AK (füsioloogiline lahus ja viimasel katsepäeval amfetamiinilahus) ja krooniline ehk KR (amfetamiinilahus kogu katseperioodi vältel). Analüüsi järgnevate geenide ekspressiooni: *ErbB1-4*, *Egf*, *HbEgf*, *Nrg1-3*, *Tgfa*, *Btc* ja *D2*. Koduhoidjageen, mille suhtes ekspressiooni analüüsi oli *Hprt*. Statistiliselt olulised muutused esinesid *Egf*-i korral mõlemas hiireliinis ning *ErbB2*-e korral 129Sv hiireliinis.

*ErbB1*-e mõõdetud ekspressiooni tase oli Bl6 SAL  $0,046 \pm 0,00242$ , AK  $0,0439 \pm 0,0055$  ja KR  $0,0429 \pm 0,00762$ . *ErbB1*-e mõõdetud ekspressiooni tase oli 129Sv SAL  $0,0386 \pm 0,00685$ , AK  $0,0363 \pm 0,00744$  ja KR  $0,0384 \pm 0,0073$ .

*ErbB2*-e mõõdetud ekspressiooni tase oli Bl6 SAL  $0,00698 \pm 0,00122$ , AK  $0,00682 \pm 0,00136$  ja KR  $0,00701 \pm 0,00159$ . *ErbB2*-e mõõdetud ekspressiooni tase oli 129Sv SAL  $0,00562 \pm 0,000588$ , AK  $0,00605 \pm 0,00113$  ja KR  $0,00692 \pm 0,000425$ . *ErbB2* ekspressiooni tase osutus gruppide võrdluses oluliseks (Kruskal-Wallis,  $F_{(2, 26)} = 7.60$ ,  $p = 0.022$ ). *Post hoc* test tuvastas *ErbB2* 129Sv SAL 129Sv KR vahel statistiliselt olulise erinevuse ( $p < 0.05$ ).

*ErbB3*-e mõõdetud ekspressiooni tase oli Bl6 SAL  $0,0380 \pm 0,00585$ , AK  $0,0404 \pm 0,00462$  ja KR  $0,0355 \pm 0,00564$ . *ErbB3*-e mõõdetud ekspressiooni tase oli 129Sv SAL  $0,0292 \pm 0,00733$ , AK  $0,0270 \pm 0,00338$  ja KR  $0,0290 \pm 0,00496$ .

*ErbB4*-ja mõõdetud ekspressiooni tase oli Bl6 SAL  $0,199 \pm 0,0182$ , AK  $0,197 \pm 0,0258$  ja KR  $0,204 \pm 0,0225$ . *ErbB4*-ja mõõdetud ekspressiooni tase oli 129Sv SAL  $0,230 \pm 0,0233$ , AK  $0,245 \pm 0,0257$  ja KR  $0,240 \pm 0,0410$ .

*Egf*-i mõõdetud ekspressiooni tase oli Bl6 SAL  $0,00203 \pm 0,000440$ , AK  $0,00247 \pm 0,000389$  ja KR  $0,00251 \pm 0,000626$ . *Egf* ekspressiooni tase osutus gruppide võrdluses oluliseks (Kruskal-Wallis,  $F_{(2, 37)} = 6.23$ ,  $p = 0.044$ ). *Egf*-i mõõdetud ekspressiooni tase oli 129Sv SAL  $0,00199 \pm 0,000571$ , AK  $0,00260 \pm 0,000471$  ja KR  $0,00220 \pm 0,000427$ . *Egf* ekspressiooni tase osutus gruppide võrdluses oluliseks (Kruskal-Wallis,  $F_{(2, 28)} = 6.14$ ,  $p = 0.047$ ). Mõlema juhul *post hoc* test ei tuvastanud gruppide vahelist erinevust.

*HbEgf*-i mõõdetud ekspressiooni tase oli Bl6 SAL  $0,0343 \pm 0,00359$ , AK  $0,0336 \pm 0,00544$  ja KR  $0,0353 \pm 0,00412$ . *HbEgf*-i mõõdetud ekspressiooni tase oli 129Sv SAL  $0,0329 \pm 0,00446$ , AK  $0,0328 \pm 0,00649$  ja KR  $0,0329 \pm 0,00465$ .

*Nrg1*-e mõõdetud ekspressiooni tase oli Bl6 SAL  $0,247 \pm 0,0357$ , AK  $0,242 \pm 0,0715$  ja KR  $0,243 \pm 0,0398$ . *Nrg1*-e mõõdetud ekspressiooni tase oli 129Sv SAL  $0,243 \pm 0,0471$ , AK  $0,235 \pm 0,0465$  ja KR  $0,257 \pm 0,0834$ .

*Nrg2*-e mõõdetud ekspressiooni tase oli Bl6 SAL  $0,0225 \pm 0,00344$ , AK  $0,0221 \pm 0,00341$  ja KR  $0,0199 \pm 0,00289$ . *Nrg2*-e mõõdetud ekspressiooni tase oli 129Sv SAL  $0,0193 \pm 0,00381$ , AK  $0,0199 \pm 0,00555$  ja KR  $0,0207 \pm 0,00439$ .

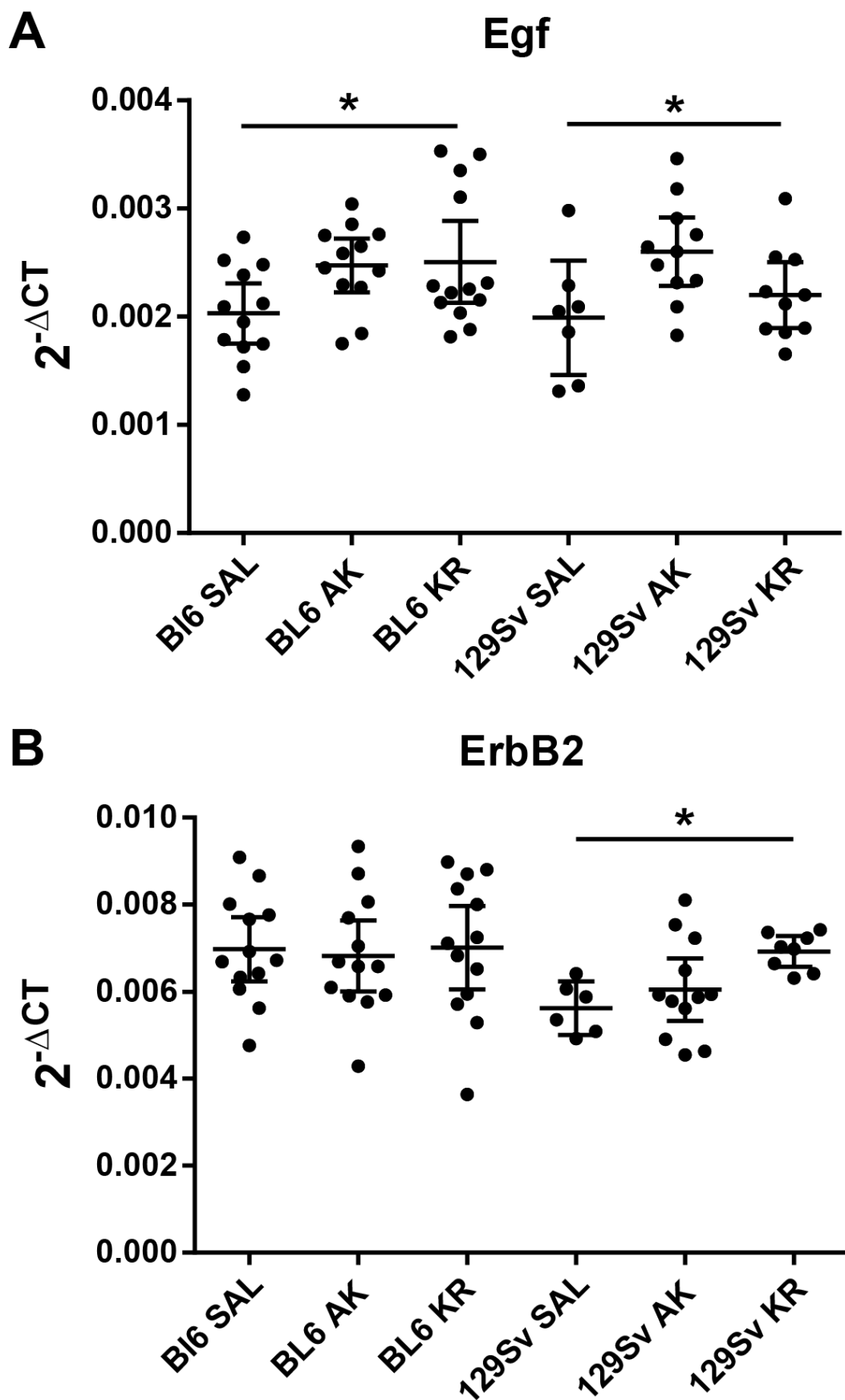
*Nrg3*-e mõõdetud ekspressiooni tase oli Bl6 SAL  $0,0348 \pm 0,00588$ , AK  $0,0333 \pm 0,00838$  ja KR  $0,0356 \pm 0,00594$ . *Nrg3*-e mõõdetud ekspressiooni tase oli 129Sv SAL  $0,0422 \pm 0,0127$ , AK  $0,0422 \pm 0,00443$  ja KR  $0,0371 \pm 0,0100$ .

