

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

**ErbB perekonna retseptorite ja neile seonduvate ligandide ekspressioon hiire
hipokampuses**

Bakalaureusetöö
12 EAP

Anna Katt

Juhendajad
PhD Annely Lorents
MSc Taavi Vanaveski

TARTU 2018

INFOLEHT

ErbB perekonna retseptorite ja neile seonduvate ligandide ekspressioon hiire hipokampuses

ErbB retseptor türosiinkinaasid ja neile seonduvad ligandid mõjutavad aju arengut ja toimimist. Ebanormaalsel ErbB perekonna retseptorite ekspressiooni on seostatud neuropsühhiaatriliste häiretega nagu psühhoos ja skisofreenia. Psühhoos on psüühikahäire, mida iseloomustab reaalsustaju kadumine, luulude ja hallutsinatsioonide esinemine ning käitumise muutumine. Skisofreenia on krooniline häire, mille osaks on psühhoosid ja mille teket aitab vältida varajane diagnoos ning ravi. Käesolevas töös uuriti psühhoosi amfetamiini kroonilisel manustamisel kahes käitumuslikult erinevas hiireliinis (Bl6 ja 129Sv) ning võrreldi 12 geeni ekspressioonitasemete muutusi hiire hipokampuses. Uuritavateks geenideks olid: *ErbB1-4*, *Egf*, *Tgfa*, *HbEgf*, *Btc*, *Nrg1-3* ja *Disc1*. Tulemustest selgus, et indutseeritud psühhoosi korral reguleeritakse *Egf*, *ErbB1* ja *Nrg3* üles, kuid *ErbB3* ja *ErbB4* alla. Leiti ka huvitav seos *Egf*-i ja *Disc1* vahel. Mainitud geenid võivad osutada inimese psühhoosi markeriteks ja vajavad täiendavat uurimist.

Märksõnad: indutseeritud psühhoos, ErbB retseptorid, EGF perekond, geeniekspressioon

CERCS: B470 Füsioloogia

ErbB family receptors and their ligand expression in mouse hippocampus

ErbB receptor tyrosine kinases and their ligands influence brain development and function. Abnormal ErbB family receptor expression has been associated with neuropsychiatric disorders like psychosis and schizophrenia. Psychosis is a mental disorder characterized by a loss of contact with reality, delusions, hallucinations, and a range of behavioral alterations. Schizophrenia is a chronic disorder, which can be prevented by early diagnosis and treatment. In present work chronic administration of amphetamine was used to evoke psychosis-like state in two behaviorally different strains of mice (Bl6 and 129Sv). The expression of 12 genes was measured in mouse hippocampus: *ErbB1-4*, *Egf*, *Tgfa*, *HbEgf*, *Btc*, *Nrg1-3* and *Disc1*. The results indicated upregulation of *Egf*, *ErbB1* and *Nrg3*, and down-regulation of *ErbB3* and *ErbB4* in induced psychosis. A ratio of *Egf* and *Disc1* was also found interesting. Mentioned genes may be markers of psychosis in humans and need further research.

Keywords: modeling psychosis, ErbB receptors, EGF family, gene expression

CERCS: B470 Physiology

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	8
1.1. Kognitsioon	8
1.2. Hipokampus	8
1.3. Hipokampus ja kognitiivne defitsiit	10
1.4. ErbB perekonna kinaasid	12
1.4.1. ErbB retseptorite signaaliradade mõju	15
1.5. ErbB retseptorite ligandid	16
1.6. NRG-ErbB võrgustik	18
1.7. Loommudel	19
2. EKSPERIMENTAALOSA	21
2.1. Töö eesmärgid	21
2.2. Materjal ja meetodika	22
2.2.1. Katseloomad	22
2.2.2. Koeproovid	23
2.2.3. RNA eraldamine	23
2.2.5. Dnaasi I töötlus	24
2.2.6 cDNA süntees	24
2.2.7. qPCR	25
2.2.8. Andmete statistiline analüüs	25
2.3. Tulemused	26
2.4. Arutelu	32
KOKKUVÕTE	36
RESÜMEE/SUMMARY	37
TÄNUSÕNAD	38
KIRJANDUSE LOETELU	39

KASUTATUD VEEBIAADRESSID	43
LISAD	44
LISA 1	44
LISA 2	45
LIHTLITSENTS	46

KASUTATUD LÜHENDID

129Sv - 129S6/SvEvTac hiireliin

AK - 10 päeva füsioloogilise lahuse ja viimasel päeval amfetamiini manustatud katsegrupp

AREG - amfireguliin (ingl *amphiregulin*)

B16 - C57BL/6Ntac hiireliin

BTC - beetatselluliin (ingl *betacellulin*)

D2 - dopamiini retseptor 2 (ingl *dopamine receptor 2*)

DISC1 – ingl *disrupted in schizophrenia 1*

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

EGFR ehk ErbB1 - epidermaalse kasvufaktori retseptor (ingl *epidermal growth factor receptor*)

EPG - epigeen (ingl *epigen*)

EREG - epireguliin (ingl *epiregulin*)

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

GABA - gamma-aminovõihape (ingl *gamma-aminobutyric acidI*)

HBEGF - hepariinseoseline EGF-laadne kasvufaktor (ingl *heparinbinding EGF-like growth factor*)

HER - inimese epidermaalse kasvufaktori retseptor (ingl *human epidermal growth factor receptor*)

Hprt - hüpoksantiin-guaaniin-fosforibosüül-transferaas (ingl *hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase*)

KR - 11 päeva amfetamiini manustatud katsegrupp

NEU - neuro/glioblastoomist pärinev onkogeeni homoloog (ingl *neuro/glioblastoma derived oncogene homolog*)

NMDA - N-metüül-D-aspartaat (ingl *N-methyl-D-aspartate*)

NRG - neureguliin (ingl *neuregulin*)

PSD-95 - postsünaptiline tihedusvalk 95 (ingl *postsynaptic density protein 95*)

SAL - 11 päeva füsioloogilise lahuse manustatud katsegrupp ehk kontrollgrupp

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

TGF α - transformeeruv kasvufaktor alfa (ingl *transforming growth factor alpha*)

SISSEJUHATUS

Läbi kognitsiooni ehk tunnetuse loob organism endale ümbritsevast maailmast pärit teabest kujutise. Kognitiivsete protsesside käigus integreeritakse olevikust ja minevikust pärit teave ning vastavalt sellele võetakse vastu otsused keskkonnas toime tulekuks. Tunnetus toimub mitme ajuosa nagu hipokampuse ja frontaalkoore koostöös. Hipokampus on ajuosa, mis tegeleb mälestuste kujundamise, ruumilise taju ja õppimisega. Hipokampus on oluline kognitsioonis, sest organiseerib ja ajakohastab teavet vastavalt vajadusele.

Hipokampuse väärtalitlusi seostatakse psühhiaatriliste häiretega nagu psühhoos ja skisofreenia. Skisofreenia on kompleksne krooniline psüühikahäire, mille korral ilmnevad kahjustused nii patsientide töömälus kui ka kognitiivsetes võimetes ja neil on ka väiksem hipokampus kui tervetel indiviididel. Haigetel ilmnevateks sümptomiteks on näiteks hallutsinatsioonid, pettekujutelmad, anhedoonia ja tähelepanuhäired. Skisofreenia välja kujunemist saaks ennetada, kui leida bioloogilisi markereid, mille abil oleks parem haigust varakult diagnoosida ning määrata patsientidele varajane asjakohane ravi. ErbB1-4 retseptor türosiinkinaaside ligandid reguleerivad aju arengut ja toimimist. Häireid ErbB signaliseerimises on seostatud neuroloogiliste ja psühhiaatriliste haigustega (Iwakura ja Nawa, 2013).

Käesolevas töös analüüsiti 12 geeni ekspressiooni, mis on seotud ErbB perekonna retseptor türosiinkinaasidega. Ekspressioonide tasemed määrati koduhoidjageeni *Hprt* suhtes. Muutusi uuriti amfetamiini poolt indutseeritud psühhoosi mudelis B16 ja 129Sv hiireliinides. Katseloomad jaotati kolme rühma, kontroll-, akuutse manustamise ja kroonilise manustamise grupp. Loomkatse järel hiired surmati, koeproovidest eraldati RNA, tehti DNaaS I töötlus, sünteesiti cDNA ning analüüsiti geeniekspressiooni, kasutades qPCRi meetodit.

Antud töö üldeesmärk on karakteriseerida amfetamiini poolt indutseeritud psühhoosi mõjul aset leidvaid muutusi hiire hipokampuses ja tuvastada ErbB perekonna retseptorite ekspressioonimustri muutusi B16 ja 129Sv hiire liinis.

Käesolev bakalaureusetöö on koostatud Tartu Ülikooli Meditsiiniteaduste valdkonna Bio- ja siirdemeditsiini instituudi füsioloogia osakonnas.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Kognitsioon

Kognitsioon ehk tunnetus on ümbritsevast tegelikust maailmast vaimse pildi loomine. Läbi tunnetuse saab organism aru, mis teda välismaailmas ümbritseb, mis on selle ümbritseva tähendus organismi jaoks ja kas organismil on võimalik keskkonda muuta enda elulemuse tagamiseks. Kognitsioon kätkeb teabe omandamist keskkonnast, selle oskuslikku manipuleerimist ja enese hüvanguks rakendamist. Kognitsioon hõlmab endas tähelepanu, teadmiste kujundamist, (töö)mälu, kalkuleerimis- ja arutlemisoskust, olukorra hindamist, otsuste tegemist, probleemide lahendamist, keele mõistmist ja kasutamist. Kognitiivne töötlus võimaldab olevikust ja minevikust pärit teabe kaasamist ja lõimimist vastusena keskkonna nõudmistele ning piirangutele (Rubin *et al.*, 2014). Kognitiivsed protsessid eeldavad paindlikku teabe töötlemist - organism peab olema võimeline seadma prioriteete, neid muutma vastavalt sisemistele või välistele teguritele ning koordineerima vastuse keskkonna muutusele. Kognitiivne paindlikkus võimaldab kogemuste põhjal käitumist muuta, mis on oluline indiviidi elulemuse seisukohalt, eriti muutlikus keskkonnas (Waltz, 2017; Amici *et al.*, 2018).

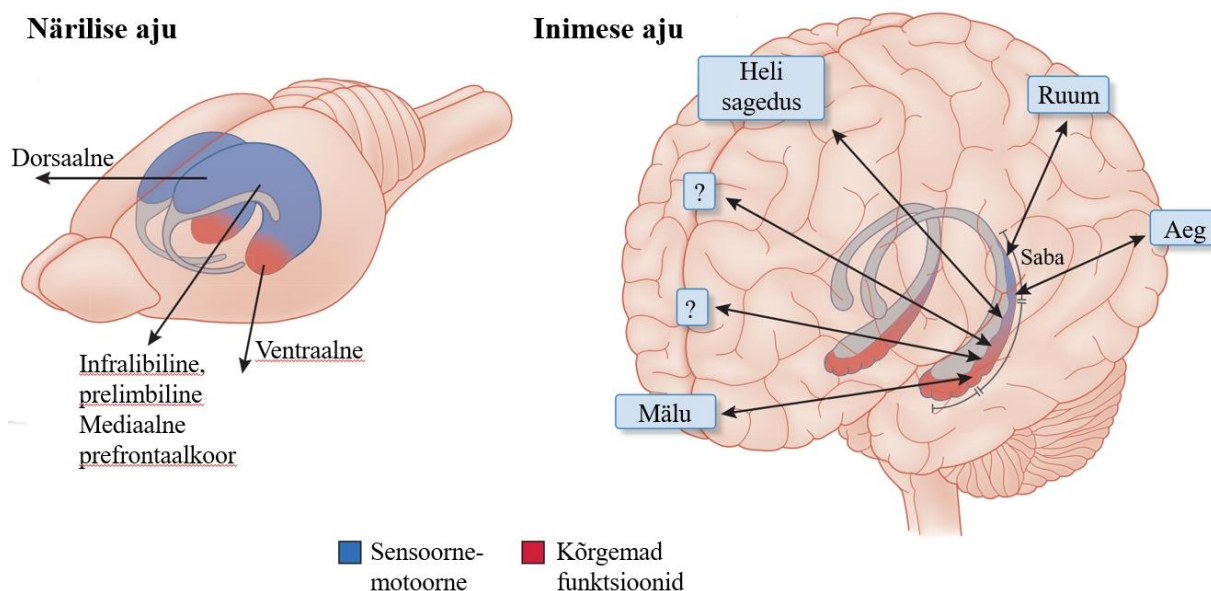
1.2. Hipokampus

Kognitiivses paindlikkuses on oluline roll nii frontaalkoorel kui ka hipokampusel, kahel ajuosal, mis on omavahel tihedas ühenduses. Prefrontaalkoor vastutab täidesaatvate ülesannete, paindliku ja sihipärase käitumise ning sotsiaalse käitumise ja emotsionaalsete otsuste langetamise eest. Täidesaatvates funktsioonides ja sotsiaalses käitumises osalevad veel mandelkeha (ld *corpus amygdaloideum*) ja võlvikäär (ld *gyrus cinguli*). Keerulised sotsiaalsed interaktsioonid toetuvad teabe paindlikule kasutamisele ning hõlmavad ka frontaalkoore struktuure (Rubin *et al.*, 2014). Hipokampuse ja frontaalkoore interaktsioonid toetavad tunnetust ja mälu ning on seega olulised õppimisel ja mälu toimises. Kui hipokampus organiseerib mälestused vastavalt sellele, kuidas neid kogeti, siis prefrontaalkoor valib välja konteksti sobivad mälestused (Eichenbaum, 2017).

Hipokampus on seotud pikaajalise mälu, õppimise, ruumilise taju, mälestuste kujunemise ja nende organiseerimisega (joonis 1) (Rubin *et al.*, 2014; Lui, 2016; Eichenbaum, 2017). Hipokampus on ümbritseva teabe suhtes tundlik, kuid just see võimaldab efektiivselt suhelda keskkonnaga (Lui, 2016). Hipokampus toetab mälu, ruumilist taju ja tunnetust, luues nn

“kognitiivse kaardi” vastavalt isendi varasematele kogemustele, mis on omakorda vajalik tulevaste otsuste tegemiseks. Hipokampus esitab teavet virtuaalsel ja reaalsel navigatsioonil ning hipokampuse tegevuse häirumisel tehakse halbu navigatsioonilisi otsuseid. Ruumilisse mälusse ja navigatsiooni panustavad ka hipokampuse välised piirkonnad nagu parahipokampaalne, retrospleniaalne ja mediaalne prefrontaalkoor, mis koos moodustavad tiheda anotoomilise võrgustiku (Lisman *et al.*, 2017).

Kognitsioon sõltub hipokampuse poolt toetatud mälu esituste pidevast kodeerimisest, uuendamisest ja paindlikust manipuleerimisest. Hipokampus on oluline kognitiivses paindlikkuses, sest esitused peavad olema sobivalt konstrueeritud ja ajakohastatud, et vastata ülesandele ja kajastada nii sotsiaalset kui olukorrakesket konteksti (Rubin *et al.*, 2014). Kontekstist sõltuv kodeerimine seletab, kuidas hipokampus käitumises toetab frontaalkoore tööd (Lisman *et al.*, 2017). Hipokampus on igapäevastes tegevustes vajalik sotsiaalsete interaktsioonide keerulises dünaamikas. Peened kontekstipõhised erinevused tavapärasest suhtluses nõuavad ulatuslikke ja paindlikke muutusi inimeste käitumises, nt sõnade valimises, teadmiste kasutamises või võõrkeeles rääkimises. Sotsiaalses suhtluses ja keelekasutuses on hipokampusel võtmeroll, sest ta teostab paindlikku tunnetamist läbi mitmete ajustruktuuride vaheliste ühenduste. Seega on hipokampus-sõltuvad esitused tingimata vajalikud paindlikku teavet nõudvates olukordades (Rubin *et al.*, 2014).



Joonis 1. Hipokampuse homoloogsed piirkonnad närilisel ja inimesel. Närilise hipokampuse ventraalse osa homoloog on primaatidel märkimisväärselt suurem, et täita kõrgemaid funktsioone nagu mälu kodeerimine. Primaatide hipokampuse „saba“ on homoloogne närilise dorsaalse vahepealse hipokampusega. Närilistel toimub teabe salvestamine ja manipuleerimine enamjaolt hipokampuse dorsaalses osas (Lisman *et al.*, 2017 põhjal).

1.3. Hipokampus ja kognitiivne defitsiit

Hipokampuse väärtalilused on seotud nii neuroloogiliste (näiteks traumaatiline ajukahjustus ja Alzheimeri tõbi) kui ka psühhiaatriliste seisunditega (näiteks skisofreenia, traumajärgne stress, depressioon, ärevus ja autism). Hipokampuse kahjustus mõjub negatiivselt ka keelelistele ja loogikaga seotud võimetele (Rubin *et al.*, 2014). Psühhoosi korral tekivad häired võrgustikus, mis hõlmab erinevaid aju piirkondi ja kindla neurotransmitteri keskseid radu. Hälbed neil tasanditel toovad esile psühhoosi sümptomid. Näiteks toimuvad mitmesugused muutused käitumises, kaob reaalsustaju, esinevad hallutsinatsioonid ja pettekujutelmad (Iwakura ja Nawa, 2013; Kesby *et al.*, 2018). Intellektuaalne jõudlus (ingl *intellectual performance*) halveneb juba mitu aastat enne psühhoosi ilmnemist ja häired kognitiivsetes, motoorsetes või sotsiaalsetes võimetes võivad esineda pikka aega enne skisofreenia diagnostilisi tunnuseid (Lewis ja Levitt, 2002; Jaaro-Peled *et al.*, 2009; Ayhan *et al.*, 2016).

