

TARTU ÜLIKOOL
Loodus- ja täppisteaduste valdkond
Keemia instituut
Neuropsühhofarmakoloogia õppetool

Stella Lise Maanurm

***GABRA2* geeni polümorfismide rs279826 ja rs279858 seos ärevuse
ja depressiivsusega**

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Keemia

Juhendajad:
Prof. Jaanus Harro, MD, PhD
Karita Laagus, PhD

Tartu 2024

INFOLEHT

***GABRA2* geeni polümorfismide rs279826 ja rs279858 seos ärevuse ja depressiivsusega**

Töö raames uuriti GABA-A retseptori alaühiku α_2 geeni ühenukleotiidsete polümorfismide (SNP) rs279826 ja rs279858 seost seisundi-, püsiärevuse ja depressiivsusega. Vastavad genotüübid määrati Eesti laste isiksuse, käitumise ja tervise uuringu (ELIKTU) lapsevanemate valimis, kasutades RT-PCR meetodit. Proovis esinev alleel tuvastati SNP-le seondunud *TaqMan*TM sondi fluorestsentssignaali alusel. Varasemast uuringust oli teada, et rs279826 ja rs279858 A-alleel on ELIKTU laste valimis seotud suurema agressiivsuse ja alkoholi tarbimisega. Töö tulemusena leiti, et naistel on rs279826 A/A genotüüp seotud suurema seisundi- ja püsiärevusega ning rs279826 naiste depressiivsuse ning rs279858 depressiivsuse ja püsiärevuse tulemustes esines heteroosiefekt.

Märksõnad: GABA, GABRA2, GABA-A retseptor, RT-PCR, ELIKTU, SNP, ärevus, depressiivsus, ANOVA, *TaqMan*TM sond

CERCS koodid: B220, B740, B640

The effect of *GABRA2* gene polymorphisms rs279826 and rs279858 on anxiety and depressiveness

The aim of this work was to study the effect of GABA-A receptor subunit α_2 gene's single nucleotide polymorphisms rs279826 and rs279858 on the level of state and trait anxiety and depressiveness. The genotypes of parents in Estonian child personality, behaviour and health study (ECPBHS) were determined using the RT-PCR method. The allele present in the sample was detected by the fluorescence signal of the *TaqMan*TM probe indicative of the SNP. It was previously found in the ECPBHS child sample that rs279826 and rs279858 A-allele carriers had increased levels of aggressiveness and alcohol consumption. As a result of this work, it was found in women that rs279826 A/A genotype was related to increased state and trait anxiety and a heterosis effect was detected in levels of depressiveness and trait anxiety in rs279858 results and in rs279826 women depressiveness results.

Keywords: GABA, GABRA2, GABA-A receptor, RT-PCR, ECPBHS, SNP, anxiety, depressiveness, ANOVA, *TaqMan*TM probe

CERCS codes: B220, B740, B640

SISUKORD

1. TÖÖS KASUTATUD LÜHENDID	4
2. SISSEJUHATUS.....	5
3. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
3.1. Ärevus ja depressiivsus	6
3.2. Ärevuse ja depressiivsuse geneetilised alused	6
3.3. γ -aminobutaanhape ja selle seos ärevuse ning depressiivsusega	7
3.4. GABA-A retseptor ja selle alaühik α_2	9
3.5. <i>GABRA2</i> geeni seos ärevuse ja depressiivsusega.....	11
3.6. Töö eesmärgid	13
4. METOODIKATE KIRJELDUS	15
4.1. Ärevuse ja depressiivsuse hindamine.....	15
4.2. RT-PCR meetod	15
5.1. Kasutatud reagentid	18
5.2. Kasutatud masin ja temperatuuriprogramm	19
5.4. RT-PCR tulemuste analüüs	20
5.5. Andmetöötlus	21
6. TULEMUSED JA ARUTELU.....	23
6.1. Leitud alleelisagedused	23
6.2. rs279826 seos seisundi- ja püsiärevusega ning depressiivsusega	23
6.3. rs279858 seos seisundi- ja püsiärevusega ning depressiivsusega	26
6.4. Tulemuste diskussioon	28
7. KOKKUVÕTE	31
8. SUMMARY	32
9. KASUTATUD KIRJANDUS	33
10. LISAD	41
Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks	48

1. TÖÖS KASUTATUD LÜHENDID

A – adeniin

dATP – desoksüadenosiin trifosfaat

dCTP – desoksütütsüdiin trifosfaat

dGTP – desoksüguanosiin trifosfaat

DNA – desoksüribonukleiin hape

dNTP – desoksüribonukleotiid

dTTP – desoksütümidin trifosfaat

EC₅₀ – poolmaksimaalne efektiivne kontsentratsioon

ELIKTU – Eesti laste isiksuse, käitumise ja tervise uuring

FAM – 6-karboksüfluorestseiini fosforamidaat (CAS number: 204697-37-0)