*Tgfa* mõõdetud ekspressiooni tase oli Bl6 SAL  $0,106 \pm 0,0106$ , AK  $0,113 \pm 0,0141$  ja KR  $0,113 \pm 0,0157$ . *Tgfa* mõõdetud ekspressiooni tase oli 129Sv SAL  $0,0778 \pm 0,0143$ , AK  $0,0719 \pm 0,0165$  ja KR  $0,0794 \pm 0,00978$ .

*D2*-e mõõdetud ekspressiooni tase oli Bl6 SAL  $0,172 \pm 0,0429$ , AK  $0,221 \pm 0,0898$  ja KR  $0,196 \pm 0,0585$ . *D2*-e mõõdetud ekspressiooni tase oli 129Sv SAL  $0,287 \pm 0,0954$ , AK  $0,257 \pm 0,0570$  ja KR  $0,271 \pm 0,118$ .

**Tabel 3.** Statistiliselt olulised ekspressioonitaseme muutused keskajus koduhoidjageeni *Hprt* suhtes.

Geen ja hiireliin	SAL (Keskmine $\pm$ Standardhälve)	AK (Keskmine $\pm$ Standardhälve)	KR (Keskmine $\pm$ Standardhälve)	Kruskal-Wallise test
<i>Egf</i> , Bl6	0,00203 ( $\pm 0,000440$ )	0,00247 ( $\pm 0,000389$ )	0,00251 ( $\pm 0,000626$ )	$F_{(2, 37)} = 6.23$ ,  $p = 0.044$
<i>Egf</i> , 129Sv	0,00199 ( $\pm 0,000571$ )	0,00260 ( $\pm 0,000471$ )	0,00220 ( $\pm 0,000427$ )	$F_{(2, 28)} = 6.14$ ,  $p = 0.047$
<i>ErbB2</i> , 129Sv	0,00562 ( $\pm 0,000588$ )	0,00605 ( $\pm 0,00113$ )	0,00692 ( $\pm 0,000425$ )	$F_{(2, 26)} = 7.60$ ,  $p = 0.022$



**Joonis 3.** Statistiliselt olulised muutused hiireliinides olulisuse nivool  $\alpha = 0,05$ . (horisontaalse joonega on näidatud statistiliselt olulised tulemused Kruskal-Wallise testist, olulisuse määr on märgistatud: \*  $p < 0,05$  kuni  $p > 0,01$  või \*\* kui  $p < 0,01$ ). **A** - *Egf* ekspressiooni tase osutus gruppide

võrdluses oluliseks (Kruskal-Wallis,  $F_{(2, 28)} = 6.14$ ,  $p = 0.047$ ). Mõlema juhul *post hoc* test ei tuvastanud gruppide vahelist erinevust. **B** - *ErbB2* ekspressiooni tase osutus gruppide võrdluses oluliseks (Kruskal-Wallis,  $F_{(2, 26)} = 7.60$ ,  $p = 0.022$ ). *Post hoc* test tuvastas *ErbB2* 129Sv SAL 129Sv KR vahel statistiliselt olulise erinevuse ( $p < 0.05$ ).

### 2.3.2. Arutelu

Antud töö eesmärgiks oli psühhoosi uurimine hiirel põhinevas loomudelisel, kasutades kahte erinevat hiireliini, Bl6 ja 129Sv. Katseloomades indutseeriti psühhoosilaadne seisund amfetamiini manustamisega. Varem on leitud, et metamfetamiin (amfetamiini analoog) põhjustab kahjustusi dopaminergilistes neuronites ning viib dopamiini vabastamise vähenemiseni (Davidson *et al.*, 2001; Seiden ja Sabol, 1996; Volkow *et al.*, 2001). Seega amfetamiini manustamisel esile kutsutud psühhoosi mudel näib vähemalt osaliselt imiteerivat psühhoosi. Katsegrupid olid akuutne-, krooniline- ja kontrollgrupp. Katse kestis 13 päeva. Akuutsele grupile manustati 10 päeva jooksul füsioloogilist lahust ning viimasel katsepäeval amfetamiinilahust. Kroonilisele grupile manustati 11 päeva jooksul amfetamiinilahust. Kontrollgrupile manustati 11 päeva füsioloogilist lahust. Vahetult pärast katse lõppu eraldati hiirte ajukude ja säilitati uurimiseks. Ajukoes mõõdeti kvantitatiivset polümeraasi ahelreaktsiooni (qPCR) kasutades uuritavate *ErbB* retseptorite ja ligandide ekspressioonitaset kõigi katsegruppide keskajus. Uurimuse põhjal saab hinnata ekspressioonimuutusi võrreldes kontrollgrupiga ning ka võrrelda akuutse ja kroonilise grupi omavahelisi erinevusi.

Katse tulemused näitasid, et *Egf* ekspressioonitase oli mõlema hiireliini keskajus gruppide vahelises võrdluses oluliselt erinev - tõus esines mõlemas amfetamiinilahust saanud grupis. Bl6 hiireliinis oli saliini grupi *Egf* ekspressioon tase 0.002. Amfetamiini gruppides oli see tunduvalt suurem, vastavalt 0.0025 akuutses grupis ja 0.0025 kroonilises grupis. Varasemalt on esmaspsühhoosi korral leitud kõrgeenenud *Egf* tase, mis langeb pärast antipsühhootilist ravi (Fusar-Poli ja Meyer-Lindenberg, 2013; Haring *et al.*, 2015). Tervetel inimestel on EGF tase *nucleus caudatus*'es ja putaamenis (nigrostriataalse raja väljundid) negatiivses korrelatsioonis vaba dopamiini transporteri tasemega (Pak *et al.*, 2017). Seega võib *Egf* tõusust järeldada vaba dopamiini transporteri taseme langust ning et dopamiini taseme suurenemist. See on vastavuses varasemalt pakutud nigrostriataalses rajas skisofreenia korral esineva hüperdopaminergiaga. Skisofreeniahaigetel on näidatud suurenenud striataalset dopamiini vabanemine võrreldes tervete indiviididega (Fusar-Poli ja Meyer-Lindenberg, 2013). Antud olukord, kus suurenenud on dopamiini tase ja alanenud vaba dopamiini transporteri hulk viib suurenenud dopamiini tasemeni sünaptilises pilus. Kui dopamiini tase sünaptilises pilus

kasvab, siis see suurendab post-sünaptilise neuroni ergastumise tõenäosust. Pidev ergastumine viib omakorda neurotoksilisusele ja kahjustusteni. Teadaolevalt omab EGF keskajus dopaminergiliste neuronite suhtes neurotroofset ja elulemust suurendavat efekti (Casper *et al.*, 1991). Egf ülesreguleerimine võib olla seega märk psühhoosiga seotud kahjustustest ajus. Just Egf kui ligandi ülesreguleerimine, võrreldes EGFR kui retseptori ülereguleerimisega, viitab spetsiifilisemale regulatsioonile, mille eesmärk on ilmselt kompenseerida dopamiini taseme tõusust (amfetamiini manustamise tulem) tingitud neurotoksilisust.

Uuritud ErbB perekonna retseptoritest esinesid statistiliselt olulised ekspressiooni muutused ainult 129Sv hiireliini ErbB2 retseptoris. ErbB2 ekspressioonitase akuutses ja kroonilises grupis oli vastavalt 0,00605 ja 0,00692, võrreldes füsioloogilise grupiga 0,00562. ErbB2 on ainuke ErbB retseptoritest, millel ei ole veel tuvastatud ligande, seega homodimeere ErbB2 reeglina ei moodusta. Heterodimeerid moodustuvad peale retseptorile ligandi seostumist. Funktsionaalseid heterodimeere moodustab ErbB2 kõigi teiste ErbB-idega ja on kõigi teiste ErbB-ide eelistatud seondumispartner. Uuringute tulemused viitavad sellele, et ErbB2-el on oluline roll teiste ErbB-ide signaalide lateraalsel edastamisel (Graus-Porta *et al.*, 1997; Wehrman *et al.*, 2006; Lemmon, 2009). Seega suurenenud ErbB2 ekspressioon võib suurendada ka kõikide teiste ErbB retseptorite signaaliedastust. Vajadus ErbB-ide ligandide (mis teadaolevalt on üldjoones neurotroofsete ja mitogeensete efektidega) signaaliedastust suurendada võib olla märgiks mingist kahjustusest, mis põhjustab ebanormaalsest või häiritud neuronite signaaliedastust. Sellise kompensatoorse mehhanismi eesmärk võib olla taastada neuronite normaalne seisund.