Skisofreenia on peamiselt täiskasvanutel esinev kompleksne krooniline psüühikahäire, mis väljendub ebanormaalsetes vaimsetes funktsioonides ja segases käitumises (Lewis ja Lieberman, 2000; Jaaro-Peled *et al.*, 2009). Haiguse teket mõjutavad nii geneetilised kui keskkondlikud faktorid, sh lapsepõlves või nooruses kogetud traumaatilised sündmused ja stress. Kahjustused esinevad patsientide töömälus, täidesaatvates funktsioonides ja kognitiivsetes võimetes (Eichenbaum, 2017), millest enim paistavad silma just viimased (Lewis ja Lieberman, 2000; Lewis ja González-Burgos, 2008; Miller ja Rockstroh, 2016). Toimiv võrgustik on skisofreenikute ajus vähem paindlik kui kontrollisikutel, sealne kommunikatsioon on häiritud ja kognitiivsete võimete eest vastutavad piirkonnad on omavahel funktsionaalselt vähem seotud (Miller ja Rockstroh, 2016). Kognitiivse defitsiidi all kannatavatel skisofreenikutel on kahjustunud just prefrontaalkoore ja hipokampuse talitus. Hipokampuse kahjustustega seostatakse probleeme episoodilises mälus ja selle organiseerimises (Eichenbaum, 2017). Skisofreeniaga kaasnevaid kuulmise hallutsinatsioone seostatakse muutustega hipokampuse ja taalamuse vahelistes ühendustes ning seejuures esineb suurenenud taalamuse, juttkeha (ld *corpus striatum*) ja hipokampuse aktiivsus. Seevastu skisofreenikute pettekujutelmad on seotud hoopis prefrontaalkoore ning juttkeha- ja taalamusevaheliste ühendustega (Lewis ja Lieberman, 2000; Kesby *et al.*, 2018).

Skisofreenia sümptomid jaotatakse 3 gruppi (Jaaro-Peled *et al.*, 2009; Kesby *et al.*, 2018):

1. Positiivsed sümptomid - pettekujutelmad ja hallutsinatsioonid, mis on enim tajutavad akuutse psühhoosi korral. Suures osas toetub nendele sümptomitele skisofreenia

kliiniline diagnoosimine. Antipsühhootikumid vähendavad efektiivselt just positiivseid sümptomeid (Koido *et al.*, 2016). Halvenenud kognitiivset paindlikkust seostatakse süvenenud positiivsete sümptomitega.

2. Negatiivsed sümptomid - emotsionaalse väljenduse puudus ehk apaatia, anhedoonia, sotsiaalne võõrandumine (ingl *social withdrawal*).
3. Kognitiivsed sümptomid - probleemid õppimises, mälus, tähelepanus ja täidesaatvates funktsioonides. Kognitiivsed sümptomid esinevad skisofreenia korral enne positiivseid sümptomeid, kuid võivad jääda märkamatuks enne skisofreenia diagnoosi.

Psühhootiliste sümptomite tekkimine sõltub muutustest dopaminergilises talitluses. Presünaptiline dopamiini väärtalitus on skisofreenia korral psühhoosi vahendajaks ja subkortikaalsel hüperdopaminergial on otsene seos kognitiivsete kahjustustega (Kesby *et al.*, 2018). Dopaminergiline süsteem koosneb dopamiini sünteesivatest ja vabastavatest projektsioonineuronitest. Tänapäeval kasutuses olevad antipsühhootikumid blokeerivad dopamiini D2 retseptorid (Grace, 2016; Waltz, 2017). Ravimid (näiteks amfetamiin), mis viivad dopamiini vabastamiseni või vähendavad dopamiini tagasihaaret sünaptilisest pilust, süvendavad skisofreenikutel psühhoosi ning võivad korduval manustamisel kutsuda esile psühhoosilaadseid sümptomeid ka kontrollisikutel (Lewis ja Lieberman, 2000; Lewis ja González-Burgos, 2008; Skirzewski *et al.*, 2017; Kesby *et al.*, 2018). Amfetamiini poolt indutseeritud dopamiini vabastamine on võrreldes kontrollisikutega suurenenud skisofreenikutel korrelatsioonis psühhoosi sümptomitega nagu hallutsinatsioonid või pettekujutelmad (Lewis ja Lieberman, 2000). Suurenenud dopamiini vabastamine juttkehas viib positiivsete sümptomiteni, kuid vähenenud dopamiini signaliseerimine prefrontaalkoores viib kognitiivsete kahjustuste ja negatiivsete sümptomiteni (Ayhan *et al.*, 2016).

Skisofreenikutel on väiksem hipokampus kui tervetel indiviididel, vähenenud on just neuronite suurus ja erinevate sünapsidega seotud geenide ekspressioon (Lewis ja Lieberman, 2000). Hipokampuse anterioorne osa on neil hüperaktiivne (Grace, 2016). Antipsühhootiline ravi ei paranda patsiendi kognitiivseid funktsioone (Kesby *et al.*, 2018), vaid aeglustab haiguse progressiooni (Lewis ja Lieberman, 2000). Ebatavalised antipsühhootikumid on efektiivsed positiivsete sümptomite raviks, kuid need ei aita ravida negatiivseid või kognitiivseid sümptomeid. Tänapäeval püütakse välja töötada ravimeid, mille sihtmärgiks oleks glutamaatergiline süsteem ja eesmärgiks oleks tõsta NMDA (N-metüül-D-aspartaat) ehk glutamaadi retseptorite aktiivsust. See aitaks leevendada haiguse negatiivseid sümptomeid ja kognitiivset düsfunktsiooni (Hu *et al.*, 2015; Vullhorst *et al.*, 2015). Kognitiivsete ja negatiivsete sümptomite vähendamine läbi skisofreenia varajase diagnoosi ja ravi aitaksid

ennetada või vähendada süvenevat morbiidsust (Lewis ja Lieberman, 2000). Samas piisava tundlikkuse ja spetsiifikaga bioloogilisi markereid haiguse diagnoosimiseks ning raviks ei ole seni leitud. Nii skisofreenia markergeenide kui ka endofenotüüpide leidmine aitaksid haigust paremini ennetada ja ravida (Miller ja Rockstroh, 2016).

1.4. ErbB perekonna kinaasid

Inimesel on kokku 58 retseptor türosiinkinaasi, mis jagunevad 20 alam perekonda (Lemmon ja Schlessinger, 2010). Kõikidel retseptor türosiinkinaasidel on N-terminaalne ekstratsellulaarne ligandi siduv domeen ja tsütoplasmaatiline türosiin-kinaasi katalüütiline domeen, mis on seotud ühekordse transmembraanse heeliksiga. Sellest hoolimata on alam perekonnad üksteisest üsna erinevad. Nende seas on ka ErbB retseptor türosiinkinaaside perekond, kuhu kuulub 4 retseptorit: ErbB1, ErbB2, ErbB3 ja ErbB4. Neil on omavahel 40–50%-line struktuurne homoloogsus tsüsteiinirikastes rakuvälistes domeenides ja 60–80%-line homoloogsus rakusiseste domeenide järjestuses. Kinaasi domeeni piirab türosiini autofosforüleerimissaitidega karboksüterminaalne saba (Iwakura ja Nawa, 2013; Kovacs *et al.*, 2015).

ErbB perekonna liikmeid leidub mitmes ekto- ja mesodermaalset päritolu koes (Yarden ja Sliwkowski, 2001; Iwakura ja Nawa, 2013; Kovacs *et al.*, 2015), neid esineb nii arenevas kui küpses kesknärvisüsteemis (Futamura *et al.*, 2002; Iwakura *et al.*, 2005). ErbB retseptorid osalevad tähtsates rakulistes protsessides nagu proliferatsioon, kasv, migratsioon ja adhesioon (Yarden ja Sliwkowski, 2001; Kovacs *et al.*, 2015). ErbB valgud töötavad koos epidermaalse kasvufaktori ja selle derivaatidega (tabel 1). Nende signaliseerimine on reguleeritud SNP-dega, alternatiivsel splaissingul, proteolüütilisel töötlusel, intratsellulaarsel translokatsioonil ja ErbB signaalide ristumisel (Iwakura ja Nawa, 2013). Ligandi vahendatud retseptori endotsütoos lülitab ErbB signaliseerimise välja. ErbB retseptorite võrgustik võib lisaks oma sisenditele siduda ka heteroloogseid signaale, näiteks hormoone, neurotransmittereid ja stressi võimendajaid (Yarden ja Sliwkowski, 2001).

ErbB1 ehk EGFR ehk HER1 ekspresseeritakse keskajus, neokorteksi ja hipokampuse vahelistes interneuronites, hüpofüüsis, väikeajus Purkinje rakkude poolt. ErbB1 retseptorid on mitmetel GABAergilistel neuronitel. Neuraalsetes tüvirakkudes viib ErbB1 aktivatsioon nende rakkude proliferatsiooni ja migratsioonini (Nawa *et al.*, 2014). Retseptori aktiveerumine aitab kaasa dopaminergiliste neuronite ellujäämisele ja sünnijärgsele arengule (tabel 1). Mutatsioonid retseptoris võivad viia kasvajate tekkeni, nt EGFRvIII on ErbB1

mutant, millel ei ole ekstratsellulaarset EGFR domeeni ja selle tulemused on retseptor konstitutiivselt aktiivne (Yarden ja Sliwkowski, 2001).

Tabel 1. ErbB1-4 retseptorite ligandid, funktsioonid ja jaotumine ajus (Iwakura ja Nawa, 2013).

Retseptor	Ligandid	Kude	Rakutüüp	Funktsioon
ErbB1	EGF TGF α HBEGF AREG BTC EREG EPG	Subventrikulaarne ala	Neuraalsed tüvirakud	Rakujagunemine, migratsioon
		Keskaju	Dopaminergilised neuronid	Elulemus, areng
		Ajukoore, hipokampus	GABAergilised neuronid, Astrotsüüdid	Sünaptiliste funktsioonide regulatsioon, diferentseerumine
		Väikeaju	Purkinje rakud	Areng, rakujagunemine
		Hüpofüüs	Laktotroofid	Kortisooli ja prolaktiini tootmine ning vabastamine
ErbB2	Ei ole teada	Väikeaju Ajukoore Hipokampus Keskaju	Oligodendrotsüüdid, astrotsüüdid, gliiarakud	Rakujagunemine, diferentseerumine
ErbB3	NRG1 NRG2 NRG6	Ajukoore Hipokampus	Oligodendrotsüüdid	Müelinatsioon, rakkude küpsemine
ErbB4	HBEGF BTC EREG NRG1 NRG2 NRG3 NRG4 NRG5	Ajukoore, hipokampus	GABAergilised neuronid, astrotsüüdid, oligodendrotsüüdid	Pidurdatud sünaptiline funktsioon, rakujagunemine, diferentseerumine
		Väikeaju	Granulaarrakud	Sünaptiliste funktsioonide regulatsioon
		Keskaju	Dopaminergilised neuronid	Elulemus, pidurdatud sünaptiline funktsioon

ErbB2 ehk HER2 ekspressioon on kõrge neuraalsetes tüvirakkudes ja prekursorites ekspresseeritakse seda koos ErbB3-ga. ErbB2-l ei ole kindlat ligandi (Yarden ja Sliwkowski, 2001; Schneider ja Wolf, 2009; Mei ja Nave, 2014; Kovacs *et al.*, 2015), kuid seda retseptorit sisaldavad heterodimeerid on kõrgema afiinsusega ja laiema spetsiifikaga mitmete ligandide jaoks. Tegu on eelistatuima sekundaarse retseptoriga (Citri ja Yarden, 2006). Nii ErbB2 kui ka ErbB1 üleekspressioon esineb mitmetes vähirakkudes, eriti peetakse onkogeeniks ErbB2 (Garratt *et al.*, 2003). Selle tulemusel toimub ligandist sõltumatu dimeriseerumine iseendaga ja autofosforüleerimine (Iwakura ja Nawa, 2013).

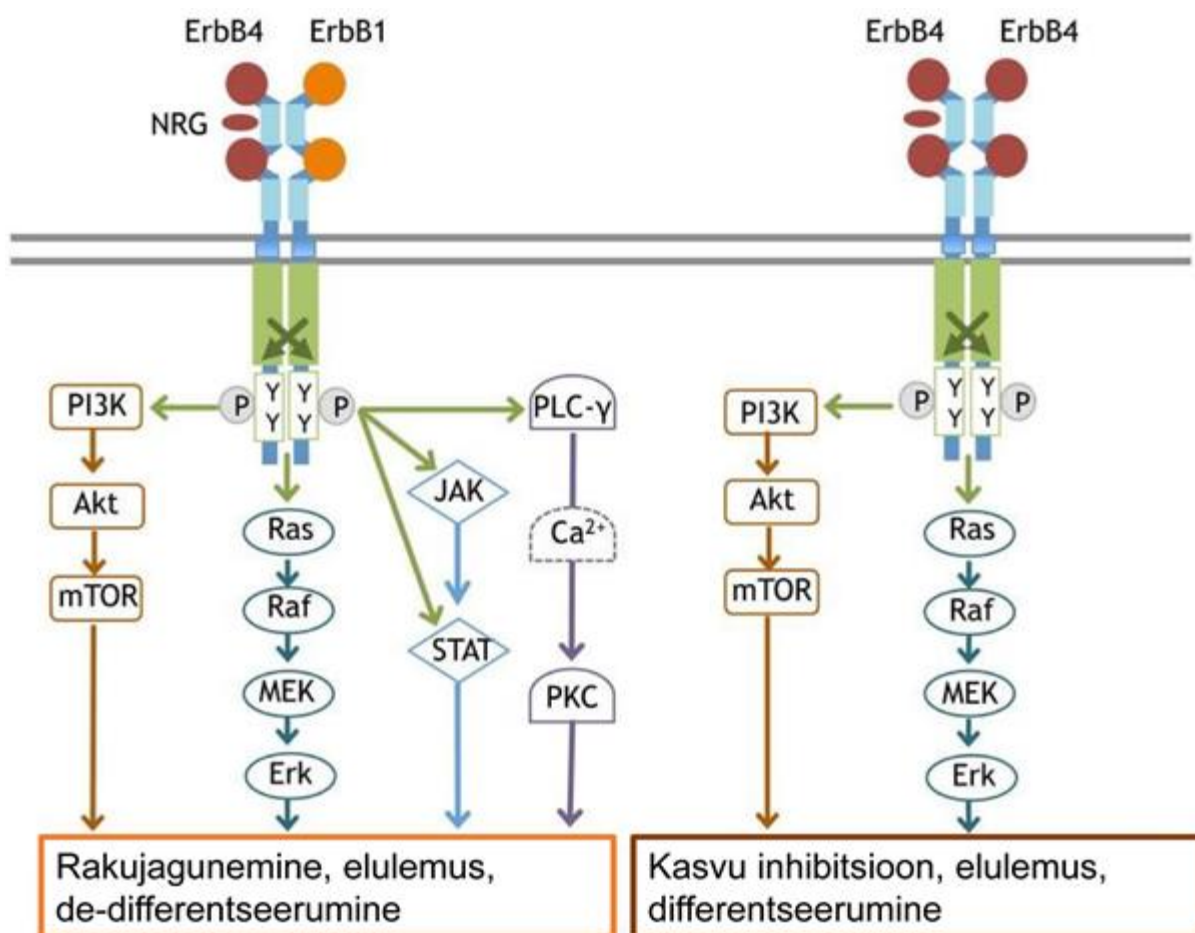
ErbB3 ehk HER3 on ajus kõrgelt ekspresseeritud oligodendrotsüütides ja nende prekursorites, Schwanni rakkudes (Nawa *et al.*, 2014), tagasihoidlikumalt ka hipokampuses (tabel 1). Kuna ErbB3 on madala kinaase aktiivsusega retseptor (selle kinaasne domeen on defektne), peab see signaali ülekandeks moodustama dimeeri mõne muu ErbB retseptoriga (Yarden ja Sliwkowski, 2001; Schneider ja Wolf, 2009; Iwakura ja Nawa, 2013; Mei ja Nave, 2014; Kovacs *et al.*, 2015). ErbB3 signaalid mängivad olulist rolli oligodendrotsüütide müelinatsioonil ja soolade juhtivusel närviimpulsil. ErbB3 aktivatsioon on seotud rakujagunemise ja diferentseerumisega. ErbB3 seob kõrge afiinsusega neureguliine. ErbB3 isovorme leidub eelkõige kortikaalsetes astrotsüütides ja nad võivad olla seotud NRG signaali nõrgestamisega (Iwakura ja Nawa, 2013).