Aktiivseimaks peetakse ErbB2-ErbB3 heterodimeeri. Need kaks retseptorit sõltuvad signaaliedastusel üksteisest olulisel määral, kuna ErbB3-el puudub kinaasne aktiivsus ja ErbB2el ligandid (Holbro *et al.*, 2003). ErbB3 ligandid on neurotroofsed faktorid NRG1 ja NRG2. Varasemalt on NRG1 pakutud välja skisofreenia kandidaatgeenina (Stefansson *et al.*, 2002). NRG1 taseme alanemine kortikaalsetes projektsioonineuronites vähenendab sünaptilist plastilisust, mida on leitud ka skisofreenia loomudelites (Fénelon *et al.*, 2013; Agarwal *et al.*, 2014). Lisaks on skisofreeniahaigete prefrontaalses korteksis leitud, et ErbB3 tase on tunduvalt madalam võrreldes tervete kontrollidega (Hakak *et al.*, 2001). Varasemas uuringus leiti, et epiteliaalrakkude proliferatsioon kahekordistus, kui NRG1 aktiveeris ErbB2-ErbB3 kompleksi (Patel *et al.*, 2000). ErbB2 üleekspressiooni on leitud ka vähi korral, kus teadupärast toimub intensiivne rakujagunemine (Weiner *et al.*, 1990). Sellest järeldeb NRG1 tähtis roll sünaptilise plastilisuse regulatsioonil ning rakkude proliferatsiooni stimuleerimises.

Ilmselt põhjustab mingi skisofreenia mehhanism alanenud NRG1 taset või ErbB3 ekspressioonidefitsiite või mõlemat korraga. Sellest tulenevad häired nagu sünaptilise plastilisuse vähenemine. Seda püütakse kompenseerida NRG1 signaali võimendades, reguleerides üles ErbB2, mis moodustades heterodimeeri ErbB3ega seob NRG1 suure afiinsusega ja annab edasi tugevnenud signaali. Ka skisofreeniahaigete *post mortem* ajukoe uuringutel on leitud kõrgenenud NRG1 mRNA tase, kuid vähenenud NRG1 valgu tase, mis toetab seda järeldust (Mostaid *et al.*, 2017).

Varasemalt on leitud, et ErbB2 koekspressioon ErbB4-ga ei mõjuta ligandidega NRG1 ja BTC seostunud ErbB4 türosiini fosforüleerimist ehk aktiivsust (Feroz *et al.*, 2002). Teises uuringus leiti, et ErbB2 ekspressioon tõstab ligandiga seostunud ErbB4 signaaliedastuse spektrit ja tugevust, kui tegemist on EGF ja TGF $\alpha$ , kuid mitte NRG1 ega BTC korral (Wang *et al.*, 1998). NRG1 tõstab läbi ErbB4 vahendatud signaali dopamiini taset keskajus (Yurek *et al.*, 2004). ErbB4 ekspresseerub kõrgel tasemel SNc-s ja VTA-s, kust saavad alguse rajad, mida skisofreenias seostatakse hüperdopaminergiaga (Skirzewski *et al.*, 2017). Siinkohal võib oletada, ErbB2 kõrgenenud tase viib osade ErbB4 ligandide signaaliedastuse tugevnemiseni - näiteks EGF mis nagu eelnevalt räägitud on skisofreeniast tingitud kahjustustes kompensatoorses rollis. EGF signaaliedastuse suurendamise vajadusest võiks märku anda lisaks EGF enda ülesreguleerimisele ka see, et ErbB2-ErbB1 dimeer omab tugevnenud vastust EGF-ile ja selle rolli on näidatud ka mitoosi indutseerimises (Deb *et al.*, 2001; Wehrman *et al.*, 2006). Samas võib teiste ligandide signaaliedastust ErbB2 suurenenud tase mõjutada erinevalt - näiteks NRG1 korral, kuna selle ligandi ErbB4 vahendatud signaal viib dopamiini taseme suurenemiseni alas, mis niigi on skisofreenia korral hüperdopaminergiline, kuid ErbB3 vahendatud signaal võib aidata parandada sünaptilise plastilisuse häireid.

D2 retseptori ekspressioonis ei esinenud kummagis hiireliinis statistiliselt olulisi erinevusi.

Ka mitmed teised uuringud on jõudnud samade tulemusteni. On leitud, et erinevates skisofreeniaga seotud aju alades nagu striatum, mida skisofreenia korral peetakse hüperdopaminergiliseks, ei esine D2 retseptori kvantitatiivseid muutusi (Martinot *et al.*, 1991). Tõsi, mitmed uuringud on vastupidiselt leidnud skisofreenia korral D2 retseptori kvantitatiivset tõusu striatumis, kuid nendes uuringutes on uuritud surmajärgselt skisofreenikute ajukude, kes on saanud antipsühhootilist ravi. Arvatakse, et D2 retseptorite taseme tõus tuleneb just antipsühhootikumide kuurist, mitte ei ole haiguse enese kliiniline tunnus (Seeman ja Kapur, 2000). Siiski peetakse olemasolevate retseptorite funktsiooni häirituks. On leitud, et skisofreenia korral stimuleerib dopamiin retseptoreid tugevamalt. See



läheb loogiliselt kokku skisofreenias esineva dopaminergiliste neuronite faasilise aktiivsuse suurenemisega (Abi-Dargham *et al.*, 2000). Ka amfetamiini manustamine mõjutab D2 retseptoreid, nende dimeeride moodustumist. Dimeeride osakaalu suurenemist seostatakse dopamiini suhtes suurenenud tundlikkusega (Wang *et al.*, 2010). Kuid amfetamiini manustamisest tingitud häired pole muidugi seotud ainult selle mõjuga D2 retseptoritele (Bay-Richter *et al.*, 2013). Lisaks on skisofreenia korral leitud, et D2Sh retseptorite (osalevad DA taseme reguleerimises) arv ajus on vähenenud (Seeman, 2013). Ka see võib olla üks põhjustest, miks DA tundlikkus on skisofreenia korral tõusnud, kuna DA autoregulatsioon on häiritud.

## KOKKUVÕTE

Skisofreenia on elukestev invaliidistav haigus, mille sümptomeid hoitakse kontrolli all antipsühhootikumidega. Antipsühhootikumid aitavad peamiselt positiivsete sümptomite vastu, samas kui negatiivsed ja kognitiivsed sümptomid jäävad ravita. Skisofreenia uurimine on keeruline haiguse keerulise etioloogia ja diagnostiliste kriteeriumite tõttu. Just haiguse keerukuse tõttu on oluline leida sobilikud loomudelid, mis aitaksid mõista haiguse tekkemehhanisme.

Üks peamine skisofreenia mehhanisme seletav hüpotees on dopamiinihüpotees. Keskajus asuvad kolm peamist dopaminergilist rada, milles skisofreenia korral esinevad nii hüper- kui ka hüpoaktiivsed seisundid. See põhjustab patsientidel mitmeid kõrvalekaldeid normaalsest ajutegevusest. Haiguse ravi põhineb praegu peamiselt D<sub>2</sub> retseptori blokeerimisel. Uuringud on praeguseks selgitanud, et lisaks esinevad häired ka teistes neurotransmitterite süsteemides näiteks glutamaadi ja GABAergilises süsteemis. Veelgi enam – haiguse molekulaarne mehhanism hõlmab mitmeid omavahel funktsionaalselt seotud geene, neurotransmittereid ja signaalradu mitmetes erinevates ajuosades.

Antud töös uuriti kahe hiireliini, Bl6 ja 129Sv, Egf perekonna ligandide ja ErbB perekonna retseptorite ning D<sub>2</sub> geeni ekspressiooni. Hiirtel indutseeriti psühhoosilaadne seisund kasutades amfetamiini. Katseloomad jaotati kolme gruppi, kaks amfetamiinigrupi ja kontrollgrupp. Katse tulemusdest selgus, et mõlemas hiireliinis on oluliselt tõusnud Egf tase amfetamiini saanud gruppides. See on ilmselt märk hüperdopaminergiast põhjustatud neuronaalsete kahjustuste kompenseerimise püüdest. 129Sv liinis on amfetamiini gruppides oluliselt tõusnud ka ErbB2 ekspressioon. Katse näitas, et ErbB2 tase tõusis oluliselt vaid 129Sv hiireliinis. 129Sv hiireliini peetakse stressile vastuvõtlikumaks. ErbB2 tõusmine võibki olla kompensatoorse mehhanismi tunnus. ErbB2 on teiste ErbBide eelistatud dimeriseerumispartner ja osaleb nende signaalide lateraalsel edastamisel. Aktiivseimaks peetakse ErbB2-ErbB3 dimeeri, mille domineerivat ligandi NRG1 peetakse skisofreenia kandidaatgeeniks. NRG1 signaali võimendus võib olla püüde korvata skisofreeniast tulenevat vähenenud sünaptilist plastilisust. Egf ja ErbB2 näol võib seega tegemist olla skisofreenia diagnoosiks sobilike biomarkeritega.

Antud töö on osa Tartu Ülikooli Bio- ja siirdemeditsiini instituudis füsioloogia osakonnas läbi viidavast suuremast uurimustööst, mille eesmärk on leida varajasi või esmase psühhoosi

markereid ning seeläbi aidata kaasa psühhoosi tekkimise molekulaarsetele mehhanismide paremale mõistmisele.

## RESÜMEE/SUMMARY

### **Expression of Egf family of ligands and ErbB family of receptors in mouse midbrain**

Keith Kukkela

#### Summary

Schizophrenia is a severe psychiatric disorder that affects approximately 1% of the population. It is characterized by the presence of psychotic symptoms. One of the main explanatory hypotheses of schizophrenia is the dopamine hypothesis that attributes the psychotic symptoms to a dysfunctional dopamine system.

Three out of four main dopaminergic tracts are located in the midbrain, therefore the genes *ErbB1-4*, *Egf*, *HbEgf*, *Nrg1-3*, *Tgfa* and *D2* were examined in the midbrain of two mice strains, 129Sv and B16. A psychosis-like state was induced using amphetamine. The mice of both strains were divided into three groups: the saline group (saline administered throughout the test period), the acute group (saline administered throughout the test period, except on the last day, when amphetamine was administered) and the chronic group (amphetamine administered throughout the test period). After the animal experiment tissue samples were collected and expression was measured by qPCR using

The main objectives of this work were to determine the levels of gene expression of the examined genes and to compare the differences between the study groups. Egf expression levels were found to be higher in amphetamine groups of both strains, as well as ErbB2 levels in the 129Sv strain. Egf upregulation could be a compensatory mechanism, aiming to help neurons to cope with the damage resulting from amphetamine administration. ErbB2 is important in mediating signals of other ErbB receptors through heterodimer formation and therefore its upregulation could be a mechanism of enhancing signals of all EGF- family ligands. Egf and ErbB2 could be suitable diagnostic biomarkers for schizophrenia and need future research.

## **TÄNUAVALDUSED**

Soovin avaldada tänu enda juhendajatele Taavi Vanaveskile ja Annely Lorentsile igakülgse nõustamise ja abi eest töö koostamisel. Suureks abiks olid ka Jane Narviku soovitused.

## KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU

### A) AJAKIRI

Abi-Dargham, A., and Moore, H. (2003). Prefrontal DA Transmission at D1 Receptors and the Pathology of Schizophrenia. *Neuroscientist* 9, 404–416.

Abi-Dargham, A., Rodenhiser, J., Printz, D., Zea-Ponce, Y., Gil, R., Kegeles, L.S., Weiss, R., Cooper, T.B., Mann, J.J., Van Heertum, R.L., et al. (2000). Increased baseline occupancy of D(2) receptors by dopamine in schizophrenia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 8104–8109.

Abramov, U., Puusaar, T., Raud, S., Kurrikoff, K., and Vasar, E. (2008). Behavioural differences between C57BL/6 and 129S6/SvEv strains are reinforced by environmental enrichment. *Neuroscience Letters* 443, 223–227.

Agarwal, A., Zhang, M., Trembak-Duff, I., Unterbarnscheidt, T., Radyushkin, K., Dibaj, P., Martins de Souza, D., Boretius, S., Brzózka, M.M., Steffens, H., et al. (2014). Dysregulated Expression of Neuregulin-1 by Cortical Pyramidal Neurons Disrupts Synaptic Plasticity. *Cell Reports* 8, 1130–1145.

Alves, F. da S., Figue, M., van Amelsvoort, T., Veltman, D., and de Haan, L. (2008). THE REVISED DOPAMINE HYPOTHESIS OF SCHIZOPHRENIA: EVIDENCE FROM PHARMACOLOGICAL MRI STUDIES WITH ATYPICAL ANTIPSYCHOTIC MEDICATION. *Schizophrenia Research* 102, 96–97.

Arciniegas, D.B. (2015). Psychosis. *Continuum : Lifelong Learning in Neurology* 21, 715–736.

Arguello, P.A., Markx, S., Gogos, J.A., and Karayiorgou, M. (2010). Development of animal models for schizophrenia. *Disease Models & Mechanisms* 3, 22–26.

Arndt, S., Andreasen, N., Flaum M, Miller D, and Nopoulos P (1995). A longitudinal study of symptom dimensions in schizophrenia: Prediction and patterns of change. *Archives of General Psychiatry* 52, 352–360.

Bay-Richter, C., O’Callaghan, M.J., Mathur, N., O’Tuathaigh, C.M.P., Heery, D.M., Fone, K.C.F., Waddington, J.L., and Moran, P.M. (2013). D-Amphetamine and Antipsychotic Drug Effects on Latent Inhibition in Mice Lacking Dopamine D2 Receptors. *Neuropsychopharmacology* 38, 1512.

Beaulieu, J.-M., and Gainetdinov, R.R. (2011). The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors. *Pharmacol Rev* 63, 182.

- Beck, J.A., Lloyd, S., Hafezparast, M., Lennon-Pierce, M., Eppig, J.T., Festing, M.F.W., and Fisher, E.M.C. (2000). Genealogies of mouse inbred strains. *Nature Genetics* 24, 23.
- Bell, D. (1973). The experimental reproduction of amphetamine psychosis. *Archives of General Psychiatry* 29, 35–40.
- Bissonette, G.B., and Roesch, M.R. (2016). Development and function of the midbrain dopamine system: what we know and what we need to. *Genes, Brain, and Behavior* 15, 62–73.
- Bowie, C.R., and Harvey, P.D. (2006). Cognitive deficits and functional outcome in schizophrenia. *Neuropsychiatric Disease and Treatment* 2, 531–536.
- Brady, K.T., Lydiard, R.B., Malcolm, R., and Ballenger, J.C. (1991). Cocaine-induced psychosis. *The Journal of Clinical Psychiatry* 52, 509–512.
- Braff, D., and Geyer, M. (1990). Sensorimotor gating and schizophrenia: Human and animal model studies. *Archives of General Psychiatry* 47, 181–188.
- Breier, A., Su, T.-P., Saunders, R., Carson, R.E., Kolachana, B.S., de Bartolomeis, A., Weinberger, D.R., Weisenfeld, N., Malhotra, A.K., Eckelman, W.C., et al. (1997). Schizophrenia is associated with elevated amphetamine-induced synaptic dopamine concentrations: Evidence from a novel positron emission tomography method. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 2569–2574.
- Bryda, E.C. (2013). The Mighty Mouse: The Impact of Rodents on Advances in Biomedical Research. *Missouri Medicine* 110, 207–211.
- Buchanan, R.W. (2007). Persistent Negative Symptoms in Schizophrenia: An Overview. *Schizophrenia Bulletin* 33, 1013–1022.
- Buonanno, A., and Fischbach, G.D. (2001). Neuregulin and ErbB receptor signaling pathways in the nervous system. *Current Opinion in Neurobiology* 11, 287–296.
- Calipari, E.S., and Ferris, M.J. (2013). Amphetamine Mechanisms and Actions at the Dopamine Terminal Revisited. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 33, 8923–8925.
- Callaghan, R.C., Cunningham, J.K., Allebeck, P., Arenovich, T., Sajejev, G., Remington, G., Boileau, I., and Kish, S.J. (2012). Methamphetamine Use and Schizophrenia: A Population-Based Cohort Study in California. *AJP* 169, 389–396.
- CARPENTER WILLIAM T. (2007). Schizophrenia: Disease, Syndrome, or Dimensions? *Family Process* 46, 199–206.

- Casper, D., Mytilineou, C., and Blum, M. (1991). EGF enhances the survival of dopamine neurons in rat embryonic mesencephalon primary cell culture. *Journal of Neuroscience Research* 30, 372–381.
- Catts V. S., Catts S. V., O’Toole B. I., and Frost A. D. J. (2008). Cancer incidence in patients with schizophrenia and their first-degree relatives – a meta-analysis. *Acta Psychiatrica Scandinavica* 117, 323–336.
- Chan, V. (2017). Schizophrenia and Psychosis: Diagnosis, Current Research Trends, and Model Treatment Approaches with Implications for Transitional Age Youth. *Child and Adolescent Psychiatric Clinics of North America* 26, 341–366.
- Chen, J., Zeng, F., Forrester, S.J., Eguchi, S., Zhang, M.-Z., and Harris, R.C. (2016). Expression and Function of the Epidermal Growth Factor Receptor in Physiology and Disease. *Physiological Reviews* 96, 1025–1069.
- Clarençon, F., Bardinet, É., Martinerie, J., Pelbarg, V., Menjot de Champfleury, N., Gupta, R., Tollard, E., Soto-Ares, G., Ibarrola, D., Schmitt, E., et al. (2017). Lesions in deep gray nuclei after severe traumatic brain injury predict neurologic outcome. *PLoS ONE* 12, e0186641.
- Clow, A., Theodorou, A., Jenner, P., and Marsden, C.D. (1980). Changes in rat striatal dopamine turnover and receptor activity during one years neuroleptic. *European Journal of Pharmacology* 63, 135–144.
- Crabtree, G.W., and Gogos, J.A. (2014). Synaptic plasticity, neural circuits, and the emerging role of altered short-term information processing in schizophrenia. *Frontiers in Synaptic Neuroscience* 6, 28.
- Cronin, J., McAdam, E., Danikas, A., Tselepis, C., Griffiths, P., Baxter, J., Thomas, L., Manson, J., and Jenkins, G. (2010). Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Is Overexpressed in High-Grade Dysplasia and Adenocarcinoma of the Esophagus and May Represent a Biomarker of Histological Progression in Barrett’s Esophagus (BE). *The American Journal Of Gastroenterology* 106, 46.
- Croslan, D.R., Schoell, M.C., Ford, G.D., Pulliam, J.V., Gates, A., Clement, C.M., Harris, A.E., and Ford, B.D. (2008). Neuroprotective effects of Neuregulin-1 on B35 Neuronal Cells following Ischemia. *Brain Research* 1210, 39–47.
- Davidson, C., Gow, A.J., Lee, T.H., and Ellinwood, E.H. (2001). Methamphetamine neurotoxicity: necrotic and apoptotic mechanisms and relevance to human abuse and treatment. *Brain Research Reviews* 36, 1–22.