ErbB4 ehk HER4 sarnaneb omadustelt ErbB1-le (Citri ja Yarden, 2006) ja selle ebanormaalset ekspressiooni peetakse üheks skisofreenia tekkepõhjuseks (Law *et al.*, 2007; Skirzewski *et al.*, 2017). ErbB4 reguleerib hipokampuse, keskaju, mediaalse prefrontaalkoore ja juttkeha dopaminergilistes neuronites dopamiini sünteesi ja vabastamist, ensümaatilist aktiivsust ja türosiin-hüdroksülaasi ekspressiooni (tabel 1) (Iwakura ja Nawa, 2013; Skirzewski *et al.*, 2017). ErbB4 seob sarnaselt ErbB3-le kõrge afiinsusega neureguliine. NRG1-ErbB4 kompleks reguleerib kesknärvisüsteemis neuraalsete- ja gliiarakkude arengut, aksonite müelinatsiooni, sünaptilist plastilisust ja neurotransmitterite retseptorite aktivatsiooni (Feng *et al.*, 2010; Mei ja Nave, 2014). ErbB4 ekspressiooni tõus avaldab mõju GABAergilistele ja dopamiini neuronitele ning väikeajule. ErbB4 aktivatsioon reguleerib GABAergilistes neuronites glutamaadi retseptorite aktiivsust ja/või ekspressiooni (Iwakura ja Nawa, 2013).

Nii ErbB3 kui ErbB4 kasutavad signaali ülekandeks koretseptorina ErbB2, moodustades ErbB2/ErbB3 ja ErbB3/ErbB4 dimeere (Garratt *et al.*, 2003). ErbB2/ErbB3 heterodimeer võib häälestada mitogeenset signaliseerimist. Eraldi seisvalt ErbB2 ja ErbB3 ükski ligand neid ei aktiveeri, kuid nende retseptorite heterodimeer on kõige muutuavam ja mitogeensem retseptor-

kompleks (Yarden ja Sliwkowski, 2001; Citri ja Yarden, 2006; Schneider ja Wolf, 2009). Perifeerses närvisüsteemis edastab ErbB2/ErbB3 heterodimeer NRG1 signaale, mis on vajalik Schwanni rakkude normaalseks arenguks (Garratt *et al.*, 2003). ErbB2/ErbB4 dimeer mõjutab hipokampuse rakkude diferentseerumist. ErbB1/ErbB3 heterodimeer moodustub astrotsüütides ja edastab NRG-sõltuvaid signaale. EGF kutsub seega läbi ErbB1/ErbB3 dimeeri esile neureguliinidest lähtuvat retseptori aktivatsiooni (Iwakura ja Nawa, 2013).

1.4.1. ErbB retseptorite signaaliradade mõju



Joonis 2. ErbB retseptorite homo- ja heterodimerisatsioon ning nendega kaasnevate signaaliradade ülekande tulemus (Iwakura ja Nawa, 2013 põhjal).

ErbB retseptorid peavad aktiveerumiseks seostuma ligandiga (Yarden ja Schlessinger, 1987). Igal ligandil on kindel eelistus, millise ErbB valguga seostuda. Sõltumata seotud ErbB alamtüübist edastatakse signaalid nii ligandilt kui retseptorilt. Kõik EGF perekonna liikmed seostuvad ErbB retseptor türosiinkinaasidega (Nawa *et al.*, 2014). Retseptori ekstratsellulaarsed osad võtavad signaale vastu peptiidhormoonide või pinnavalkudena, vastusena aktiveeritakse intratsellulaarsed türosiinkinaasid. Pärast ligandi seondumist tekivad

homo- või heterodimeerid. Retseptori dimeriseerumine aktiveerib türosiinkinaasi domeeni, võimaldab ErbB partneri intratsellulaarse osa fosforüleerimist ja signaali edasi juhtimist mööda erinevaid signaaliradu (joonis 2) (Iwakura ja Nawa, 2013).

1.5. ErbB retseptorite ligandid

13 ligandi võivad aktiveerida ErbB molekule (Kesby *et al.*, 2018). ErbB ligandide kaks perekonda on (Iwakura ja Nawa, 2013):

1. EGF perekond, kuhu kuuluvad EGF (epidermaalne kasvufaktor), HBEGF (hepariinseoseline EGF-laadne kasvufaktor), BTC (beetatselluliin), TGF α (transformeeruv kasvufaktor α), AREG (amfireguliin), EREG (epireguliin) ja EPG (epigeen);
2. NRG perekond, kuhu kuuluvad NRG1 (neureguliin-1), NRG2 (neureguliin-2), NRG3 (neureguliin-3), NRG4 (neureguliin-4), NRG5 (neureguliin-5) ja NRG6 (neureguliin-6).

Suurem osa ligandidest on membraanseoselised prekursorid, mis seostuvad ErbB retseptoritega. Need sünteesitakse transmembraansete valkudena, millel on N-terminaalne osa, EGF domeen, lühike jukstamembraanne vars, hüdrofoobne transmembraanne domeen ja karboksüterminaalne fragment. Kuuest konserveerunud tsüsteiinist koosnev EGF domeen on ligandi keskseks funktsionaalseks ja struktuurseks üksuseks ning vastutab retseptoriga seostumise eest (Harris, 2003; Schneider ja Wolf, 2009). Ligandid erinevad üksteisest nii valgujärjestuste kui biokeemiliste omaduste poolest, kuid ometi reguleerivad need aju arengut ja funktsioone, mistõttu võivad hälbled neis faktorites viia mitmete neuroloogiliste häireteni (Schneider ja Wolf, 2009). Ligandid ei toimi üksinda isoleeritult, kuid mõjutavad teineteist, et saavutada bioloogilistes vastustes läbi ErbB signaliseerimise võimalikult mitmekesine repertuaar (Singh *et al.*, 2016). EGF perekonna valgud vabanevad nii sekretoorsetest vesiikulitest kui ka membraanseoseliste prekursorite proteolüütilisel protsessimisel (ingl *Shedding*). EGF perekonna liikmed on ajus neurotroofseteks molekulideks ning võimendavad tüvirakkude jagunemist ja neuronite diferentseerumist (Futamura *et al.*, 2002). Retseptoriga seostumisel suurendatakse rakkude ellujäämist ja kasvamist ning mõjutatakse kesknärvisüsteemi sünaptiilist plastilisust (Iwakura *et al.*, 2005).

ErbB retseptoritega seonduvad ligandid võib jagada nelja gruppi (Chen *et al.*, 2016). Esimesse gruppi kuuluvad ligandid seostuvad ainult ErbB1-le. Nendeks on EGF, AREG,

TGF α ja EPG. EGF seostub ainult ErbB1-le (Nawa *et al.*, 2014), põhjustades retseptori dimeriseerumise ErbB2-, ErbB3- või ErbB4-ga (Futamura *et al.*, 2002). EGF-i poolt indutseeritud ErbB1 signaliseerimine võimendab intratsellulaarsete reaktiivsete hapnikuühendite tootmist. AREG on mitogeen astrotsüütides, Schwanni rakkudes ja fibroblastides. AREG leevendab vigastusi epiteelirakkudes ja reguleerib lõpliku luumassi moodustumist (Schneider ja Wolf, 2009; Singh *et al.*, 2016). TGF α ekspresseerub kõikides aju piirkondades, nii neuronites kui gliiarakkudes (Futamura *et al.*, 2002). TGF α *knockout* hiirtel on nähtud karvanääpsude ja silmalaugude sulgumise defekte. EPG on madala afiinsusega, kuid kõrge mitogeense aktiivsusega ligand (tabel 2) (Singh *et al.*, 2016), mis ekspresseerub täiskasvanud hiirtel testises, maksas ja südames (Strachan *et al.*, 2001).

Teise gruppi kuuluvad ligandid seonduvad nii ErbB1-le kui ErbB4-le. Nendeks ligandideks on BTC, HBEGF ja EREG (Chen *et al.*, 2016). BTC tootmine on luukasvajate korral osteoblastides üles reguleeritud. BTC vahendab interferoonide vastust ja võimendab nende viirusvastast tegevust (Singh *et al.*, 2016). HBEGF ekspressioon on kõrge väikeajus, hipokampuses, ajukoos, subventrikulaarses alas ja ajutüves (Harris, 2003). HBEGF seostub ErbB1- ja ErbB4-ga (Nawa *et al.*, 2014) ning seejuures on HBEGF ainus ligand EGF perekonnas, mille puudumine põhjustab kohese surma sünnijärgselt (Schneider ja Wolf, 2009). HBEGF seostub ErbB1-le suurema afiinsusega kui EGF (tabel 2). EREG on normaalsetes rakkudes madalalt ekspresseeritud, kuid vähirakkudes on üle-ekspresseeritud. Mitmed stressi seisundid nagu põletikud, isheemia ja hüpoksia indutseerivad EREG ekspressiooni ajus, sh hipokampuses (Singh *et al.*, 2016).

Kolmas grupp koosneb neureguliinidest, mis seonduvad ainult ErbB4-le. Nendeks on NRG1, NRG2, NRG3, NRG4, NRG5. Neljandasse gruppi kuuluvad neureguliinid, mis seonduvad nii ErbB3-le kui ErbB4-le. Nendeks on NRG1, NRG2 ja NRG6 (Chen *et al.*, 2016). NRG1 ekspresseeritakse kesknärvisüsteemi sünapsides ning see osaleb glutamaadi retseptorite ekspressioonis ja aktivatsioonis. NRG1 suurendab hipokampuses GABAergilist ülekannet (Chen *et al.*, 2010). *Nrg1* mutatsiooniga hiirtel esinevad käitumishäired (Stefansson *et al.*, 2002). NRG2 ekspressioon on ajus kõrgeim hipokampuses, väikeajus ja haistesibulas. NRG2 seostub GABAergilistes interneuronites ErbB4 ja NMDA retseptoritega (Vullhorst *et al.*, 2015). NRG3 mängib olulist rolli embrüonaalse ajukoore arengus. *Nrg3* peetakse skisofreenia, aktiivsus- ja tähelepanuhäire ning Alzheimeri tõve riskigeeniks. Kognitiivsete kahjustuste korral esinevad mutatsioonid *Nrg3* geenis (Kao *et al.*, 2010; Mei ja Nave, 2014). NRG4 ekspresseeritakse peamiselt kõhunäärmes ja seost skisofreeniaga ei ole leitud (Benzel

et al., 2007). NRG5 kutsutakse ka tomoreguliiniks. NRG6 korral on tegu neuroglükaaniga (Kinugasa *et al.*, 2004; Iwakura ja Nawa, 2013; Mei ja Nave, 2014).

Tabel 2. ErbB1-4 ligandide seostumise afiinsus (Jones *et al.*, 1999).

Retseptor või retseptorite dimeer	Ligandide afiinsus
ErbB1	TGF α , EGF, BTC, HBEGF > EREG
ErbB1/ErbB2	TGF α , EGF, BTC, HBEGF > EREG
ErbB3	NRG1 β > NRG1 α
ErbB2/ErbB3	NRG1 β > NRG1 α > NRG2 β , EREG
ErbB4	BTC, NRG1 β , NRG2 β > NRG2 α > NRG3
ErbB2/ErbB4	BTC, NRG1 β , NRG2 β > NRG1 α , EGF > NRG3, EREG, HBEGF, TGF α , NRG2 α

1.6. NRG-ErbB võrgustik

Kesknärvisüsteemis on oluline roll NRG-ErbB võrgustikul. Neid valke seostatakse komplekssete häiretega nagu skisofreenia, bipolaarne häire ja depressioon (Jaaro-Peled *et al.*, 2009; Mei ja Nave, 2014). EGF mängib rolli ajustruktuuride üldises arengus ning selle retseptoreid esineb laialdaselt arenevas ja küpses kesknärvisüsteemis. EGF perekonna ligandide ja ErbB retseptorite ebatavaline ekspressioon ilmneb nii akuutse kui kroonilise pühhoosi patsientidel kesksetes ja perifeersetes kudedes. ErbB1 üles reguleerimist on skisofreenikutel täheldatud eesaju piirkonnas (Futamura *et al.*, 2002; Iwakura *et al.*, 2005; Iwakura ja Nawa, 2013; Nawa *et al.*, 2014; Koido *et al.*, 2016). EGF signaalid on kesknärvisüsteemis tugevalt seotud dopaminergiliste radade arenguga. EGF valgud aitavad dopaminergilistel neuronitel vältida apoptoosi (Futamura *et al.*, 2002). Parkinsoni tõve korral toimub keskaju dopaminergiliste neuronite neurodegeneratsioon ning seejuures väheneb nii EGF kui ErbB1 tase (Iwakura *et al.*, 2005; Iwakura ja Nawa, 2013).

Nrg1 liiga kõrge ekspressioon tekitab häireid glutamaatergilises ülekandes ning viib käitumishäirete ja sünaptiliste kahjustusteni (Mei ja Nave, 2014). NRG1-ErbB4 kaskaad reguleerib ajus sünaptilist plastilisust (Jaaro-Peled *et al.*, 2009), neuronite ja gliiarakkude arengut, aksonite müelinatsiooni, neurotransmitterite retseptorite ekspressiooni ja aktivatsiooni (Feng *et al.*, 2010). ErbB4 on vajalik GABAergiliste sünapside küpsemiseks

hipokampuse interneuronites läbi NRG1 aktivatsiooni retseptorile seondumisel (Mei ja Nave, 2014). Skisofreenia patsientidel esineb hälbeid NRG1-ErbB4 kaskaadis või aktiivsuses mitmes aju piirkonnas, sh hipokampuses (Chen *et al.*, 2010). NRG1 ja ErbB4 taset saab võimendada antipsühhootikumide kroonilise manustamisega normaalsetel indiviididel. NMDA retseptori korduv blokeerimine tõstab NRG1 ja ErbB4 ekspressiooni, mis viitab sellele, et nii NRG1 kui ErbB4 ekspressioon on seotud NMDA retseptori toimimisega. Selle põhjuseks on ilmselt ErbB4 paiknemine koos NMDA retseptoritega samades postsünaptilistes saitides (Mei ja Nave, 2014). *NRG1-3* ja *ErbB4* mutatsioonidega indiviididel ilmnevad psühhiaatrilistele haigusseisunditele omased käitumishäired (Skirzewski *et al.*, 2017).

Skisofreenia, depressiooni ja teiste psühhiaatriliste häirete korral on märgatud ebanormaalselt *Disc1* ekspressiooni. DISC1 on *Disc1* poolt kodeeritud valk, mis vahendab mitmeid rakulisi protsesse ning on oluline neuronite arenguks ja signaali ülekandeks (Seshadri *et al.*, 2015). *Disc1* mutatsioon leiti algselt ühest Šoti suguvõsast, kus esines skisofreeniat. Tänapäeval on DISC1 üks peamisi mentaalsete haiguste riskifaktoreid. DISC1 on kõrgelt ekspresseeritud arenevas ajukoos ja täiskasvanul hipokampuses. DISC1 häireid täiskasvanu hipokampuses seostatakse tujude kõikumiste ja skisofreeniaga (Jaaro-Peled *et al.*, 2009). DISC1 seondub mitmete võtmevalkudega, mis reguleerivad sünaptilist küpsemist ja plastilisust. Neuronaalse plastilisusega on seotud ka NRG1-ErbB4 kaskaad. Nii ErbB4 kui DISC1 paiknevad glutamaatergiliste sünapside postsünaptilises osas, kus asuvad mitmed teisedki skisofreenia riskifaktorid (Jaaro-Peled *et al.*, 2009). DISC1 vähendab NRG1 poolt indutseeritud ErbB4 aktivatsiooni ja signaliseerimist. Kuna nii DISC1 kui ErbB4 seonduvad PSD-95-le (postsünaptiline tihedusvalk 95), võib DISC1 mõjutada interneuronites NRG1-ErbB4 signaliseerimist PSD-95 kaudu. NRG1-ErbB4 signaliseerimine peab jääma mingisugusesse optimaalsesse vahemikku, sest nii selle alla- kui ka üles reguleerimine viib kognitiivsete häireteni ja skisofreeniale omaste sümptomite tekkeni (Seshadri *et al.*, 2015).

1.7. Loommudel

Klassikalised laboris kasutatavad hiireliinid on C57BL/6Ntac (Bl6) ja 129S6/SvEvTac (129Sv). Bl6 hiired on aktiivse eluviisiga, kuid 129Sv liini esindajad on alalhoidlikud ja passiivsed (Heinla, 2016). Skisofreenia loomudelitel eesmärgiks on kutsuda esile häire peamisi tunnusoone, näiteks käitumismudelid jäljendavad patsientidel vaadeldud käitumishäireid ja sümptomeid (Ayhan *et al.*, 2016). Positiivsete sümptomite mõõtmiseks kutsutakse loomudelitel psühhos esile amfetamiini manustamise läbi. Amfetamiin

tõhustab nii inimestel kui närilistel dopamiini vabastamist ajus, mis viib psühhoosilaadsele seisundile omaste sümptomiteni. Pärast psühhostimulantide manustamist näitab enamus skisofreenia loomudelitest suurenenud liikumisaktiivsust. Skisofreenikud on amfetamiini mõjule palju tundlikumad ning pärast amfetamiini manustamist suureneb neil dopamiini vabastamise võime, mis on seotud haiguse positiivsete sümptomitega (Kesby *et al.*, 2018).