Davis, K., Kahn, R., Ko, G., and Davidson, M. (1991). Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization. *AJP* 148, 1474–1486.

Deb, T.B., Su, L., Wong, L., Bonvini, E., Wells, A., David, M., and Johnson, G.R. (2001). Epidermal Growth Factor (EGF) Receptor Kinase-independent Signaling by EGF. *Journal of Biological Chemistry* 276, 15554–15560.

Domenici, E., Willé, D.R., Tozzi, F., Prokopenko, I., Miller, S., McKeown, A., Brittain, C., Rujescu, D., Giegling, I., Turck, C.W., et al. (2010). Plasma Protein Biomarkers for Depression and Schizophrenia by Multi Analyte Profiling of Case-Control Collections. *PLoS ONE* 5, e9166.

Dunayevich, E., and Keck, P.E. (2000). Prevalence and description of psychotic features in bipolar mania. *Current Psychiatry Reports* 2, 286–290.

Fallon, J., Reid, S., Kinyamu, R., Opole, I., Opole, R., Baratta, J., Korc, M., Endo, T.L., Duong, A., Nguyen, G., et al. (2000). In vivo induction of massive proliferation, directed migration, and differentiation of neural cells in the adult mammalian brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 14686–14691.

Falls, D.L. (2003). Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies. *Experimental Cell Research* 284, 14–30.

Farkas, L.M., and Kriegstein, K. (2002). Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF) regulates survival of midbrain dopaminergic neurons. *Journal of Neural Transmission* 109, 267–277.

Featherstone, R.E., Kapur, S., and Fletcher, P.J. (2007). The amphetamine-induced sensitized state as a model of schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 31, 1556–1571.

Fénelon, K., Xu, B., Lai, C.S., Mukai, J., Markx, S., Stark, K.L., Hsu, P.-K., Gan, W.-B., Fischbach, G.D., MacDermott, A.B., et al. (2013). The Pattern of Cortical Dysfunction in a Mouse Model of a Schizophrenia-Related Microdeletion. *J. Neurosci.* 33, 14825.

Feroz, K., Williams, E., and Riese, D.J. (2002). ErbB2 and ErbB3 do not quantitatively modulate ligand-induced ErbB4 tyrosine phosphorylation. *Cellular Signalling* 14, 793–798.

Ferrer, I., Alcántara, S., Ballabriga, J., Olivé, M., Blanco, R., Rivera, R., Carmona, M., Berrueto, M., Pitarch, S., and Planas, A. (1996). Transforming growth factor-alpha (TGF-alpha) and epidermal growth factor-receptor (EGF-R) immunoreactivity in normal and pathologic brain.

Fletcher, P.J., Tenn, C.C., Rizos, Z., Lovic, V., and Kapur, S. (2005). Sensitization to amphetamine, but not PCP, impairs attentional set shifting: reversal by a D1 receptor agonist injected into the medial prefrontal cortex. *Psychopharmacology* 183, 190.

Forrest, A.D., Coto, C.A., and Siegel, S.J. (2014). Animal Models of Psychosis: Current State and Future Directions. *Current Behavioral Neuroscience Reports* 1, 100–116.

Fuller, S.J., Sivarajah, K., and Sugden, P.H. (2008). ErbB receptors, their ligands, and the consequences of their activation and inhibition in the myocardium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 44, 831–854.

Fusar-Poli, P., and Meyer-Lindenberg, A. (2013). Striatal Presynaptic Dopamine in Schizophrenia, Part II: Meta-Analysis of [(18)F]/[(11)C]-DOPA PET Studies. *Schizophrenia Bulletin* 39, 33–42.

Futamura, T., Toyooka, K., Iritani, S., Niizato, K., Nakamura, R., Tsuchiya, K., Someya, T., Kakita, A., Takahashi, H., and Nawa, H. (2002). Abnormal expression of epidermal growth factor and its receptor in the forebrain and serum of schizophrenic patients. *Molecular Psychiatry* 7, 673.

Gaebel, W., and Zielasek, J. (2015). Focus on psychosis. *Dialogues in Clinical Neuroscience* 17, 9–18.

Gagnon, D., Petryszyn, S., Sanchez, M.G., Bories, C., Beaulieu, J.M., De Koninck, Y., Parent, A., and Parent, M. (2017). Striatal Neurons Expressing D1 and D2 Receptors are Morphologically Distinct and Differently Affected by Dopamine Denervation in Mice. *Scientific Reports* 7, 41432.

Glasner-Edwards, S., Mooney, L.J., Marinelli-Casey, P., Hillhouse, M., Ang, A., and Rawson, R. (2008). Clinical course and outcomes of methamphetamine-dependent adults with psychosis. *Journal of Substance Abuse Treatment* 35, 445–450.

Gobira, P.H., Ropke, J., Aguiar, D.C., Crippa, J.A.S., and Moreira, F.A. (2013). Animal models for predicting the efficacy and side effects of antipsychotic drugs. *Revista Brasileira de Psiquiatria* 35, S132–S139.

Gondi, C.S., Dinh, D.H., Klopfenstein, J.D., Gujrati, M., and Rao, J.S. (2009). MMP-2 Downregulation Mediates Differential Regulation of Cell Death via ErbB-2 in Glioma Xenografts. *International Journal of Oncology* 35, 257–263.

Gonzalez Vazquez, A.I., Seijo Ameneiros, N., Díaz del Valle, J.C., Lopez Fernandez, E., and Santed Germán, M.A. (2017). Revisiting the concept of severe mental illness: severity

indicators and healthcare spending in psychotic, depressive and dissociative disorders. *Journal of Mental Health* 1–7.

Goodwin, J.S., Larson, G.A., Swant, J., Sen, N., Javitch, J.A., Zahniser, N.R., De Felice, L.J., and Khoshbouei, H. (2009). Amphetamine and Methamphetamine Differentially Affect Dopamine Transporters in Vitro and in Vivo. *The Journal of Biological Chemistry* 284, 2978–2989.

Graham, F.K., and Murray, G.M. (1977). Discordant effects of weak prestimulation on magnitude and latency of the reflex blink. *Physiological Psychology* 5, 108–114.

Graus-Porta, D., Beerli, R.R., Daly, J.M., and Hynes, N.E. (1997). ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *The EMBO Journal* 16, 1647–1655.

Greenwood, T.A., Light, G.A., Swerdlow, N.R., Radant, A.D., and Braff, D.L. (2012). Association Analysis of 94 Candidate Genes and Schizophrenia-Related Endophenotypes. *PLOS ONE* 7, e29630.

Hahn, C.-G., Wang, H.-Y., Cho, D.-S., Talbot, K., Gur, R.E., Berrettini, W.H., Bakshi, K., Kamins, J., Borgmann-Winter, K.E., Siegel, S.J., et al. (2006). Altered neuregulin 1–erbB4 signaling contributes to NMDA> receptor hypofunction in schizophrenia. *Nature Medicine* 12, 824.

Hakak, Y., Walker, J.R., Li, C., Wong, W.H., Davis, K.L., Buxbaum, J.D., Haroutunian, V., and Fienberg, A.A. (2001). Genome-wide expression analysis reveals dysregulation of myelination-related genes in chronic schizophrenia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 4746–4751.

Han, X., Jing, M., Zhao, T., Wu, N., Song, R., and Li, J. (2017). Role of dopamine projections from ventral tegmental area to nucleus accumbens and medial prefrontal cortex in reinforcement behaviors assessed using optogenetic manipulation. *Metabolic Brain Disease* 32, 1491–1502.

Haring, L., Koido, K., Vasar, V., Leping, V., Zilmer, K., Zilmer, M., and Vasar, E. (2015). Antipsychotic treatment reduces psychotic symptoms and markers of low-grade inflammation in first episode psychosis patients, but increases their body mass index. *Schizophrenia Research* 169, 22–29.