Neurotroofsete faktorite (näiteks EGF) rolli uurimiseks skisofreeniaga kaasnevates neuroloogilistes häiretes manustati rottidele ja hiirtele subkutaanselt EGF-i loomade erinevates arenguetappides. Vastsündinute kokkupuude EGF-iga viis ErbB retseptorite fosforüleerimiseni ajus ja seeläbi mitmete käitumuslike häireteni nagu hirmutunne, sotsiaalse käitumise halvenemine, suurem tundlikkus metamfetamiini ja D2 retseptori antagonistile. Häired kestsid üle viie kuu. Huvitaval kombel ei esinenud eeltoodud sümptomeid aga täiskasvanud loomadel. Sarnased olid tulemused ka ahvidel tehtud uuringutel (Nawa *et al.*, 2014). Lisaks EGF-i manustamisele on uuritud EGF-i või NRG1 üle-ekspresserivaid transgeenseid hiiri (vastavalt EGF-Tg ja NRG1-Tg). Nende ligandide ekspressioon oli võrreldes perifeersete kudede kõrge kesknärvisüsteemis. EGF-Tg hiirtel nähti puudujääke kontekstipõhises õppimises ja sotsiaalses võimekuses, samuti madalamat prepulsi inhibeerimist kui metsiktüüpi liigikaaslastel. Seega üldiselt sarnaneb EGF-Tg hiir sellele, kellele EGF-i süstiti. NRG1-Tg hiirtel suurenes lokomotoorne aktiivsus, alanesid prepulsi inhibeerimine ja kontekstipõhine hirmu tunne ning esinesid häired dopaminergilises süsteemis. Üldiselt vähenesid aga mõlema transgeense grupi sotsiaalsed võimed (Nawa *et al.*, 2014).

Uuringud loomudelitel on näidanud, et ErbB1 on skisofreenia korral üles reguleeritud. ErbB1 akuutne ja subkrooniline aktivatsioon vabastab dopamiini juttkehast või kahkjaskerast (ld *globus pallidus*), mis viib skisofreeniale omaste käitumishäireteni. Vastupidiselt dopamiini neuronitele avaldatud mõjule reguleerivad ErbB1 ligandid negatiivselt GABAergilist arengut neokorteksis ja võimendavad nende neuronite glutamaadi retseptorite kanalite aktiivsust (Iwakura ja Nawa, 2013). 129Sv liini *ErbB-1 knockout* hiired surid tiinuse ajal ja B16 hiired sündides. Neil esinesid nii defektid ajus kui kõrvalekalded epiteelrakkude migratsioonis, proliferatsioonis ja diferentseerumises. Ellujäänutel esines hiireliinist sõltumatult progresseeruv neurodegeneratsioon (Citri ja Yarden, 2006). *Disc1 knockout* hiirtel esinevad arengu käigus häired interneuronite migratsioonis ja õiges paigutuses ning sünapside moodustamises (Seshadri *et al.*, 2015). *Disc1 knockout* hiirtel esineb vähenenud neuraalsete eellasrakkude proliferatsioon ja enneaegne neuronite diferentseerumine arenevas ajukoos. 129Sv hiirtel on *Disc1* geenis eksoni deletsioon (Jaaro-Peled *et al.*, 2009).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Käesoleva töö üldine eesmärk on karakteriseerida amfetamiini poolt indutseeritud psühhoosi mõjul aset leidvaid muutusi hiire hipokampuses ja tuvastada ErbB perekonna retseptorite ekspresioonimustri muutusi Bl6 ja 129Sv hiire liinis.

1. Töö käigus määratakse mõlema hiireliini kolme katsegrupi (saliin - SAL, akuutne - AK, krooniline - KR) järgnevate geenide ekspressiooni tasemed: *ErbB1*, *ErbB2*, *ErbB3*, *ErbB4*, *Egf*, *Hb-Egf*, *Btc*, *Tgfa*, *Disc1*, *Nrg1*, *Nrg2* ja *Nrg3*.
2. Töös võrreldakse hiireliinide vahelisi erinevusi geeniekspressiooni tasandil hiire hipokampuses
3. Töös arutletakse hiireliini sobilikkuse üle psühhoosi uurimiseks.

Töö on osa Tartu Ülikooli Bio- ja siirdemeditiini instituudis füsioloogia osakonnas läbi viidavast suuremast uurimustööst, mille eesmärk on leida varajasi psühhoosi või esmase psühhoosi markereid ning selle kaudu heita valgust psühhoosi tekkimise molekulaarsetele mehhanismidele.

2.2. Materjal ja meetoodika

2.2.1. Katseloomad

Katseloomad olid Tartu Ülikooli Bio- ja siirdemeditsiini instituudi katseloomakeskuse vivaariumis (Ravila 14b, Tartu) kasvatatud metsiktüüpi 129S6/SvEvTac (129Sv) ja C57BL/6Ntac (B16) isased hiired (*Mus musculus*), keda hoiti 1290D Eurostandard tüüp III puurides 425 mm × 276 mm × 153 mm (Tecniplast, Itaalia). Allapanu oli haava hake (vahetus 1x nädalas) ja pesamaterjal haava laastud (vahetus 1x nädalas). Hiiri hoiti temperatuuril 22 °C +/- 1 °C 12-tunnisel valge-pime režiimil (valge 07:00-19:00). Toit ja vesi olid vabalt kätte saadavad, va 1 tund enne testi ja 1 tund testi ajal. Puuris hoiti 6-10 katselooma, kokku 71 isendit. Katse alguses oli loomade vanus 6-9 nädalat ja katse lõpuks 8-11 nädalat. Katses kasutati mõlema liini kolme gruppi hiiri (tabel 3):

1. Kontrollgrupp – süstiti füsioloogilist lahust ehk saliini (SAL);
2. Akuutse manustamise grupp – süstiti füsioloogilist lahust ja viimasel päeval amfetamiinilahust (AK);
3. Kroonilise manustamise grupp – süstiti amfetamiinilahust (KR).

Tabel 3. Katseloomade grupid, isendite arv grupis ja töötlus katse vältel.

Grupp	Isendite arv	1. ja 2. päev	3. kuni 12. päev	13. päev
B16 SAL	13	Kohanemine	füsioloogiline lahus (0,9% NaCl)	füsioloogiline lahus (0,9% NaCl)
B16 AK	14	Kohanemine	füsioloogiline lahus (0,9% NaCl)	amfetamiin füsioloogilises lahuses
B16 KR	13	Kohanemine	amfetamiin füsioloogilises lahuses	amfetamiin füsioloogilises lahuses
129Sv SAL	8	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

Isendid kaaluti enne igat manustamist, arvutati vajalik lahuse kogus ning vastav lahus (füsioloogiline lahus, füsioloogiline lahus koos amfetamiiniga) manustati intraperitonaalselt 10 ml keha kilogrammi kohta. Amfetamiini doos füsioloogilises lahuses oli 3 mg keha kilogrammi kohta.

Katsed viidi läbi Tartu Ülikooli füsioloogia osakonna laboris. Loomadega töötas vastavat kvalifikatsiooni omav spetsialist. Käesoleva töö autor osales loomkatsetel vaatlejana. Katse läbiviimiseks oli väljastatud Eesti Vabariigi Maaeluministeriumi Loomkatseprojekti loakomisjoni poolt luba (4.05.2016 nr 87).

2.2.2. Koeproovid

Antud etapp viidi läbi vastava ala spetsialisti poolt. Kõik katseloomad surmati 1 tund pärast viimast manustamist 13. päeval läbi tservikaalse dislokatsiooni. Järgnevalt eraldati jääl katseloomadelt erinevad aju osad (frontaalkoor, amügdala ehk mandelkeha, hipokampus, dorsaalne striatum ehk dorsaalne juttkeha, ventraalne striatum ehk ventraalne juttkeha, keskaju), mis jahutati koheselt vedelas lämmastikus. Eraldatud kudesid hoiti -80 °C külmkapis kuni järgmise etapi alguseni. Käesolevas töös keskenduti hipokampusele.

2.2.3. RNA eraldamine

RNA eraldamiseks kasutati happelist guanidiin-isotiotsüanaat/fenool/kloroform meetodit ja eraldus viidi läbi, kasutades TRI reagenti (Molecular Research Center Inc, USA). Vaatamata TRI reagentis sisalduvale guanidiin-isotsüanaadile, mis toimib kui RNAasi inhibiitor, viidi RNA eraldus läbi jääl eemal RNAasi ensümaatilise aktiivsuse optimumist. RNA eraldamisel kasutati modifitseeritud Molecular Research Center Inc protokollid.

Sügavkülmutatud ajukude kaaluti koheselt, asetati jääle ja lisati 100 µl külma TRI reagenti. Kude uhmerdati jääl ja lisati veel külma TRI Reagenti kuni 500 µl mahuni ning inkubeeriti jääl 5 min. Järgnevalt lisati 200 µl kloroformi (Sigma-Aldrich, Saksamaa) ja segati vorteksil u 15 sek kuni segu oli ühtlaselt roosat värvi ning inkubeeriti jääl 5 min. Proove tsentrifugeeriti 15 min 2 °C 12000g (10630 rpm, r = 95 mm, Eppendorf 5810/R Bench Topp, Saksamaa). Järgnevalt tõsteti vesifaas uude tuubi ning orgaaniline faas säilitati jääl DNA ja valgu eraldamiseni, millele antud töös ei keskendutud. RNA sadestamisel vesifaasi supernatandist lisati 500 µl isopropanooli (Sigma-Aldrich, Saksamaa) ja inkubeeriti külmruumis loksutil 30 min 4 °C juures. RNA tsentrifugeeriti põhja 15 min 2 °C 14000g (11481 rpm, r = 95 mm) või

kuni RNA sadenes tuubi põhja hallika pelletina. Supernatant valati ettevaatlikult ära ning pelletile lisati 1 ml -20 °C 75% etanooli. Järgnevalt tsentrifuugiti proove 10 min 2 °C 7500g (5974 rpm, r = 95mm). Lahusti valati ettevaatlikult ära ning eelnevat etanooli nn „pesu“ korrati veel 2 korda. Pärast pesu jäeti pelletid toatemperatuurile kuivama u 10 min. Kui pelett oli kuiv, lisati 30 µl 50 °C vett (MilliQ), segati vorteksil ning tsentrifuugiti põhja (*spin-down*). Kontsentratsioonid mõõdeti NanoDrop ND-1000 spektrofotomeetril (NanoDrop Technologies, USA). Järgnev RNA lahust säilitati -80 °C juures.

2.2.5. Dnaasi I töötlus

cDNA süntees algas eraldatud RNA lahuse DNAas töötusega. DNAas töötlus on vajalik eralduse käigus lahusesse jäänud genoomse DNA eemaldamiseks.

Käesolevas töös kasutati tootja protokolle ja reaktsioonikomplekte:

1. RNAas-i vaba DNAas I (Life Technologies Corporation, USA)
2. SuperScript III pöördtranskriptaas (Invitrogen, USA)

DNAas töötluks tõsteti sügavkülmutatud RNA proovid jääle. Vastavalt eelnevalt mõõdetud kontsentratsioonidele tõsteti uude tuubi RNA lahust ja vett (Milli-Q) kuni 21 µl mahuni. Järgnevalt lisati 3 µl 10x DNAas I puhverlahust (Life Technologies Corporation, USA) ja 3 µl DNAas I ensüümi (Life Technologies Corporation, USA). Segu segati vorteksil, tsentrifuugiti põhja (*spin-down*) ning seejärel inkubeeriti 37 °C juures 30 min. Reaktsioon peatati 3 µl 50 mM EDTA lahuse (Life Technologies Corporation, USA) lisamisega. Järgnevalt segu segati vorteksil ja tsentrifuugiti põhja (*spin-down*) ning inkubeeriti 65 °C juures 10 min. Siis tõsteti proovid jääle jahtuma. Igast proovist võeti 1+1 µl lahust eraldi tuubidesse, et hiljem vajadusel RNA kvaliteeti hinnata. Proovid säilitati -20 °C juures.

2.2.6 cDNA süntees

Esmalt lisati DNAas I töödeldud RNAle vett kuni 11 µl lõppmahuni nii, et lõplik RNA hulk cDNA sünteesilahuses oleks 3 µg. Saadud lahusele lisati 2 µl I segu. I segu koosnes 2 µl 50 µM heksameersete praimerite segu (Applied Biosystems, USA) + 1 µl 10 mM dNTP segu [10mM iga nukleotiidi] (Fermentas, USA) + 1 µl vett (Milli-Q). Segu inkubeeriti praimerite seondumiseks kõigepealt temperatuuril 65 °C 5 min ning siis jääl 5 min. Segu tsentrifuugiti põhja (*spin-down*) ja lisati 1 µl segu II, mis koosnes 4 µl 5X *First-Strand Buffer* (Invitrogen, USA) + 1 µl 0,1 M DTT (Invitrogen, USA) + 1 µl SuperScript III pöördtranskriptaasi.

Järgnevalt segati segu vorteksil ja tsentrifuugiti põhja (*spin-down*) ning inkubeeriti 25 °C 10 min ning seejärel 50 °C 60 min. Reaktsiooni peatamiseks tõsteti temperatuur 70°C ja hoiti selle juures 15 min. cDNA kontsentratsioonid mõõdeti NanoDrop ND-1000 spektrofotomeetril (NanoDrop Technologies). Proovid säilitati -80 °C juures.

2.2.7. qPCR

qPCR analüüsil kasutati tootja 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix (Solis Biodyne, Eesti) protokoll ja reagente. Seade, mille abil katsed sooritati, oli QuantStudio 12K Flex (Applied Biosystems, USA). Esmane andmete kogumine ja töötlus toimus QuantStudio 12K Flex Software 1.2.2 tarkvaraga. Praimerite disainimiseks kasutati Primer3Plus vabavaralist tarkvara. Praimerid telliti (Biosearch Technologies, Taani) ja nende sobilikkust katsetati geelelektroforeesil ning seejärel qPCR analüüsiga. Referentsidena kasutatud koduhoidjageen *Hprt* valiti lähtuvalt selle varasemalt tõendatudstabiilsusest ja efektiivsusest (Vanaveski *et al.*, 2017). Ühel qPCR plaadil (Thermo Scientific, USA) teostati korraga ühe geeni uuring. Selleks kanti plaadile kõikide isendite proovid nelja üksiku kordusena, et oleks võimalik selgelt hälbivad üksikud kordused eemaldada.

2.2.8. Andmete statistiline analüüs

qPCRi andmed eksporditi QuantStudio 12K Flex Software 1.2.2 tarkvarast Exceli failina. Hälbijate eemaldamine ja andmete puhastamine teostati, põhinedes tarkvara soovitudele ja kõvera kvaliteedile, mida hinnati visuaalselt. Andmed viidi Excelis $2^{-\Delta CT}$ kujule koduhoidja (*Hprt*) suhtes. Statistilise testi valikuks analüüsiti esmalt normaaljaotusele vastavust ning sellest lähtuvalt tehti otsus kasutada mitteparameetrist (Kruskal-Wallise testi. Kruskal-Wallise testi korral oli *post hoc* testiks Dunni test. Statistiliselt oluliseks tulemuseks loeti $p \leq 0,05$. Statistiline analüüs sooritati ja graafikud koostati GraphPad Prism 7 tarkvaraga (GraphPad Software Inc, USA). Tulemused on toodud tabelis 4 (lisa 1) ja tabelis 5 (lisa 2). Graafikutel on tulemused väljendatud keskväärtuse ja koos 95% usalduspiiridega. Statistiliselt olulised tulemused on esile toodud horisontaalsete joontega ja statistilise olulisuse määr *post hoc* testis on omakorda märgistatud kas * ($0,01 < p < 0,05$) või ** ($p < 0,01$).

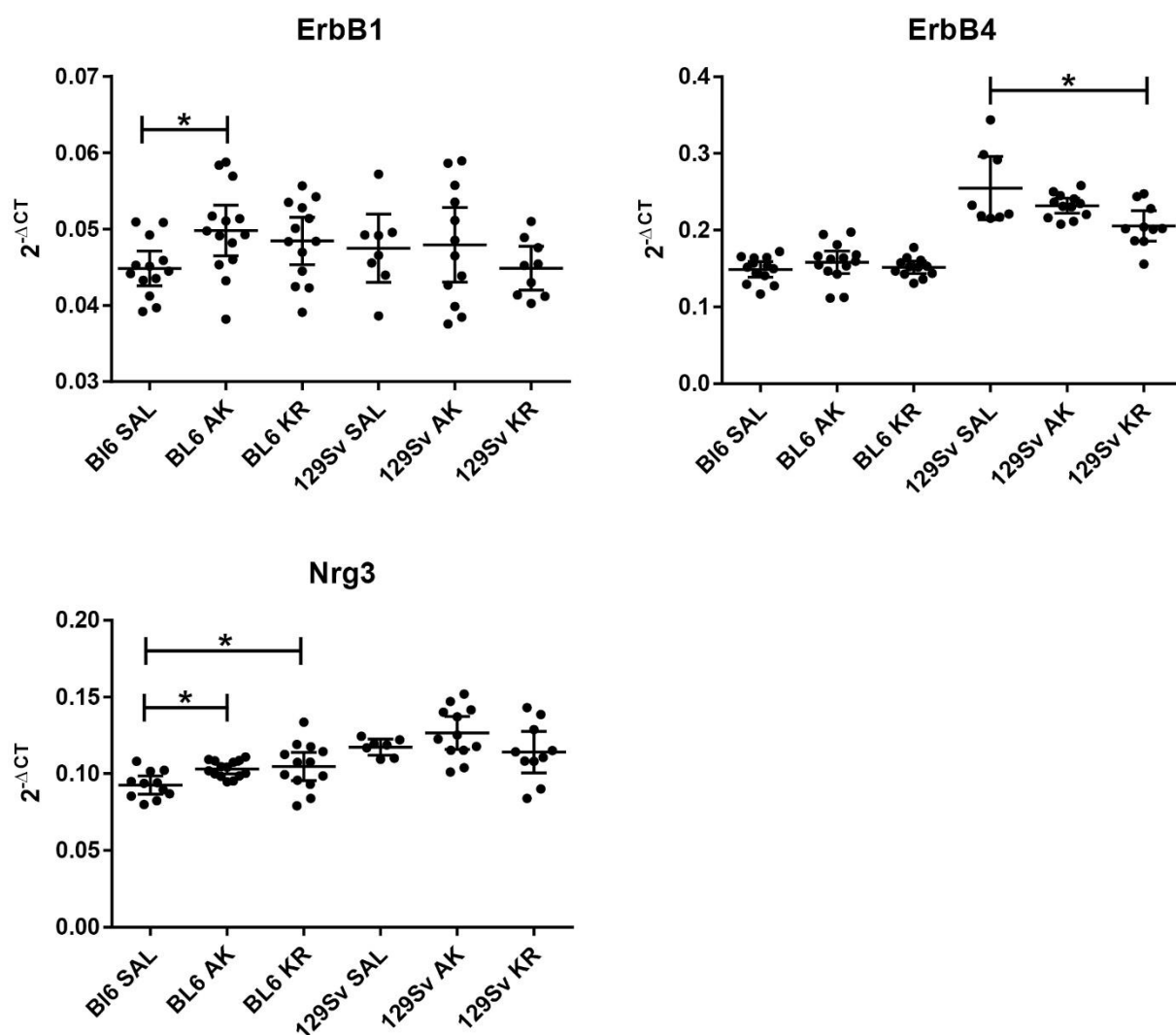
2.3. Tulemused

Käesolevas töös uuriti 12 geeni ekspressiooni muutust hipokampuses amfetamiini kroonilise ja akuutse manustamise järel indutseeritud psühhoosi mudelis kahes hiireliinis (Bl6 ja 129Sv). Katseloomad kummastki liinist jaotati kolme gruppi: kontrollgrupp (SAL - süstiti füsioloogilist lahust), akuutse manustamise grupp (AK - süstiti füsioloogilist lahust ja viimasel päeval amfetamiinilahust) ja kroonilise manustamise grupp (KR - süstiti amfetamiinilahust). Analüüsitavateks geenideks olid *ErbB1-4*, *Egf*, *Hb-Egf*, *Btc*, *Tgfa*, *Nrg1-3* ja *Disc1*. Kokku saadi 71 koeproovi, neist 40 Bl6 ja 31 129Sv hiirtelt. Andmeid analüüsiti *Hprt* koduhoidja suhtes. Peamised statistiliselt olulised tulemused ilmneseid Bl6 hiireliinis.

Bl6 hiirtel tõusis retseptoritest oluliselt *ErbB1* tase (Kruskal-Wallis, $F_{(2, 40)} = 6,397$; $p = 0,0408$). *ErbB1* SAL ja AK grupi vahel esines statistiliselt oluline muutus (Dunni test, $p < 0,05$). Ekspressioon oli SAL grupis $0,0448 \pm 0,00377$, AK grupis $0,0498 \pm 0,00574$ ja KR grupis $0,0484 \pm 0,00517$. 129Sv liinis *ErbB1* tasemes olulist muutust ei esinenud ($p = 0,5128$), ekspressioon oli SAL grupis $0,0475 \pm 0,00534$, AK grupis $0,0479 \pm 0,00767$ ja KR grupis $0,0449 \pm 0,00374$. See-eest langes 129Sv liinis oluliselt *ErbB4* ekspressioon (Kruskal-Wallis, $F_{(2, 30)} = 7,806$; $p = 0,0202$). Ekspressioon erines *ErbB4* oluliselt SAL ja KR grupi vahel (Dunni test, $p < 0,05$). *ErbB4* ekspressioon oli 129Sv liinis SAL grupis $0,255 \pm 0,0494$, AK grupis $0,232 \pm 0,0156$ ja KR grupis $0,206 \pm 0,0279$. Bl6 hiirtel *ErbB4* tasemes statistiliselt olulisi muutusi ei esinenud ($p = 0,3417$) ning ekspressioon oli SAL grupis $0,149 \pm 0,0166$, AK grupis $0,158 \pm 0,0252$ ja KR grupis $0,151 \pm 0,0127$ (joonis 3, tabel 4 lisa 1).

Ligandidest ilmnese Bl6 hiirtel *Nrg3* ekspressioonis üldine tõusev trend (Kruskal Wallis, $F_{(2, 40)} = 7,932$, $p = 0,0189$). Ekspressioonitase oli SAL grupis $0,0926 \pm 0,00881$, AK grupis $0,103 \pm 0,00539$ ja KR grupis $0,105 \pm 0,0152$. 129Sv hiirtel oli *Nrg3* ekspressioonitase SAL grupis $0,0117 \pm 0,00568$, AK grupis $0,127 \pm 0,0168$ ja KR grupis $0,114 \pm 0,0189$, kuid seal statistiliselt olulist muutust ei esinenud ($p = 0,2008$) (joonis 3, tabel 4 lisa 1).

Statistiliselt olulised muutused geeniekspressioonis hipokampuses on esitatud tabelis 4 (lisa 1) koos p-väärtuste ja gruppidevaheliste (SAL, AK, KR) erinevustega *post hoc* testis. Graafiliselt on tulemused esitatud joonisel 3.



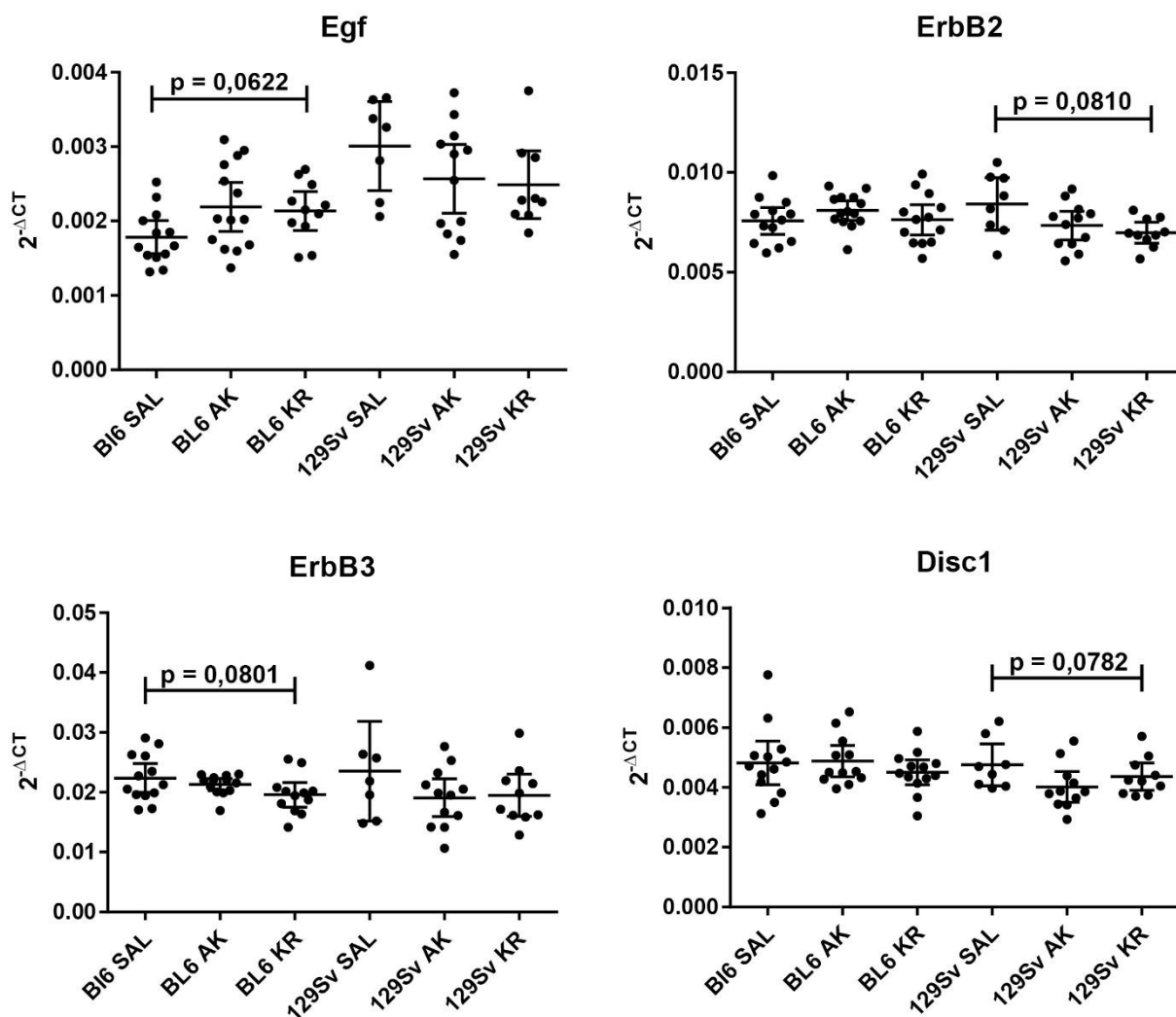
Joonis 3. Statistiliselt oluliselt muutunud geeniekspressiooni tulemused koduhoidja *Hprt* suhtes. Graafikutel on esitatud kahe hiireliini kolme katsegrupi (SAL, AK, KR) isendite geeniekspressioonid $2^{-\Delta CT}$ kujul. Tulemused on väljendatud koos keskvärtuse ja 95% usalduspiiridega. Statistiliselt olulised tulemused on esile toodud horisontaalsete joontega ja statistilise olulisuse määr *post hoc* testis on omakorda märgistatud kas * ($0,01 < p < 0,05$) või ** ($p < 0,01$). Graafikutelt on näha, et *ErbB1* ekspressioon tõsis oluliselt BL6 hiirtel (Kruskal-Wallis, $F_{(2, 40)} = 6,397$; $p = 0,0408$), statistiliselt oluline muutus esines SAL ja AK grupi vahel (Dunni test, $p < 0,05$). 129Sv hiirtel ilmnes oluline *ErbB4* ekspressioonis (Kruskal-Wallis, $F_{(2, 30)} = 7,806$; $p = 0,0202$). Statistiliselt oluline muutus toimus *ErbB4* SAL ja KR grupi vahel (Dunni test, $p < 0,05$). *Nrg3* ekspressioonis esines BL6 hiirtel üldine oluline muutus katsegruppide vahel (Kruskal Wallis, $F_{(2, 40)} = 7,932$, $p = 0,0189$).

Võimalikud trendid ($p < 0,1$) leidsid BL6 hiirtel *Egf* ja *ErbB3* ekspressioonis. *Egf*-i (Kruskal-Wallis, $F_{(2, 38)} = 5,554$; $p = 0,0622$) ekspressioon ei osutunud statistiliselt oluliselt, kuid esines trendina SAL grupi $0,00179 \pm 0,000367$, AK grupi $0,00219 \pm 0,000571$ ja KR grupi $0,00214 \pm 0,00039$ vahel. 129Sv hiirtel *Egf*-i tasemes statistiliselt olulisi muutusi ei ilmnenud ($p = 0,3722$), ekspressioon oli SAL grupis $0,00301 \pm 0,000649$, AK grupis $0,00257 \pm 0,000729$ ja KR grupis $0,00249 \pm 0,00059$. BL6 hiirtel langes trendina *ErbB3* tase (Kruskal-Wallis, $F_{(2, 39)} = 5,049$; $p = 0,0801$), ekspressioon oli SAL grupis $0,0224 \pm 0,00397$, AK grupis $0,0213 \pm$

0,00168 ja KR grupis $0,0196 \pm 0,00324$. Ka *ErbB3* ekspressioon ei muutunud oluliselt 129Sv hiirtel ($p = 0,5757$), kellel retseptori ekspressioon SAL grupis oli $0,0235 \pm 0,00903$, AK grupis $0,0191 \pm 0,00497$ ja KR grupis $0,0195 \pm 0,00494$ (joonis 4, tabel 4 lisa 1).

Trendina muutus 129Sv hiirtel *ErbB2* ja *Disc1* ekspressioon. *ErbB2* tase (Kruskal-Wallis, $F_{(2, 31)} = 5,025$; $p = 0,0810$) oli SAL grupis $0,00842 \pm 0,00158$, AK grupis $0,00734 \pm 0,00113$ ja KR grupis $0,00698 \pm 0,000726$. Bl6 hiirtel ei esinenud *ErbB2* tasemes olulisi muutusi ($p = 0,3619$), ekspressioon oli SAL grupis $0,00757 \pm 0,00111$, AK grupis $0,00809 \pm 0,000847$ ja KR grupis $0,00763 \pm 0,00126$. 129Sv liinis muutus trendina oluliselt ka *Disc1* ekspressioon (Kruskal-Wallis, $F_{(2, 31)} = 5,096$; $p = 0,0782$), mille tase oli SAL grupis $0,00475 \pm 0,000832$, AK grupis $0,00401 \pm 0,000766$ ja KR grupis $0,00436 \pm 0,00064$. Bl6 hiirtel *Disc1* tasemes olulisi muutusi ei toimunud ($p = 0,6684$), ekspressioon oli SAL grupis $0,00482 \pm 0,00121$, AK grupis $0,00488 \pm 0,000821$ ja KR grupis $0,0045 \pm 0,000692$ (joonis 4, tabel 4 lisa 1).

Trendid geeniekspressioonis hipokampuses on esitatud tabelis 4 (lisa 1) koos p-väärtustega. Graafiliselt on tulemused esitatud joonisel 4.



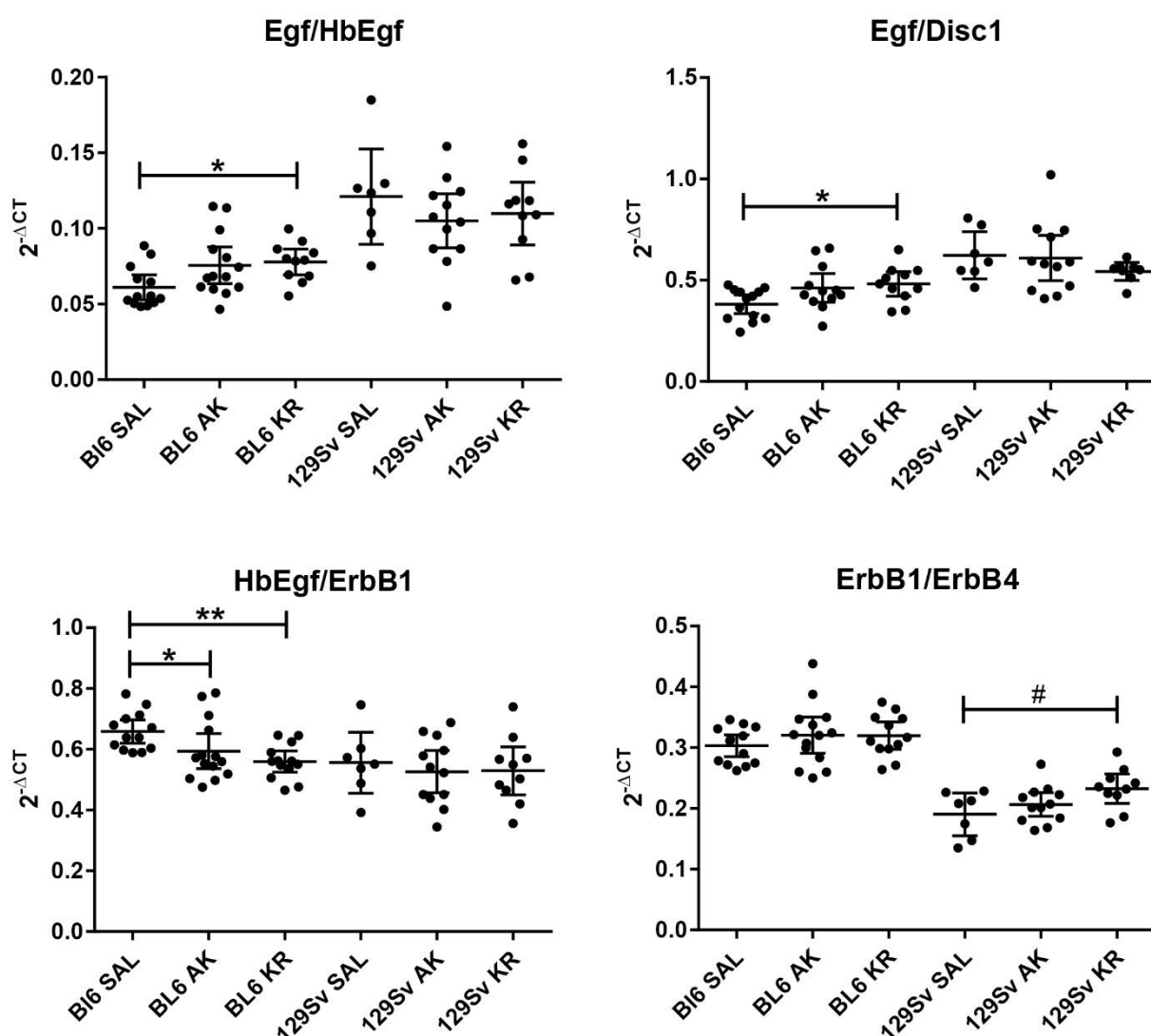
Joonis 4. Trendid geeniekspressiooni tulemustes koduhoidja *Hprt* suhtes. Graafikutel on esitatud kahe hiireliini kolme katsegrupi (SAL, AK, KR) isendite geeniekspressioonid $2^{-\Delta CT}$ kujul. Tulemused on väljendatud koos keskvaartuse ja 95% usalduspiiridega. Graafikutel toodud tulemused ei osutunud statistiliselt oluliseks, kuid esinesid trendina ($0,05 < p < 0,1$). Gruppidevahelised trendid on märgitud horisontaalse joonega ja lisatud on p-väärtus. Graafikutelt on näha, et *Egf-i* ekspressioonis esines Bl6 hiirtel gruppide vahel tõusev trend (Kruskal-Wallis, $F_{(2, 38)} = 5,554$; $p = 0,0622$), kuid *ErbB3* ekspressioonis ilmnis langev trend (Kruskal-Wallis, $F_{(2, 39)} = 5,049$; $p = 0,0801$). 129Sv hiirtel langes trendina *ErbB2* (Kruskal-Wallis, $F_{(2, 31)} = 5,025$; $p = 0,0810$) ja *Disc1* (Kruskal-Wallis, $F_{(2, 31)} = 5,096$; $p = 0,0782$) ekspressioon.