Haslekås, C., Breen, K., Pedersen, K.W., Johannessen, L.E., Stang, E., and Madshus, I.H. (2005). The Inhibitory Effect of ErbB2 on Epidermal Growth Factor-induced Formation of Clathrin-coated Pits Correlates with Retention of Epidermal Growth Factor Receptor-ErbB2

Oligomeric Complexes at the Plasma Membrane. *Molecular Biology of the Cell* 16, 5832–5842.

Hayase, Y., Higashiyama, S., Sasahara, M., Amano, S., Nakagawa, T., Taniguchi, N., and Hazama, F. (1998). Expression of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in rat brain. *Brain Research* 784, 163–178.

Hayes, L.N., Severance, E.G., Leek, J.T., Gressitt, K.L., Rohleder, C., Coughlin, J.M., Leweke, F.M., Yolken, R.H., and Sawa, A. (2014). Inflammatory Molecular Signature Associated With Infectious Agents in Psychosis. *Schizophrenia Bulletin* 40, 963–972.

Heinla, I., Leidmaa, E., Visnapuu, T., Philips, M.-A., and Vasar, E. (2014). Enrichment and individual housing reinforce the differences in aggressiveness and amphetamine response in 129S6/SvEv and C57BL/6 strains. *Behavioural Brain Research* 267, 66–73.

Hermens, D., Lubman, D., Ward, P., Naismith, S., and Hickie, I. (2009). Amphetamine psychosis: A model for studying the onset and course of psychosis.

Hoffman, H.S., and Searle, J.L. (1968). Acoustic and Temporal Factors in the Evocation of Startle. *The Journal of the Acoustical Society of America* 43, 269–282.

Holbro, T., Beerli, R.R., Maurer, F., Koziczak, M., Barbas, C.F., and Hynes, N.E. (2003). The ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 8933–8938.

Horacek, J., Bubenikova-Valesova, V., Kopecek, M., Palenicek, T., Dockery, C., Mohr, P., and Höschl, C. (2006). Mechanism of Action of Atypical Antipsychotic Drugs and the Neurobiology of Schizophrenia. *CNS Drugs* 20, 389–409.

Howes, O.D., Kambeitz, J., Kim, E., Stahl, D., Slifstein, M., Abi-Dargham, A., and Kapur, S. (2012). The nature of dopamine dysfunction in schizophrenia and what this means for treatment. *Archives of General Psychiatry* 69, 776–786.

Iwakura, Y., and Nawa, H. (2013). ErbB1-4-dependent EGF/neuregulin signals and their cross talk in the central nervous system: pathological implications in schizophrenia and Parkinson's disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7, 4.

Jaber, M., Robinson, S.W., Missale, C., and Caron, M.G. (1996). Dopamine receptors and brain function. *Neuropharmacology* 35, 1503–1519.

Jablensky, A. (2010). The diagnostic concept of schizophrenia: its history, evolution, and future prospects. *Dialogues in Clinical Neuroscience* 12, 271–287.

- Janowsky, D.S., and Risch, C. (1979). Amphetamine psychosis and psychotic symptoms. *Psychopharmacology* 65, 73–77.
- Jin, K., Mao, X.O., Sun, Y., Xie, L., Jin, L., Nishi, E., Klagsbrun, M., and Greenberg, D.A. (2002). Heparin-Binding Epidermal Growth Factor-Like Growth Factor: Hypoxia-Inducible Expression *In Vitro* and Stimulation of Neurogenesis *In Vitro* and *In Vivo*. *J. Neurosci.* 22, 5365.
- Johnson, S.W., and North, R.A. (1992). Two types of neurone in the rat ventral tegmental area and their synaptic inputs. *The Journal of Physiology* 450, 455–468.
- Johnson, L.A., Guptaroy, B., Lund, D., Shamban, S., and Gnegy, M.E. (2005). Regulation of Amphetamine-stimulated Dopamine Efflux by Protein Kinase C  $\beta$ . *Journal of Biological Chemistry* 280, 10914–10919.
- Jones, C., Watson, D., and Fone, K. (2011). Animal models of schizophrenia. *British Journal of Pharmacology* 164, 1162–1194.
- Jönsson, L.E., and Sjöström, K. (1970). A Rating Scale for Evaluation of the Clinical Course and Symptomatology in Amphetamine Psychosis. *British Journal of Psychiatry* 117, 661–665.
- Kapur, S., Zipursky, R., Jones, C., Remington, G., and Houle, S. (2000). Relationship Between Dopamine D2 Occupancy, Clinical Response, and Side Effects: A Double-Blind PET Study of First-Episode Schizophrenia. *AJP* 157, 514–520.
- Karlsgodt, K.H., Sun, D., and Cannon, T.D. (2010). Structural and Functional Brain Abnormalities in Schizophrenia. *Current Directions in Psychological Science* 19, 226–231.
- Karunagaran, D., Tzahar, E., Beerli, R.R., Chen, X., Graus-Porta, D., Ratzkin, B.J., Seger, R., Hynes, N.E., and Yarden, Y. (1996). ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer. *The EMBO Journal* 15, 254–264.
- Kay, S.R., Fiszbein, A., and Opler, L.A. (1987). The Positive and Negative Syndrome Scale (PANSS) for Schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin* 13, 261–276.
- Koivukangas, J., Tammelin, T., Kaakinen, M., Mäki, P., Moilanen, I., Taanila, A., and Veijola, J. (2010). Physical activity and fitness in adolescents at risk for psychosis within the Northern Finland 1986 Birth Cohort. *Schizophrenia Research* 116, 152–158.
- Korff, S., J. Stein, D., and H. Harvey, B. (2008). Stereotypic behaviour in the deer mouse: Pharmacological validation and relevance for obsessive compulsive disorder. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 32, 348–355.

- Kuepper, R., Skinbjerg, M., and Abi-Dargham, A. (2012). The Dopamine Dysfunction in Schizophrenia Revisited: New Insights into Topography and Course. In *Current Antipsychotics*, G. Gross, and M.A. Geyer, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 1–26.
- Lanciego, J.L., Luquin, N., and Obeso, J.A. (2012). Functional Neuroanatomy of the Basal Ganglia. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2, a009621.
- Larson, M.K., Walker, E.F., and Compton, M.T. (2010). Early signs, diagnosis and therapeutics of the prodromal phase of schizophrenia and related psychotic disorders. *Expert Review of Neurotherapeutics* 10, 1347–1359.
- Lazar, L., and Blum, M. (1992). Regional distribution and developmental expression of epidermal growth factor and transforming growth factor- $\alpha$  mRNA in mouse brain by a quantitative nuclease protection assay. *J. Neurosci.* 12, 1688.
- Lemmon, M.A. (2009). Ligand-induced ErbB receptor dimerization. *Experimental Cell Research* 315, 638–648.
- Leucht, S., Corves, C., Arbter, D., Engel, R.R., Li, C., and Davis, J.M. (2009). Second-generation versus first-generation antipsychotic drugs for schizophrenia: a meta-analysis. *The Lancet* 373, 31–41.
- Lieberman, J. (2004). Dopamine partial agonists. A new class of antipsychotic.
- Liu, X., and Gershenfeld, H.K. (2001). Genetic differences in the tail-suspension test and its relationship to imipramine response among 11 inbred strains of mice. *Biological Psychiatry* 49, 575–581.
- Liu, X., and Gershenfeld, H.K. (2003). An exploratory factor analysis of the Tail Suspension Test in 12 inbred strains of mice and an F2 intercross. *Brain Research Bulletin* 60, 223–231.
- Löscher, W. (1985). Influence of pharmacological manipulation of inhibitory and excitatory neurotransmitter systems on seizure behavior in the Mongolian gerbil. *J Pharmacol Exp Ther* 233, 204.
- Lubow, R.E., and Gewirtz, J.C. (1995). Latent inhibition in humans: Data, theory, and implications for schizophrenia. *Psychological Bulletin* 117, 87–103.
- Mackay, A., Iversen, L., and Rossor, M. (1982). Increased brain dopamine and dopamine receptors in schizophrenia. *Archives of General Psychiatry* 39, 991–997.
- Mansour, A., and Watson Jr., S.J. (2000). Dopamine Receptor Expression in the Central Nervous System.

- Martinot, J.L., Paillère-Martinot, M.L., Loc'h, C., Hardy, P., Poirier, M.F., Mazoyer, B., Beaufils, B., Mazière, B., Allilaire, J.F., and Syrota, A. (1991). The Estimated Density of D2 Striatal Receptors in Schizophrenia: A Study with Positron Emission Tomography and <sup>76</sup>Br-Bromolisuride. *British Journal of Psychiatry* *158*, 346–350.
- McCutcheon, R., Beck, K., Jauhar, S., and Howes, O.D. (2017). Defining the Locus of Dopaminergic Dysfunction in Schizophrenia: A Meta-analysis and Test of the Mesolimbic Hypothesis. *Schizophrenia Bulletin* sbx180–sbx180.
- McKetin, R., McLaren, J., Lubman Dan I., and Hides Leanne (2006). The prevalence of psychotic symptoms among methamphetamine users. *Addiction* *101*, 1473–1478.
- Menegas, W., Bergan, J.F., Ogawa, S.K., Isogai, Y., Umadevi Venkataraju, K., Osten, P., Uchida, N., and Watabe-Uchida, M. (2015). Dopamine neurons projecting to the posterior striatum form an anatomically distinct subclass. *ELife* *4*, e10032.
- Miller, E.K. (2000). The prefrontal cortex and cognitive control. *Nature Reviews Neuroscience* *1*, 59.
- Miller, R. (2009). Mechanisms of Action of Antipsychotic Drugs of Different Classes, Refractoriness to Therapeutic Effects of Classical Neuroleptics, and Individual Variation in Sensitivity to their Actions: PART I. *Current Neuropharmacology* *7*, 302–314.
- Missale, C., Nash, S.R., Robinson, S.W., Jaber, M., and Caron, M.G. (1998). Dopamine Receptors: From Structure to Function. *Physiological Reviews* *78*, 189–225.
- Mitchell, A.J., Vancampfort, D., Sweers, K., van Winkel, R., Yu, W., and De Hert, M. (2013). Prevalence of Metabolic Syndrome and Metabolic Abnormalities in Schizophrenia and Related Disorders—A Systematic Review and Meta-Analysis. *Schizophrenia Bulletin* *39*, 306–318.
- Miyamoto, S., Duncan, G.E., Marx, C.E., and Lieberman, J.A. (2004). Treatments for schizophrenia: a critical review of pharmacology and mechanisms of action of antipsychotic drugs. *Molecular Psychiatry* *10*, 79.
- Moore, T.H., Zammit, S., Lingford-Hughes, A., Barnes, T.R., Jones, P.B., Burke, M., and Lewis, G. (2007). Cannabis use and risk of psychotic or affective mental health outcomes: a systematic review. *The Lancet* *370*, 319–328.
- Morar, B., Dragović, M., Waters, F.A.V., Chandler, D., Kalaydjieva, L., and Jablensky, A. (2010). Neuregulin 3 (NRG3) as a susceptibility gene in a schizophrenia subtype with florid delusions and relatively spared cognition. *Molecular Psychiatry* *16*, 860.

- Moser, P.C., Hitchcock, J.M., Lister, S., and Moran, P.M. (2000). The pharmacology of latent inhibition as an animal model of schizophrenia. *Brain Research Reviews* 33, 275–307.
- Mostaid, M.S., Lee, T.T., Chana, G., Sundram, S., Shannon Weickert, C., Pantelis, C., Everall, I., and Bousman, C. (2017). Elevated peripheral expression of neuregulin-1 (NRG1) mRNA isoforms in clozapine-treated schizophrenia patients. *Translational Psychiatry* 7, 1280.
- Nakao, K. (2017). 177.1 Cortical Hypodopaminergia Versus Striatal Hyperdopaminergia Revisited in an NMDAR Hypofunction Model of Schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin* 43, S92–S92.
- Novak, U., Walker, F., and Kaye, A. (2001). Expression of EGFR-family proteins in the brain: role in development, health and disease. *Journal of Clinical Neuroscience* 8, 106–111.
- van Os, J., and Kapur, S. (2009). Schizophrenia. *The Lancet* 374, 635–645.
- Pak, K., Shin, S., Kim, S.J., Kim, K., Kim, B.S., Kim, S.J., and Kim, I.J. (2017). Correlation of Plasma EGF with Striatal Dopamine Transporter Availability in Healthy Subjects. *Scientific Reports* 7, 13261.
- Patel, K.R., Cherian, J., Gohil, K., and Atkinson, D. (2014). Schizophrenia: Overview and Treatment Options. *Pharmacy and Therapeutics* 39, 638–645.
- Patel, N.V., Acarregui, M.J., Snyder, J.M., Klein, J.M., Sliwkowski, M.X., and Kern, J.A. (2000). Neuregulin-1 and Human Epidermal Growth Factor Receptors 2 and 3 Play a Role in Human Lung Development In Vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* 22, 432–440.
- Perez-Garcia, C.G. (2015). ErbB4 in Laminated Brain Structures: A Neurodevelopmental Approach to Schizophrenia. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 9, 472.
- Petrovsky, N., Ettinger, U., Hill, A., Frenzel, L., Meyhöfer, I., Wagner, M., Backhaus, J., and Kumari, V. (2014). Sleep Deprivation Disrupts Prepulse Inhibition and Induces Psychosis-Like Symptoms in Healthy Humans. *J. Neurosci.* 34, 9134.
- Picchioni, M.M., and Murray, R.M. (2007). Schizophrenia. *BMJ: British Medical Journal* 335, 91–95.
- Rapp, J.T., and Vollmer, T.R. (2005). Stereotypy I: A review of behavioral assessment and treatment. *Research in Developmental Disabilities* 26, 527–547.
- Ring, H.Z., Chang, H., Guilbot, A., Brice, A., LeGuern, E., and Francke, U. (1999). The human neuregulin-2 (NRG2) gene: cloning, mapping and evaluation as a candidate for the autosomal recessive form of Charcot-Marie-Tooth disease linked to 5q. *Human Genetics* 104, 326–332.



- Robinson, T.E., and Becker, J.B. (1986). Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: A review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. *Brain Research Reviews* 11, 157–198.
- Robinson, D.R., Wu, Y.-M., and Lin, S.-F. (2000). The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* 19, 5548.
- Ruchalski, K., and Hathout, G.M. (2012). A Medley of Midbrain Maladies: A Brief Review of Midbrain Anatomy and Syndromology for Radiologists. *Radiology Research and Practice* 2012, 258524.
- Sams-Dodd, F. (1995). Distinct effects of d-amphetamine and phencyclidine on the social behaviour of rats. *Behavioural Pharmacology* 6, 55–65.
- Sano, W., Nakamura, T., Yoshiuchi, K., Kitajima, T., Tsuchiya, A., Esaki, Y., Yamamoto, Y., and Iwata, N. (2012). Enhanced Persistency of Resting and Active Periods of Locomotor Activity in Schizophrenia. *PLoS ONE* 7, e43539.
- Schrevel, M., Gorter, A., Kolkman-Uljee, S.M., Trimbos, J.B.M.Z., Fleuren, G.J., and Jordanova, E.S. (2011). Molecular mechanisms of epidermal growth factor receptor overexpression in patients with cervical cancer. *Modern Pathology* 24, 720.
- Schultz, S., W North, S., and Shields, C. (2007). Schizophrenia: A review.
- Seeman, P. (2013). Schizophrenia thalamus imaging: Low benzamide binding to dopamine D2 receptors suggests fewer D2Short receptors and fewer presynaptic terminals. *Psychiatry Research: Neuroimaging* 214, 175–180.
- Seeman, P., and Kapur, S. (2000). Schizophrenia: More dopamine, more D(2) receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 7673–7675.
- Seiden, L., and Sabol, K. (1996). Methamphetamine and methylenedioxymethamphetamine neurotoxicity: possible mechanisms of cell destruction.
- Silberberg, G., Darvasi Ariel, Pinkas-Kramarski Ronit, and Navon Ruth (2006). The involvement of ErbB4 with schizophrenia: Association and expression studies. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* 141B, 142–148.
- Singh, B., and Coffey, R.J. (2014). From wavy hair to naked proteins: The role of transforming growth factor alpha in health and disease. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 28, 12–21.
- Siris, S.G. (2001). Suicide and schizophrenia. *J Psychopharmacol* 15, 127–135.

- Skirzewski, M., Karavanova, I., Shamir, A., Erben, L., Garcia-Olivares, J., Shin, J.H., Vullhorst, D., Alvarez, V.A., Amara, S.G., and Buonanno, A. (2017). ErbB4 Signaling in Dopaminergic Axonal Projections Increases Extracellular Dopamine Levels and Regulates Spatial/Working Memory Behaviors. *Molecular Psychiatry* 10.1038/mp.2017.132.
- Slifstein, M., van de Giessen, E., Van Snellenberg, J., Thompson, J.L., Narendran, R., Gil, R., Hackett, E., Girgis, R., Ojeil, N., Moore, H., et al. (2015). Deficits in prefrontal cortical and extra-striatal dopamine release in schizophrenia: a PET fMRI study. *JAMA Psychiatry* 72, 316–324.
- Snyder, S.H. (1973). Amphetamine Psychosis: A “Model” Schizophrenia Mediated by Catecholamines. *AJP* 130, 61–67.
- Sotoyama, H., Zheng, Y., Iwakura, Y., Mizuno, M., Aizawa, M., Shcherbakova, K., Wang, R., Namba, H., and Nawa, H. (2011). Pallidal Hyperdopaminergic Innervation Underlying D2 Receptor-Dependent Behavioral Deficits in the Schizophrenia Animal Model Established by EGF. *PLOS ONE* 6, e25831.
- Speed, N.K. (2010). The Role of Insulin Signaling on Dopamine Transporter Trafficking (Vanderbilt University).
- Srisurapanont, M., Arunpongpaisal, S., Wada, K., Marsden, J., Ali, R., and Kongsakon, R. (2011). Comparisons of methamphetamine psychotic and schizophrenic symptoms: A differential item functioning analysis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 35, 959–964.
- Stefansson, H., Sigurdsson, E., Steinthorsdottir, V., Bjornsdottir, S., Sigmundsson, T., Ghosh, S., Brynjolfsson, J., Gunnarsdottir, S., Ivarsson, O., Chou, T.T., et al. (2002). Neuregulin 1 and Susceptibility to Schizophrenia. *American Journal of Human Genetics* 71, 877–892.
- Sun, D., Bullock, M.R., Altememi, N., Zhou, Z., Hagood, S., Rolfe, A., McGinn, M.J., Hamm, R., and Colello, R.J. (2010). The Effect of Epidermal Growth Factor in the Injured Brain after Trauma in Rats. *Journal of Neurotrauma* 27, 923–938.
- Swanson, L.W. (1982). The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: A combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. *Brain Research Bulletin* 9, 321–353.
- Swerdlow, N.R., Braff, D.L., Hartston, H., Perry, W., and Geyer, M.A. (1996). Latent inhibition in schizophrenia. *Schizophrenia Research* 20, 91–103.
- Tanaka, Y., and Nakayama, J. (2016). Upregulated epidermal growth factor receptor expression following near-infrared irradiation simulating solar radiation in a three-