Statistiliselt olulisi muutusi ei ilmnenud kummagi hiireliini mitte üheski grupis *HbEgf-i*, *Btc*, *Tgfa*, *Nrg1*, *Nrg2* ekspressioonis. Bl6 *HbEgf-i* ($p = 0,1489$) ekspressioonitase oli SAL grupis $0,0295 \pm 0,00294$, AK grupis $0,0293 \pm 0,00432$ ja KR grupis $0,027 \pm 0,00315$. 129Sv *HbEgf-i* ($p = 0,9300$) ekspressioonitase oli SAL grupis $0,0256 \pm 0,00518$, AK grupis $0,0249 \pm 0,0047$ ja KR grupis $0,0248 \pm 0,00409$. Bl6 *Btc* ($p = 0,1342$) ekspressioonitase oli SAL grupis $0,00229 \pm 0,000577$, AK grupis $0,00208 \pm 0,000641$ ja KR grupis $0,00182 \pm 0,000318$. 129Sv *Btc* ($p = 0,3109$) ekspressioonitase oli SAL grupis $0,0207 \pm 0,000487$, AK grupis $0,00174 \pm 0,000609$ ja KR grupis $0,0019 \pm 0,000588$. Bl6 *Tgfa* ($p = 0,2070$) ekspressioonitase oli SAL grupis $0,0123 \pm 0,0101$, AK grupis $0,132 \pm 0,0125$ ja KR grupis $0,127 \pm 0,0165$. 129Sv *Tgfa* ($p = 0,6650$) ekspressioonitase oli SAL grupis $0,111 \pm 0,0316$, AK grupis $0,117 \pm 0,0171$ ja KR grupis $0,113 \pm 0,0175$. Bl6 *Nrg1* ($p = 0,6835$) ekspressioonitase oli SAL grupis $0,0386 \pm 0,0068$, AK grupis $0,0415 \pm 0,00693$ ja KR grupis $0,0412 \pm 0,00823$. 129Sv *Nrg1* ($p = 0,1771$) ekspressioonitase oli SAL grupis $0,0804 \pm 0,039$, AK grupis $0,0624 \pm 0,00765$ ja KR grupis $0,0546 \pm 0,00993$. Bl6 *Nrg2* ($p = 0,1455$) ekspressioonitase oli SAL grupis $0,0154 \pm 0,00174$, AK grupis $0,0161 \pm 0,000299$ ja KR grupis $0,0151 \pm 0,00205$. 129Sv *Nrg2* ($p = 0,3659$) ekspressioonitase oli SAL grupis $0,0228 \pm 0,00427$, AK grupis $0,0215 \pm 0,00432$ ja KR grupis $0,0199 \pm 0,00399$.

Statistiliselt olulised tulemused leiti ka geeniekspressioonide suhetest, mis on toodud tabelis 5 (lisa 2) koos p-väärtuste ja gruppidevaheliste (SAL, AK, KR) erinevustega *post hoc* testis ning graafiliselt joonisel 5. Ekspressioonitasemete muutused olid seejuures suuremas osas olulised Bl6 hiirtel, kuid 129Sv liinis esines oluline ekspressiooni tõus *ErbB1/ErbB4* suhtes SAL, AK ja KR gruppide vahel (Kruskal-Wallis, $F_{(2, 31)} = 6,059$; $p = 0,0483$). Ekspressioonitase oli SAL grupis $0,19 \pm 0,0381$, AK grupis $0,207 \pm 0,0306$ ja KR grupis $0,233 \pm 0,0341$. Bl6 hiirtel tõusis oluliselt *Egf/HbEgf* ekspressioon (Kruskal-Wallis, $F_{(2, 26)} = 8,286$; $p = 0,0159$). Statistiliselt oluline muutus esines SAL ja KR grupi vahel (Dunni test, $p < 0,05$). *Egf/HbEgf* tase oli SAL grupis $0,061 \pm 0,0136$, AK grupis $0,0756 \pm 0,0209$ ja KR grupis $0,0779 \pm 0,0128$. Samuti tõusis Bl6 hiirtel oluliselt *Egf/Disc1* ekspressioon (Kruskal-

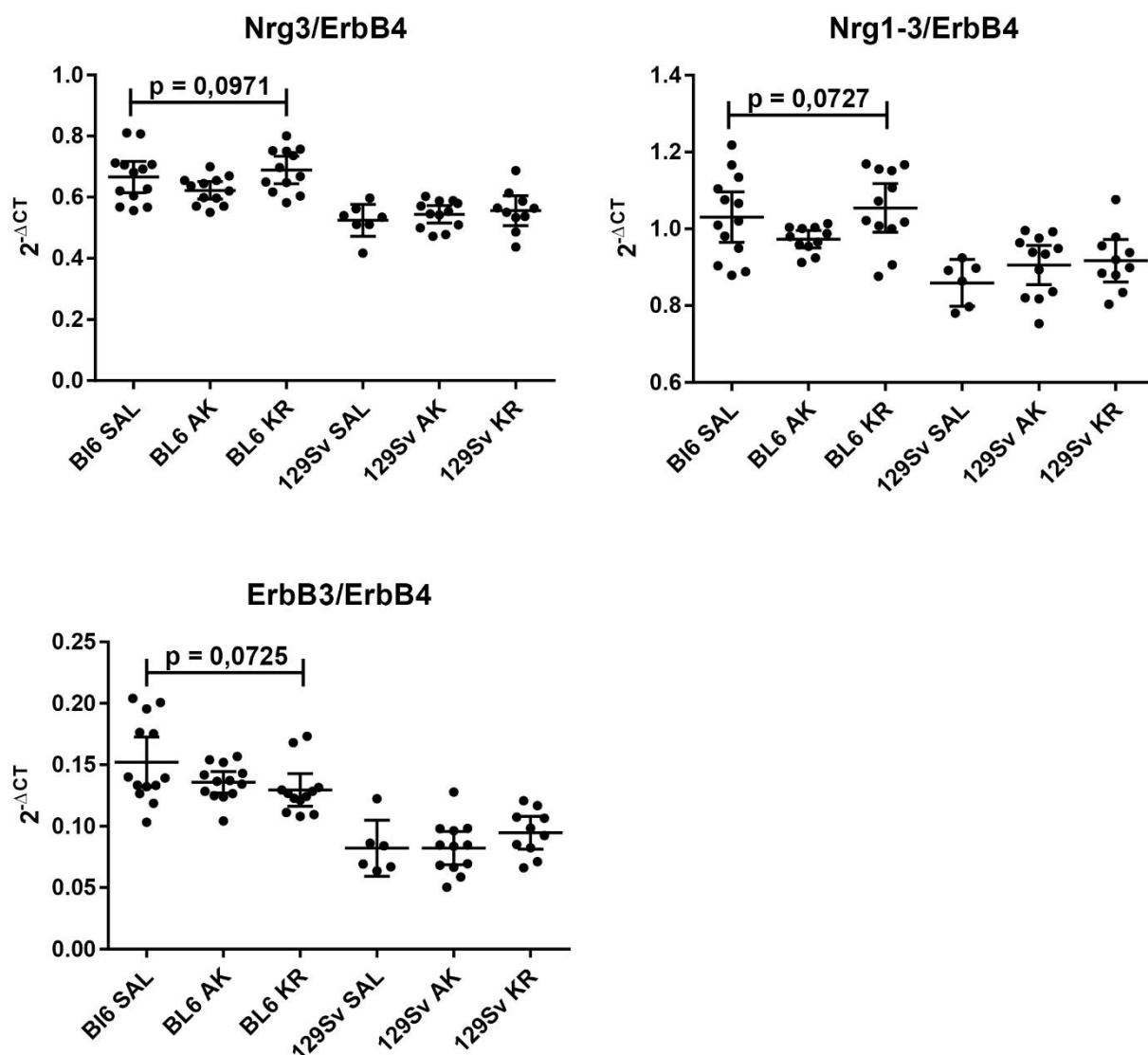
Wallis, $F_{(2, 26)} = 6,971$; $p = 0,0306$). Statistiliselt oluline muutus esines SAL ja KR grupi vahel (Dunni test, $p < 0,05$). *Egf/Disc1* tase oli SAL grupis $0,0381 \pm 0,0767$, AK grupis $0,462 \pm 0,112$ ja KR grupis $0,482 \pm 0,0896$. Bl6 hiirtel langes oluliselt ekspressioonitase *HbEgf/ErbB1* suhtes (Kruskal-Wallis, $F_{(2, 26)} = 11,26$; $p = 0,0036$). Statistiliselt oluline muutus esines *HbEgf/ErbB1* ekspressioonis SAL ja AK grupi vahel (Dunni test, $p < 0,05$) ning SAL ja KR grupi vahel (Dunni test, $p < 0,01$). *HbEgf/ErbB1* ekspressioon oli SAL grupis $0,659 \pm 0,063$, AK grupis $0,594 \pm 0,1$ ja KR grupis $0,56 \pm 0,0573$.

Statistiliselt olulised tulemused geeniekspressioonide suhetes on toodud tabelis 5 (lisa 2) koos p-väärtuste ja gruppidevaheliste (SAL, AK, KR) erinevustega *post hoc* testis. Graafiliselt on tulemused esitatud joonisel 5.



Joonis 5. Statistiliselt oluliselt muutunud geeniekspressioonide suhtes koduhoidja *Hprt* suhtes. Graafikutel on esitatud kahe hiireliini kolme katsegrupi (SAL, AK, KR) isendite geeniekspressioonide suhtes 2^{-ΔCT} kujul. Iga grupi kohta on esitatud aritmeetiline keskmine koos 95% usalduspiiridega. Tulemused on väljendatud koos keskväärtuse ja 95% usalduspiiridega. Statistiliselt olulised tulemused on esile toodud horisontaalsete joontega ja

statistilise olulisuse määr *post hoc* testis on omakorda märgistatud kas * ($0,01 < p < 0,05$) või ** ($p < 0,01$). # tähistavad üldist statistiliselt olulist muutust SAL, AK ja KR grupi vahel, kus *post hoc* test statistilise olulisuse määra ei näidanud. Graafikutelt on näha, et BL6 hiirtel tõusis *Egf/HbEgf-i* ekspressioon (Kruskal-Wallis, $F_{(2, 26)} = 8,286$; $p = 0,0159$), statistiliselt oluline muutus esines SAL ja KR grupi vahel (Dunni test, $p < 0,05$). BL6 hiirtel tõusis oluliselt ka *Egf/Disc1* ekspressioon (Kruskal-Wallis, $F_{(2, 26)} = 6,971$; $p = 0,0306$), statistiliselt oluline muutus leidis aset SAL ja KR grupi vahel ($p < 0,05$). BL6 hiirtel langes oluliselt *HbEgf/ErbB1* ekspressioon (Kruskal-Wallis, $F_{(2, 26)} = 11,26$; $p = 0,0036$), statistiliselt oluline erinevus oli SAL ja AK grupi vahel (Dunni test, $p < 0,05$) ning SAL ja KR grupi vahel (Dunni test, $p < 0,01$). 129Sv hiirtel esines *ErbB1/ErbB4* ekspressioonis üldine oluline tõus (Kruskal-Wallis, $F_{(2, 31)} = 6,059$; $p = 0,0483$).



Joonis 6. Trendid geeniekspressiooni suhetes koduhoidja *Hprt* suhtes. Graafikutel on esitatud kahe hiireliini kolme katsegrupi (SAL, AK, KR) isendite geeniekspressioonid $2^{-\Delta CT}$ kujul. Tulemused on väljendatud koos keskväertuse ja 95% usalduspiiridega. Graafikutel toodud tulemused ei osutunud statistiliselt oluliseks, kuid esinesid trendina ($0,05 < p < 0,1$). Gruppidevahelised trendid on märgitud horisontaalse joonega ja lisatud on p-väärtus. Graafikutelt on näha, et trendid esinesid geeniekspressioonide suhetes ainult BL6 hiirtel. Trendid ilmnesisid *Nrg3/ErbB4* (Kruskal-Wallis, $F_{(2, 40)} = 4,663$; $p = 0,0971$), *Nrg1-3/ErbB4* (Kruskal-Wallis, $F_{(2, 40)} = 5,244$; $p = 0,0727$) ja *ErbB3/ErbB4* (Kruskal-Wallis, $F_{(2, 40)} = 5,248$; $p = 0,0725$) ekspressioonis.

Trend ilmnes Bl6 hiirtel *Nrg3/ErbB4* suhtes (Kruskal-Wallis, $F_{(2, 40)} = 4,663$; $p = 0,0971$), kus ekspressioonitase oli SAL grupis $0,666 \pm 0,0846$, AK grupis $0,622 \pm 0,0455$ ja KR grupis $0,688 \pm 0,0706$. *Nrg1-3/ErbB4* (Kruskal-Wallis, $F_{(2, 40)} = 5,244$; $p = 0,0727$) ekspressioonitasemed olid Bl6 hiirtel SAL grupis $1,03 \pm 0,109$, AK grupis $0,973 \pm 0,0335$ ja KR grupis $1,05 \pm 0,0999$. *ErbB3/ErB4* suhtes (Kruskal-Wallis, $F_{(2, 40)} = 5,248$; $p = 0,0725$) võib Bl6 hiirtel näha ekspressioonitaseme langust trendina, kus ekspressioon on SAL grupis $0,152 \pm 0,0337$, AK grupis $0,136 \pm 0,0145$ ja KR grupis $0,13 \pm 0,0208$.

Trendid geeniekspressiooni suhetes hipokampuses on esitatud tabelis 5 (lisa 2) koos p-väärtustega. Graafiliselt on tulemused esitatud joonisel 6.

2.4. Arutelu

Käesoleva töö eesmärk oli uurida psühhoosi kahes käitumuslikult erinevas hiireliini mudelis - Bl6 ja 129Sv. Hiire mudelis kutsuti esile psühhoosilaadne seisund amfetamiini akuutse ja kroonilise manustamise tulemusel. Järgnevalt kirjeldati ErbB retseptorite ja neile seonduvate ligandide ekspressioonitasemete muutust mõlema hiireliini hipokampuses. 13 päeva jooksul viidi läbi loomkatsed (vastava ala spetsialisti poolt), mille järel mõõdeti qPCRi vahendusel 12 geeni ekspressioonide tasemed. Uuringus jaotati kummagi liini hiired kolme katsegruppi - kontrollgrupp, akuutse manustamise grupp ja kroonilise manustamise grupp. Kontrollgruppile manustati katse vältel füsioloogilist lahust. Akuutse manustamise grupile manustati füsioloogilist lahust ja ainult viimasel katsepäeval amfetamiinilahust. Kroonilisele grupile manustati amfetamiini kogu katse vältel. Käesolev katse võimaldab hinnata amfetamiini kordset ehk akuutset ning kroonilise manustamise mõju ErbB retseptorite ja EGF perekonna ligandide ekspressioonile.

Tulemustest selgus, et indutseeritud psühhoosi korral toimuvad muutused ErbB perekonna retseptorite ekspressioonis hiire hipokampuses. ErbB1 tase on üldiselt mõlemas hiireliinis sarnane (Bl6 SAL $0,045 \pm 0,004$ vs 129Sv SAL $0,048 \pm 0,005$, $t_{(21)} = 36$; $p = 0,2675$). ErbB1 paikneb hipokampuses GABAergiliste neuronite ja astrotsüütide pinnal (Iwakura ja Nawa, 2013) ning tulemustest selgub, et juba ühekordne amfetamiini manustamine tõstab Bl6 hiirtel statistiliselt oluliselt *ErbB1* ekspressiooni ($p = 0,041$). Tõenäoliselt reguleeritakse 129Sv hiirtel aga GABAergiline signaal maha, sest neil esineb glutamaatergiline alatalitus. ErbB1 üles reguleerimist on täheldatud ka varasemate uuringute käigus skisofreenia patsientide ajus (Futamura *et al.*, 2002; Iwakura *et al.*, 2005; Iwakura ja Nawa, 2013; Nawa *et al.*, 2014; Koido *et al.*, 2016). *ErbB1* ekspressiooni on seostatud dopaminergilise süsteemiga. Retseptori

aktivatsioon aitab dopaminergilistel neuronitel ellu jääda, GABAergilistel neuronitel olevate ErbB1 retseptorite aktivatsioon viib neuronite dediferentseerumiseni (Iwakura ja Nawa, 2013). ErbB1 aktivatsioonil suureneb dopamiini vabastamine ja see võib viia psühhoosile omaste käitumishäireteni. Seega ühekordne amfetamiini manustamine võib põhjustada ErbB1 üles reguleerimisega GABAergiliste neuronite dediferentseerumise. Ilmselt püüavad B16 hiired amfetamiinist tingitud aktiivsust reguleerides jõuda tagasi tasakaalu ja vältida kahjustusi ajus.