dimensional reconstructed human corneal epithelial tissue culture model. *Clinical Interventions in Aging* 11, 1027–1033.

Tenn, C.C., Kapur, S., and Fletcher, P.J. (2005). Sensitization to amphetamine, but not phencyclidine, disrupts prepulse inhibition and latent inhibition. *Psychopharmacology* 180, 366–376.

Tohmi, M., Tsuda, N., Mizuno, M., Takei, N., Frankland, P.W., and Nawa, H. (2005). Distinct Influences of Neonatal Epidermal Growth Factor Challenge on Adult Neurobehavioral Traits in Four Mouse Strains. *Behavior Genetics* 35, 615–629.

Tritsch, N.X., and Sabatini, B.L. (2012). Dopaminergic Modulation of Synaptic Transmission in Cortex and Striatum. *Neuron* 76, 33–50.

Tyrer, P., and Mackay, A. (1986). Schizophrenia: no longer a functional psychosis. *Trends in Neurosciences* 9, 537–538.

Tzahar, E., Waterman, H., Chen, X., Levkowitz, G., Karunakaran, D., Lavi, S., Ratzkin, B.J., and Yarden, Y. (1996). A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Molecular and Cellular Biology* 16, 5276–5287.

Vanaveski, T., Singh, K., Narvik, J., Eskla, K.-L., Visnapuu, T., Heinla, I., Jayaram, M., Innos, J., Lilleväli, K., Philips, M.-A., et al. (2017). Promoter-Specific Expression and Genomic Structure of IgLON Family Genes in Mouse. *Frontiers in Neuroscience* 11, 38.

Vaughan, and Asbury (2008). Vaughan and Asbury's General Ophthalmology, 17th edition. *Clinical and Experimental Optometry* 91, Chapter 4. Psychosis and schizophrenia.

Volkow, N.D., Chang, L., Wang, G.-J., Fowler, J.S., Ding, Y.-S., Sedler, M., Logan, J., Franceschi, D., Gatley, J., Hitzemann, R., et al. (2001). Low Level of Brain Dopamine D2 Receptors in Methamphetamine Abusers: Association With Metabolism in the Orbitofrontal Cortex. *AJP* 158, 2015–2021.

Walter, H., Kammerer, H., Frasch, K., Spitzer, M., and Abler, B. (2009). Altered reward functions in patients on atypical antipsychotic medication in line with the revised dopamine hypothesis of schizophrenia. *Psychopharmacology* 206, 121–132.

Wang, L.-M., Kuo, A., Alimandi, M., Veri, M.C., Lee, C.-C., Kapoor, V., Ellmore, N., Chen, X.-H., and Pierce, J.H. (1998). ErbB2 expression increases the spectrum and potency of ligand-mediated signal transduction through ErbB4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 6809–6814.

- Wang, M., Pei, L., Fletcher, P.J., Kapur, S., Seeman, P., and Liu, F. (2010). Schizophrenia, amphetamine-induced sensitized state and acute amphetamine exposure all show a common alteration: increased dopamine D2 receptor dimerization. *Molecular Brain* 3, 25.
- Watabe-Uchida, M., Zhu, L., Ogawa, S.K., Vamanrao, A., and Uchida, N. (2012). Whole-Brain Mapping of Direct Inputs to Midbrain Dopamine Neurons. *Neuron* 74, 858–873.
- Wehrman, T.S., Raab, W.J., Casipit, C.L., Doyonnas, R., Pomerantz, J.H., and Blau, H.M. (2006). A system for quantifying dynamic protein interactions defines a role for Herceptin in modulating ErbB2 interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 19063–19068.
- Weiner, D.B., Nordberg, J., Robinson, R., Nowell, P.C., Gazdar, A., Greene, M.I., Williams, W.V., Cohen, J.A., and Kern, J.A. (1990). Expression of the *neu* Gene-encoded Protein (P185<sup>neu</sup>) in Human Non-Small Cell Carcinomas of the Lung. *Cancer Res* 50, 421.
- Weinstein, J.J., Chohan, M.O., Slifstein, M., Kegeles, L.S., Moore, H., and Abi-Dargham, A. (2017). Pathway-specific dopamine abnormalities in schizophrenia. *Biological Psychiatry* 81, 31–42.
- Wildgust, H.J., Hodgson, R., and Beary, M. (2010). The paradox of premature mortality in schizophrenia: new research questions. *Journal of Psychopharmacology (Oxford, England)* 24, 9–15.
- Yan, L., Shamir, A., Skirzewski, M., Leiva-Salcedo, E., Kwon, O.B., Karavanova, I., Paredes, D., Malkesman, O., Bailey, K.R., Vullhorst, D., et al. (2017). Neuregulin-2 ablation results in dopamine dysregulation and severe behavioral phenotypes relevant to psychiatric disorders. *Molecular Psychiatry* 23, 1233.
- Yoon, J.H., Westphal, A.J., Minzenberg, M.J., Niendam, T., Ragland, J.D., Lesh, T., Solomon, M., and Carter, C.S. (2014). Task-evoked substantia nigra hyperactivity associated with prefrontal hypofunction, prefrontonigral disconnectivity and nigrostriatal connectivity predicting psychosis severity in medication naïve first episode schizophrenia. *Schizophrenia Research* 159, 521–526.
- Yurek, D.M., Zhang, L., Fletcher-Turner, A., and Seroogy, K.B. (2004). Supranigral injection of neuregulin1- $\beta$  induces striatal dopamine overflow. *Brain Research* 1028, 116–119.
- Zecca, L., Gallorini Mario, Schünemann Volker, Trautwein Alfred X., Gerlach Manfred, Riederer Peter, Vezzoni Paolo, and Tampellini Davide (2001). Iron, neuromelanin and ferritin content in the substantia nigra of normal subjects at different ages: consequences for iron storage and neurodegenerative processes. *Journal of Neurochemistry* 76, 1766–1773.

Zhang, D., Sliwkowski, M.X., Mark, M., Frantz, G., Akita, R., Sun, Y., Hillan, K., Crowley, C., Brush, J., and Godowski, P.J. (1997). Neuregulin-3 (NRG3): A novel neural tissue-enriched protein that binds and activates ErbB4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 9562–9567.

Zhou, F.-M., and Lee, C.R. (2011). Intrinsic and integrative properties of substantia nigra pars reticulata neurons. *Neuroscience* 198, 69–94.

Zimmer, L., Vancassel, S., Cantagrel, S., Breton, P., Delamanche, S., Guilloteau, D., Durand, G., and Chalon, S. (2002). The dopamine mesocorticolimbic pathway is affected by deficiency in n-3 polyunsaturated fatty acids. *The American Journal of Clinical Nutrition* 75, 662–667.

## B) RAAMAT

American Psychiatric Association., American Psychiatric Association., and DSM-5 Task Force. (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders : DSM-5*.

Hedrich, H.J., and Bullock, G. (2004). *The Laboratory Mouse* (Academic Press).

National Institute for Health and Care Excellence (UK) (2014). *Psychosis and Schizophrenia in Adults: Treatment and Management: Updated Edition 2014*. (London).

World Health Organization. (1992). *The ICD-10 classification of mental and behavioural disorders: clinical descriptions and diagnostic guidelines*. (Geneva: World Health Organization).

## **LIHTLITSENTS**

### **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Keith Kukkela

(sünnikuupäev: 29.01.1996)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose:

#### **EGF perekonna ekspressioon hiire keskajus,**

mille juhendajad on PhD Annely Lorents ja MSc Taavi Vanaveski,

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace´i kaudu alates **01. juulist 2020** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 28.05.2018