ErbB2 ekspressioon ei osutunud statistiliselt oluliseks kummaski liinis, kuid 129Sv hiirtel ilmnes langev trend ($p = 0,081$). Teatavasti ei seo ErbB2 üksi mitte ühtegi ligandi, vaid peab selleks moodustama esmalt dimeeri teise ErbB retseptoriga (Yarden ja Sliwkowski, 2001; Schneider ja Wolf, 2009; Mei ja Nave, 2014; Kovacs *et al.*, 2015). ErbB2 sisaldavad dimeerid on ligandi sidumisel eelistatuid. Ilmselt mängib ErbB2 keskset rolli ligandi sidumisel ja signaali ülekandes ning heterodimeeri moodustamine võimendab signaali veelgi (Yarden ja Sliwkowski, 2001). ErbB1 ja ErbB2 sarnane tase (ErbB1 B16 SAL $0,045 \pm 0,004$ vs 129Sv SAL $0,048 \pm 0,005$, $t_{(21)} = 36$; $p = 0,268$; ErbB2 B16 SAL $0,076 \pm 0,001$ vs 129Sv SAL $0,008 \pm 0,002$, $t_{(21)} = 35$; $p = 0,237$) võib näidata ErbB1/ErbB2 dimeeride domineerimist signaaliülekandes. Tulemuste põhjal on ErbB2 ja ErbB4 ekspressioonimuster 129Sv hiirtel küllaltki sarnane, nad mõlemad reguleeritakse süsteemis alla. Sellest tulenevalt reguleeritakse ilmselt ErbB2/ErbB4 dimeer 129Sv hiirtel alla (ErbB2 SAL $0,008 \pm 0,002$, AK $0,007 \pm 0,001$, KR $0,007 \pm 0,001$; ErbB4 SAL $0,255 \pm 0,049$, AK $0,232 \pm 0,016$, KR $0,206 \pm 0,028$), mis võib tähendada, et ka GABAergiline signaal reguleeritakse maha. ErbB2/ErbB4 heterodimeerid mõjutavad hipokampuse neuronite diferentseerumist (Iwakura ja Nawa, 2013) ja varasemalt on selgunud, et ErbB2/ErbB4 defitsiitsed hiired on agressiivsemad (Abazyan ja Pletnikov, 2014).

ErbB4 ekspresseeritakse hipokampuses peamiselt GABAergilistes neuronites, astrotsüütides ja oligodendrotsüütides. Hipokampuses reguleerib ErbB4 neuronite erutatavust. GABAergilistes neuronites reguleerib *ErbB4* ekspressioon NMDA-tüüpi glutamaadi retseptorite aktiivsust ja/või ekspressiooni, kuid skisofreenia korral on varasemalt täheldatud NMDA alla surumist (Law *et al.*, 2007; Iwakura ja Nawa, 2013). Käesoleva töö tulemuste põhjal väheneb *ErbB4* ekspressioon 129Sv liinis oluliselt kontrollgrupi ja amfetamiini kroonilise manustamise grupi vahel ($p = 0,02$). ErbB4 alla reguleerimine 129Sv hiirtel võib toimuda kompensatoorsel eesmärgil. Ilmselt esineb glutamaatergiline alatalitus, mille korral NMDA-tüüpi retseptorid on alla reguleeritud. 129Sv hiir proovib tõenäoliselt toime tulla, surudes maha GABAergiliste neuronite signaali ja see toimub neureguliinide vahendusel. Üldine

ErbB4 tase on 129Sv hiirte hipokampuses siiski märgatavalt kõrgem kui B16 hiirtel ($t_{(21)} = 0$; $p < 0,0001$). Ilmselt on ErbB4 kõrgem tase 129Sv hiirtel kohandunud vastama NMDA süsteemi aktiivsusele, mis on samuti 129Sv-l üles reguleeritud (avaldamata andmed). B16 hiirtel on tõenäoliselt kindel rada, kuidas toimuvatele protsessidele vastatakse, kuid 129Sv hiirtel ei ole see nii paigas. Kognitiivne defitsiit võib skisofreenia korral olla NRG1-ErbB4 ülesignaleerimise tagajärg, mis viib NMDA-tüüpi retseptoritest sõltuva glutamaatergilise sünaptilise plastilisuse vähenemiseni. Sellest tulenevalt oleks meditsiiniline sekkumine NRG1-ErbB4 signaleerimisse üks võimalus haiguse paremaks raviks (Pitcher *et al.*, 2008; Salter *et al.*, 2009).

ErbB3 ekspressioonis ilmneb B16 hiirtel langev trend ($p = 0,0801$). Kuna ErbB3 kinaasne domeen on defektne, peab retseptor moodustama heterodimeeri mõne muu ErbB-ga, et signaali edastada. Kõige tõenäolisemalt moodustab ErbB3 dimeeri ErbB2-ga, sest see heterodimeer on kõige aktiivsem ning lisaks paiknevad nii ErbB3 kui ErbB2 hipokampuses oligodendrotsüütide pinnal (Yarden ja Sliwkowski, 2001; Schneider ja Wolf, 2009; Iwakura ja Nawa, 2013; Mei ja Nave, 2014; Kovacs *et al.*, 2015). ErbB3 seob endaga NRG1 ja NRG2 (NRG6 käesolevas töös ei käsitletud), mis seonduvad ka ErbB4-le. Nii *ErbB3* kui *ErbB4* ekspressiooni vähenemine võib viidata aga sellele, et indutseeritud psühhoosi korral väheneb ka nende dimeeride hulk ja seonduvate ligandide mõju. Käesolevast uuringust selgus, et NRG3 reguleeritakse B16 hiirtel hipokampuses üles (SAL $0,093 \pm 0,009$, AK $0,103 \pm 0,005$, KR $0,105 \pm 0,015$; $p = 0,019$) ning see võib olla seotud ErbB3 ja ErbB4 poolt edastatava signaali osakaalu suurenemisega. ErbB1 ja ErbB4 omavahelises suhtes esineb üldine tõusev trend 129Sv hiire gruppide vahel (SAL $0,190 \pm 0,038$, AK $0,207 \pm 0,031$, KR $0,233 \pm 0,034$; $p = 0,048$). Nii amfetamiini akuutsel kui kroonilisel manustamisel tõuseb ErbB1 osakaal ErbB4 suhtes ($p = 0,048$). Järelikult võib eeldada, et nende ühised ligandid (BTC ja HBEGF) seonduvad siis rohkem ErbB1-le. *Nrg3* ekspressiooni ja tema signaali kandvate ErbB3/ErbB4 dimeeride suurenemine võimaldab samuti BTC ja HBEGF-i seondumist ErbB1-le. Tulemustest on ka näha, et üldine *ErbB1* ekspressioon *ErbB4* suhtes on oluliselt kõrgem B16 hiirtel ($t_{(20)} = 0$, $p < 0,0001$).

EGF perekonna ligandidest tuvastati võimalik trend ainult *Egf*-i korral B16 hiirtel ($p = 0,062$). Ekspressioon tõusis akuutse ja kroonilise manustamise grupis, võrreldes füsioloogilist lahust saanud kontrollgrupiga. Ilmselt reguleeritakse hipokampuses EGF üles, et taastada oksüdatiivset stressist tekkinud kahjustusi ajus. EGF perekonna ligandide tase viiakse B16 hiirtel üles, kui aju kahjustub ning käesolevas uuringus tekitas selle kahjustuse amfetamiini manustamine (B16 SAL $0,002 \pm 0,0004$, AK $0,002 \pm 0,001$, KR $0,002 \pm 0,0004$; $p = 0,062$).

Seevastu 129Sv hiirtel esineb ilmselt mingisugune regulatsiooni probleem ja puudub peenhäälestus ning seetõttu jääb neil EGF-i tase ühtlaseks ka pärast amfetamiini manustamist (129Sv EGF SAL $0,003 \pm 0,001$, AK $0,003 \pm 0,001$, KR $0,002 \pm 0,001$; $p = 0,372$). Bl6 ja 129Sv hiiri saab käsitleda kui inimpopulatsiooni jäljendava mudelina, kus erinevad liinid kujutavad psühhoosile vastuvõtlikke ja resistentsemaid isendeid. *Egf*-i üleekspressioon esineb esmase psühhoosi episoodi patsientidel ja seda võib pidada psühhoosi markeriks. Antipsühhootikumide mõjul aga vähenevad nii EGF-i tase kui skisofreenia positiivsed sümptomid (Koido *et al.*, 2016).

Vaadeldes ükshaaval teiste ErbB1 ligandide (BTC, HBEGF, TGF α) tulemusi, siis on näha, et nende ekspressioon jääb psühhoosi esile kutsumisel hipokampuses samaks või isegi langeb. Kui vaadata EGF-i suhet nendes ligandidesse, on märgata siiski ekspressiooni tõusu. Seega ilmselt kasvab EGF-i tõenäosus seonduda ErbB1 retseptorile teiste ErbB1 ligandide suhtes. Samas peab arvestama, et EGF-i afiinsus või mitootiline potentsiaal ei ole ligandide seas kõrgeim (Jennifer T. Jones *et al.*, 1999). Nii HBEGF-i kui BTC osalus enda retseptorite (ErbB1 ja ErbB4) suhtes aga väheneb. Kuna ErbB4 on NRG1-3 ühine retseptor, leiti ka *Nrg1-3/ErbB4* ekspressioonide suhe. Tulemustest selgus, et *Nrg1-3* summaarne ekspressioon kasvab ErbB4 suhtes amfetamiini kroonilisel manustamisel. See võib olla jällegi seotud ErbB4 poolt edastatava signaali osakaalu suurenemisega.

Käesolevast uuringust selgus ka, et tõenäoliselt on EGF ja DISC1 omavahel seotud. Tulemuste põhjal tõuseb Bl6 hiirtel oluliselt EGF-i tase DISC1 suhtes amfetamiini korduval manustamisel (*Egf/Disc1* $p = 0,031$). Võiks eeldada, et seose taga on oksüdatiivne stress. Kui toodetakse reaktiivseid hapnikuühendeid, tekib oksüdatiivne stress, millele on DISC1 defitsiidiga neuronid eriti vastuvõtlikud (Park *et al.*, 2017). Oksüdatiivne stress mõjutab mitmeid rakulisi protsesse, sh mitokondriaalset signaliseerimist ja neuronite erutatavust, ning võib põhjustada interneuronite neurotoksilisust. Seetõttu avaldab oksüdatiivne stress mõju ka skisofreeniale ja meeleolu muutustele (Johnson *et al.*, 2013). DISC1 defitsiiti on täheldatud skisofreenia patsientidel. EGF hoolitseb aga neuronite elulemuse eest. Seega ilmselt tõuseb Bl6 hiirtel EGF-i tase DISC1 suhtes, et tasakaalustada amfetamiini või psühhoosi poolt tekitatud oksüdatiivset stressi. 129Sv hiirtel esineb *Disc1* mutatsioon, mille korral tekib rohkem reaktiivseid hapnikuühendeid ja mis kahjustavad eriti DISC1-defitsiitseid neuroneid, milleks on üldjuhul dopaminergilised neuronid. See tähendab, et 129Sv võib olla tundlikum mudel psühhoosi uurimiseks. Tulevased teadusuuringud peaks selgitama täpsemalt 129Sv ja Bl6 sobilikkust psühhoosi uurimiseks.

KOKKUVÕTE

Komplekshaiguste nagu skisofreenia uurimine nõuab häid loomudeleid, mis võimaldaks avastada haiguse tekkemehhanisme. Käesolevas töös vaatlesime kahe hiireliini (B16 ja 129Sv) võrdlust amfetamiini poolt indutseeritud psühhoosilaadses mudelis. Töö eesmärgiks oli uurida ErbB perekonna ekspresioonimustri muutusi hiire hipokampuses. Uuritavateks geenideks olid *ErbB1-4*, *Egf*, *Hb-Egf*, *Btc*, *Tgfa*, *Nrg1-3* ja *Disc1*. Uuritavaid gene vaadeldi koduhoidjageeni *Hprt* suhrtes.

Hipokampus toetab tunnetust, on seotud mälu, õppimise, mälestuste kujunemise ja nende organiseerimisega. Hipokampuse väärtalitlusi seostatakse mitmete psühhiaatriliste seisunditega, nende seas psühhoosiga. Skisofreenia korral ilmnevad patsientidel näiteks pettekujutelmad, hallutsinatsioonid, apaatia ja probleemid kognitiivsetes võimetes. Hetkel kasutusel olevad antipsühhootikumid blokeerivad D2 dopamiini retseptorid, mille tulemusel väheneb ülemäärane signaaliülekanne ja aeglustub haigussümptomite süvenemine. Käesolevalt püütakse välja töötada uusi ravimeid, mille märklauaks oleks glutamaatergiline süsteem ja NMDA retseptorite aktiivsuse moduleerimine. NMDA retseptoritega on seotud *Nrg1* ja *ErbB4* ekspresioon. NRG-ErbB kaskaad mängib kesknärvisüsteemis olulist rolli ja häireid nende geenide ekspresioonis seostatakse skisofreeniaga.

Käesolevas töös jaotati katseloomad kolme rühma, kellest esimene oli kontrollgrupp, teine akuutse ja kolmas kroonilise manustamise grupp. Hiirte hipokampusest eraldati RNA, millele tehti DNaaS I töötlus ja sünteesiti cDNA. Järgnevalt kasutati qPCRi meetodit geeniekspresiooni kvantiteerimiseks. Tulemustest selgus, et indutseeritud psühhoosi korral muutub hiire hipokampuses ErbB perekonna retseptorite ja ligandide ekspresioon. B16 hiirtel tõusis oluliselt *ErbB1*, *Egf* ja *Nrg3* ekspresioon. NRG3 üles reguleerimisel suureneb ErbB3 ja ErbB4 poolt edastatava signaali osakaal. 129Sv hiirtel langes märkimisväärselt ErbB4 tase, mis ilmselt kompenseerib neil NMDA süsteemi aktiivsust. EGF reguleeritakse hipokampuses üles, et tasakaalustada oksüdatiivset stressi, millele on eriti vastuvõtlikud DISC1-defitsiitsed neuronid. EGF-i- ja DISC1-vaheline seos nõuab siiski edasist uurimist.

Töö on osa Tartu Ülikooli Bio- ja siirdemeditsiini instituudis füsioloogia osakonnas läbi viidavast suuremast uurimustööst, mille eesmärk on leida varajasi psühhoosi või esmase psühhoosi markereid ning selle kaudu heita valgust psühhoosi tekkimise molekulaarsetele mehhanismidele.

RESÜMEE/SUMMARY

ErbB family receptors and their ligand expression in mouse hippocampus

Anna Katt

Summary

Normal behavior is supported by adequate information processing. Cognitive flexibility allows active manipulation of information and change in behavior of individuals in the variable environment. This information processing needs co-operation of several brain areas. The hippocampus is involved in the formation of memories, spatial navigation, and learning. Hippocampus is important in cognitive flexibility because it organizes and updates information as needed. There is a convincing evidence that dysregulation in the hippocampus can lead to cognitive problems and neuropsychiatric disorders.

Schizophrenia is a chronic neuropsychiatric disorder that is expressed in the form of abnormal mental functions and disturbed behavior. The diagnosis is based on positive and negative symptoms, and cognitive deficits. Schizophrenia can be treated or at least postponed by early intervention with antipsychotic treatment. Antipsychotics block dopamine D2 receptors, but they have no effect on patient's cognitive functions. Therefore, markers for early diagnosis of cognitive decline are needed.

In present work chronic administration of amphetamine was used to evoke psychosis-like state in two behaviorally different strains of mice (B16 and 129Sv). The aim was to study gene expression changes in the hippocampus. Genes involved were *ErbB1-4*, *Egf*, *Tgfa*, *HbEgf*, *Btc*, *Nrg1-3* and *Disc1*. In the present study, genes were compared with the housekeeping gene – *Hprt*. To achieve the study aims animals were divided into 3 groups: control, acute, and chronic. The animal experiment was conducted, and tissue samples were collected for qPCR.

The results indicated that in induced psychosis gene expression levels of *Egf*, *ErbB1* and *Nrg3* were upregulated, but expression levels of *ErbB3* and *ErbB4* were down-regulated in statistically significant level. The correlation between EGF and DISC1 was also found. Therefore, these genes could be potential markers of psychosis in humans and deserve future research to understand the underlying pathophysiological mechanisms.

TÄNUSÕNAD

Eelkõige tahaksin tänada oma juhendajat Taavi Vanaveskit abistamise ja töö juhendamise eest. Täna ka enda teist juhendajat Annely Lorentsit heade nõuannete eest. Veel sooviksin tänada Jane Narvikut, kes jagas häid soovitusi katsete läbiviimisel.

KIRJANDUSE LOETELU

A) Ajakiri

Amici, F., Call, J., Watzek, J., Brosnan, S., ja Aureli, F. (2018). Social inhibition and behavioural flexibility when the context changes: a comparison across six primate species. *Scientific Reports* 8.

Benzel, I., Bansal, A., Browning, B. L., Galwey, N. W., Maycox, P. R., McGinnis, R., Smart, D., St Clair, D., Yates, P., ja Purvis, I. (2007). Interactions among genes in the ErbB-Neuregulin signalling network are associated with increased susceptibility to schizophrenia. *Behavioral and Brain Functions* 3, 31.

Chen, J., Zeng, F., Forrester, S. J., Eguchi, S., Zhang, M.-Z., ja Harris, R. C. (2016). Expression and Function of the Epidermal Growth Factor Receptor in Physiology and Disease. *Physiological Reviews* 96, 1025–1069.

Chen, Y.-J., Zhang, M., Yin, D.-M., Wen, L., Ting, A., Wang, P., Lu, Y.-S., Zhu, X.-H., Li, S.-J., Wu, C.-Y., et al. (2010). ErbB4 in parvalbumin-positive interneurons is critical for neuregulin 1 regulation of long-term potentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 21818–21823.

Citri, A., ja Yarden, Y. (2006). EGF–ERBB signalling: towards the systems level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7, 505–516.

Eichenbaum, H. (2017). Prefrontal–hippocampal interactions in episodic memory. *Nature Reviews Neuroscience* 18, 547–558.

Feng, Y., Wang, X.-D., Guo, C.-M., Yang, Y., Li, J.-T., Su, Y.-A., ja Si, T.-M. (2010). Expressions of Neuregulin 1 β and ErbB4 in Prefrontal Cortex and Hippocampus of a Rat Schizophrenia Model Induced by Chronic MK-801 Administration. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010, 1–7.

Futamura, T., Toyooka, K., Iritani, S., Niizato, K., Nakamura, R., Tsuchiya, K., Someya, T., Kakita, A., Takahashi, H., ja Nawa, H. (2002). Abnormal expression of epidermal growth factor and its receptor in the forebrain and serum of schizophrenic patients. *Molecular Psychiatry* 7, 673–682.

Garratt, A. N., Özcelik, C., ja Birchmeier, C. (2003). ErbB2 pathways in heart and neural diseases. *Trends in Cardiovascular Medicine* 13, 80–86.

Grace, A. A. (2016). Dysregulation of the dopamine system in the pathophysiology of schizophrenia and depression. *Nature Reviews Neuroscience* 17, 524–532.

Harris, R. (2003). EGF receptor ligands. *Experimental Cell Research* 284, 2–13.

Heinla, I. (2016). Behavioural and genetic comparison of B6 and 129Sv mouse lines focusing on the anxiety profile and the expression of Lsamp gene. PhD Thesis.

Hu, W., MacDonald, M. L., Elswick, D. E., ja Sweet, R. A. (2015). The glutamate hypothesis of schizophrenia: evidence from human brain tissue studies: Glutamate system and schizophrenia. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1338, 38–57.

Iwakura, Y., ja 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.

Iwakura, Y., Piao, Y., Mizuno, M., Takei, N., Kakita, A., Takahashi, H., ja Nawa, H. (2005). Influences of dopaminergic lesion on epidermal growth factor-ErbB signals in Parkinson's disease and its model: neurotrophic implication in nigrostriatal neurons. *Journal of Neurochemistry* 93, 974–983.

Jaaro-Peled, H., Hayashi-Takagi, A., Seshadri, S., Kamiya, A., Brandon, N. J., ja Sawa, A. (2009). Neurodevelopmental mechanisms of schizophrenia: understanding disturbed postnatal brain maturation through neuregulin-1–ErbB4 and DISC1. *Trends in Neurosciences* 32, 485–495.

Jones, J. T., Akita, R. W., ja Sliwkowski, M. X. (1999). 43_Binding specificities and affinities of egf domains for ErbB receptors.pdf. *FEBS Lett.*

Johnson, A. W., Jaaro-Peled, H., Shahani, N., Sedlak, T. W., Zoubovsky, S., Burruss, D., Emiliani, F., Sawa, A., ja Gallagher, M. (2013). Cognitive and motivational deficits together with prefrontal oxidative stress in a mouse model for neuropsychiatric illness. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 12462–12467.

Kao, W.-T., Wang, Y., Kleinman, J. E., Lipska, B. K., Hyde, T. M., Weinberger, D. R., ja Law, A. J. (2010). Common genetic variation in Neuregulin 3 (NRG3) influences risk for schizophrenia and impacts NRG3 expression in human brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 15619–15624.

Kesby, J., Eyles, D., McGrath, J., ja Scott, J. (2018). Dopamine, psychosis and schizophrenia: the widening gap between basic and clinical neuroscience. *Translational Psychiatry* 8.

Kinugasa, Y., Ishiguro, H., Tokita, Y., Oohira, A., Ohmoto, H., ja Higashiyama, S. (2004). Neuroglycan C, a novel member of the neuregulin family. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 321, 1045–1049.

Koido, K., Innos, J., Haring, L., Zilmer, M., Ottas, A., ja Vasar, E. (2016). Taurine and Epidermal Growth Factor Belong to the Signature of First-Episode Psychosis. *Frontiers in Neuroscience* 10.

Kovacs, E., Zorn, J.A., Huang, Y., Barros, T., ja Kuriyan, J. (2015). A Structural Perspective on the Regulation of the Epidermal Growth Factor Receptor. *Annu. Rev. Biochem.* 84, 739–764.

Law, A. J., Kleinman, J. E., Weinberger, D. R., ja Weickert, C. S. (2007). Disease-associated intronic variants in the ErbB4 gene are related to altered ErbB4 splice-variant expression in the brain in schizophrenia. *Human Molecular Genetics* 16, 129–141.

Lemmon, M. A., ja Schlessinger, J. (2010). Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell* 141, 1117–1134.

Lewis, D. A. ja González-Burgos, G. (2008). Neuroplasticity of neocortical circuits in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 33, 141.

Lewis, D. A. ja Levitt, P. (2002). Schizophrenia as a Disorder of Neurodevelopment. *Annual Review of Neuroscience* 25, 409–432.

- Lewis, D. A. ja Lieberman, J. A. (2000). Catching up on schizophrenia. *Neuron* 28, 325–334.
- Lisman, J., Buzsáki, G., Eichenbaum, H., Nadel, L., Ranganath, C., ja Redish, A. D. (2017). Viewpoints: how the hippocampus contributes to memory, navigation and cognition. *Nature* 20, 1.
- Lui, E. (2016). Adult Hippocampal Neurogenesis, Cognitive Flexibility, and Depression. Master's Thesis. University of Waterloo.
- Mei, L., ja Nave, K.-A. (2014). Neuregulin-ERBB Signaling in the Nervous System and Neuropsychiatric Diseases. *Neuron* 83, 27–49.
- Nawa, H., Sotoyama, H., Iwakura, Y., Takei, N., ja Namba, H. (2014). Neuropathologic Implication of Peripheral Neuregulin-1 and EGF Signals in Dopaminergic Dysfunction and Behavioral Deficits Relevant to Schizophrenia: Their Target Cells and Time Window. *BioMed Research International* 2014, 1–12.
- Park, S. J., Lee, S. B., Suh, Y., Kim, S.-J., Lee, N., Hong, J.-H., Park, C., Woo, Y., Ishizuka, K., Kim, J.-H., et al. (2017). DISC1 Modulates Neuronal Stress Responses by Gate-Keeping ER-Mitochondria Ca²⁺ Transfer through the MAM. *Cell Reports* 21, 2748–2759.
- Pitcher, G. M., Beggs, S., Woo, R.-S., Mei, L., ja Salter, M. W. (2008). ErbB4 is a suppressor of long-term potentiation in the adult hippocampus: *NeuroReport* 19, 139–143.
- Rubin, R. D., Watson, P. D., Duff, M. C., ja Cohen, N. J. (2014). The role of the hippocampus in flexible cognition and social behavior. *Frontiers in Human Neuroscience* 8.
- Schneider, M. R., ja Wolf, E. (2009). The epidermal growth factor receptor ligands at a glance. *Journal of Cellular Physiology* 218, 460–466.
- Seshadri, S., Faust, T., Ishizuka, K., Delevich, K., Chung, Y., Kim, S.-H., Cowles, M., Niwa, M., Jaaro-Peled, H., Tomoda, T., et al. (2015). Interneuronal DISC1 regulates NRG1-ErbB4 signalling and excitatory–inhibitory synapse formation in the mature cortex. *Nature Communications* 6.
- Singh, B., Carpenter, G., ja Coffey, R. J. (2016). EGF receptor ligands: recent advances [version 1; referees 3 approved]. *F1000Res*.
- Skirzewski, M., Karavanova, I., Shamir, A., Erben, L., Garcia-Olivares, J., Shin, J. H., Vullhorst, D., Alvarez, V. A., Amara, S. G., ja Buonanno, A. (2017). ErbB4 signaling in dopaminergic axonal projections increases extracellular dopamine levels and regulates spatial/working memory behaviors. *Molecular Psychiatry*.
- Stefansson, H., Petursson, H., Sigurdsson, E., Steinthorsdottir, V., Bjornsdottir, S., Sigmundsson, T., Ghosh, S., Brynjolfsson, J., Gunnarsdottir, S., ja Ivarsson, O. (2002). Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia. *The American Journal of Human Genetics* 71, 877–892.
- Strachan, L., Murison, J. G., Prestidge, R. L., Sleeman, M. A., Watson, J. D., ja Kumble, K. D. (2001). Cloning and Biological Activity of Epigen, a Novel Member of the Epidermal Growth Factor Superfamily. *Journal of Biological Chemistry* 276, 18265–18271.

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.

Vullhorst, D., Mitchell, R. M., Keating, C., Roychowdhury, S., Karavanova, I., Tao-Cheng, J.-H., ja Buonanno, A. (2015). A negative feedback loop controls NMDA receptor function in cortical interneurons via neuregulin 2/ErbB4 signalling. *Nature Communications* 6.

Waltz, J.A. (2017). The neural underpinnings of cognitive flexibility and their disruption in psychotic illness. *Neuroscience* 345, 203–217.

Yarden, Y., ja Sliwkowski, M. X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2, 127.

Yarden, Y., ja Schlessinger, J. (1987). Epidermal growth factor induces rapid, reversible aggregation of the purified epidermal growth factor receptor. *Biochemistry*.

B) Raamat

Abazyan, S. ja Pletnikov, M. K., (2014). Chapter 17 – Schizophrenia, p. 189. In S. Pietropaolo, F. Sluyter ja W. E. Crusio, *Behavioral Genetics of the Mouse*, vol.2. Cambridge University Press, United Kingdom.

Ayhan, Y., Terrillion, C. E. ja Pletnikov, M. V., (2016). Chapter 20 – Modeling Schizophrenia in Animals: Old Challenges and New Opportunities, p. 351-382. In *The Neurobiology of Schizophrenia*, T. Abel ja T. Nickl-Jockschat, ed. Academic Press, San Diego..

Miller, G. A. ja Rockstroh, B. S., (2016). Chapter 2 – Progress and Prospects for Endophenotypes for Schizophrenia in the Time of Genomics, Epigenetics, Oscillatory Brain Dynamics, and the Research Domain Criteria, p. 17-38. In *The Neurobiology of Schizophrenia*, T. Abel ja T. Nickl-Jockschat, ed. Academic Press, San Diego..

Salter, M. W., Dong, Y., Kalia L. V., Liu, X. J. ja Pitcher, G., (2009). Chapter 7 - Regulation of NMDA Receptors by Kinases and Phosphatases. In: A. M. Van Dongen (ed.), *Biology of the NMDA Receptor*. CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton (FL).

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

Link 1:

<https://www.genenames.org/> (30.04.2018)

Link 2:

<https://en.wikipedia.org/wiki/Cognition> (10.03.2018)

Link 3:

https://en.wikipedia.org/wiki/Dopaminergic_pathways (03.04.2018)

LISAD

LISA 1

Tabel 4. Statistiliselt olulised tulemused ekspressioonitasemete muutustes *Hprt* suhtes hipokampuses.

Andmeid analüüsiti 2^{-ΔCT} kujul koduhoidja (*Hprt*) suhtes. Kasutati Kruskal-Wallise testi, mille korral oli *post hoc* testiks Dunni test. Statistilise olulisuse nivooks võeti $\alpha = 0,05$. Tabelis on toodud statistiliselt olulised tulemused ($p \leq 0,05$) ja trendid ($0,05 < p < 0,1$). Statistiliselt oluliste tulemuste korral on tabelis nimetatud *post hoc* test ja grupid, mille vahel statistiliselt oluline erinevus esines. Leiti katsegruppide (SAL, AK, KR) keskmised ekspressioonid ja standardhälve (SD). Statistiline analüüs sooritati GraphPad Prism 7 tarkvaraga (GraphPad Software Inc, USA).

Tulemus	p-väärtus	Grupp	Keskmine	± SD	<i>Post hoc</i>
Bl6 <i>Egf</i>	p = 0,0622	SAL	0,00179	0,000367	-
		AK	0,00219	0,000571	
		KR	0,00214	0,00039	
Bl6 <i>ErbB1</i>	p = 0,0408	SAL	0,0448	0,00377	Dunni test, SAL vs AK
		AK	0,0498	0,00574	
		KR	0,0484	0,00517	
129Sv <i>ErbB2</i>	p = 0,0810	SAL	0,00842	0,00158	-
		AK	0,00734	0,00113	
		KR	0,00698	0,000726	
Bl6 <i>ErbB3</i>	p = 0,0801	SAL	0,0224	0,00397	-
		AK	0,0213	0,00168	
		KR	0,0196	0,00324	
129Sv <i>ErbB4</i>	p = 0,0202	SAL	0,255	0,0494	Dunni test, SAL vs KR
		AK	0,232	0,0156	
		KR	0,206	0,0279	
129Sv <i>DISC1</i>	p = 0,0782	SAL	0,00475	0,000832	-
		AK	0,00401	0,000766	
		KR	0,00436	0,00064	
Bl6 <i>Nrg3</i>	p = 0,0189	SAL	0,0926	0,00881	Dunni test, SAL vs AK SAL vs KR
		AK	0,103	0,00539	
		KR	0,105	0,0152	

LISA 2

Tabel 5. Statistiliselt olulised muutused geeniekspressioonide jagatistes *Hprt* suhtes hipokampuses.

Andmeid analüüsiti $2^{-\Delta CT}$ kujul koduhoidja (*Hprt*) suhtes. Kasutati Kruskal-Wallise testi, mille korral oli *post hoc* testiks Dunni test. Statistilise olulisuse nivooks võeti $\alpha = 0,05$. Tabelis on toodud statistiliselt olulised tulemused ($p \leq 0,05$) ja trendid ($0,05 < p < 0,1$). Statistiliselt oluliste tulemuste korral on tabelis nimetatud *post hoc* test ja grupid, mille vahel statistiliselt oluline erinevus esines. Leiti katsegruppide (SAL, AK, KR) keskmised ekspressioonid ja standardhälve (SD). Statistiline analüüs sooritati GraphPad Prism 7 tarkvaraga (GraphPad Software Inc, USA).

Tulemus	p-väärtus	Grupp	Keskmine	\pm SD	<i>Post hoc</i>
Bl6 <i>Egf/HbEgf</i>	p = 0,0159	SAL	0,061	0,0136	Dunni test, SAL vs KR
		AK	0,0756	0,0209	
		KR	0,0779	0,0128	
Bl6 <i>Egf/DISC1</i>	p = 0,0306	SAL	0,381	0,0767	Dunni test, SAL vs KR
		AK	0,462	0,112	
		KR	0,482	0,0896	
Bl6 <i>HbEgf/ErbB1</i>	p = 0,0036	SAL	0,659	0,063	Dunni test, SAL vs AK SAL vs KR
		AK	0,594	0,100	
		KR	0,560	0,0573	
Bl6 <i>Nrg3/ErbB4</i>	p = 0,0971	SAL	0,666	0,0846	-
		AK	0,622	0,0455	
		KR	0,688	0,0706	
Bl6 <i>Nrg1-3/ErbB4</i>	p = 0,0727	SAL	1,03	0,109	-
		AK	0,973	0,0335	
		KR	1,05	0,0999	
Bl6 <i>ErbB3/ErbB4</i>	p = 0,0725	SAL	0,152	0,0337	-
		AK	0,136	0,0145	
		KR	0,13	0,0208	
129Sv <i>ErbB1/ErbB4</i>	p = 0,0483	SAL	0,19	0,0381	-
		AK	0,207	0,0306	
		KR	0,233	0,0341	

LIHTLITSENTS

Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Anna Katt (sünnikuupäev: 21.05.1996),

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

ErbB perekonna retseptorite ja neile seonduvate ligandide ekspressioon hiire hipokampuses,

mille juhendajad on PhD Annely Lorents ja MSc Taavi Vanaveski,

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

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

olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile;

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

Tartus, 28.05.2018