Fenibut – β -fenüül- γ -aminobutaanhape ehk β -fenüül- γ -aminovõihape

FRET – Försteri-tüüpi resonantne energiaülekanne

G – guaniin

GABA – γ -aminobutaanhape ehk γ -aminovõihape

GABRA2 – γ -aminobutaanhappe retseptori A alaühik α_2

GABRA2 – γ -aminobutaanhappe retseptori A alaühikut α_2 kodeeriv geen

IC₅₀ – poolmaksimaalne inhibeerimiskontsentratsioon

M – keskmine (ingl k *Mean*)

MÅDRS – Montgomery – Åsbergi depressiivsuse hindamise skaala (ingl k *Montgomery-Åsberg Depression Rating Scale*)

MGB – väikse vao ligand (ingl k *Minor Groove Binder*)

mRNA – informatsiooni-RNA (ingl k *messenger RNA*)

NFQ – mittefluorestseeruv vaigistaja (ingl k *nonfluorescent quencher*)

qPCR – kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon (ingl k *quantitative polymerase chain reaction*)

RNA – ribonukleiin hape

ROX – 6-karboksü-X-rodamiin (CAS number: 194785-18-7)

RT-PCR – reaalaaja polümeraasi ahelreaktsioon (ingl k *Real-Time Polymerase Chain Reaction*)

SNP – ühenukleotiidne polümorfism (ingl k *single nucleotide polymorphism*)

STAI – seisund-, püsiärevuse küsimustik (ingl k *State-Traie Anxiety Inventory*)

VIC – 2'-kloro-7'-fenüül-1,4-dikloro-6-karboksüfluorestseiini fosforamidaat (CAS number: 1414265-81-8)

2. SISSEJUHATUS

Ärevus ja depressiivsus on levinud psüühikahäired, mis mõjutavad oluliselt inimeste elukvaliteeti ning emotsionaalset seisundit. Ärevust iseloomustab pidev hirmu- ja muretunne igapäevaelu sündmuste suhtes ning depressiivsust pidev kurbus, tujutus ja negatiivsus elu suhtes. Omakorda on teada, et nii ärevus kui ka depressioon on suures osas seotud geneetiliste riskifaktoritega, mille alla kuuluvad ka ühenukleotiidsed polümorfismid (SNP). Ärevus ja depressiivsus on meeleoluhäired, mis on seotud muutustega närviülekandes ehk virgatsainete signaali aktiivsuses ja/või retseptorite toimimises. γ -aminobutaanhape (GABA) on peamine pidurdusvirgatsaine ajus, mis kontrollib närviülekande aktiivsust. Seega GABAergiline neurotransmissioon, mille osa on ka GABA retseptorid, mõjutab suuresti emotsioonide regulatsiooni ning seekaudu ka ärevuse ja depressiivsuse esinemist. Seejuures seonduvad GABA-A retseptoritega mitmed rahustid ja uinutid, sh ka ärevuse raviks kasutatavad bensodiasepiinid, mis kutsuvad esile ärevust alandavat toimet.

Varasemalt on TÜ Keemia Instituudi neuropsühhofarmakoloogia uurimisrühma tehtud teadustöös leitud, et GABA-A retseptori alaühiku α_2 geeni ühenukleotiidsete polümorfismide rs279826 ja rs279858 A-alleel on seotud suurema alkoholi tarbimise ja agressiivsusega. Kuna alkoholi tarbimise ja agressiivsuse varjatud põhjusteks on kõrge ärevus ja depressiivsus, siis oli antud bakalaureusetöö eesmärk uurida rs279826 ja rs279858 seost ärevuse ja depressiivsusega. Mainitud polümorfismide genotüüpiseerimiseks kasutati RT-PCR meetodit, mis võimaldas DNA paljundamise käigus tekkivate fluoretsentssignaali alusel tuvastada proovis esineva alleeli. Ärevuse ja depressiivsuse tase oli juba eelnevalt leitud ELIKTU uuringu raames, kus depressiivsuse taset oli dimensiooniliselt hinnatud MÅDRS (*Montgomery-Åsberg Depression Rating Scale*) enesekohaste küsimustike ning seisundi- ja püsiärevuse taset STAI (*State-Trait Anxiety Inventory*) enesekohaste küsimustike põhjal.

Käesoleva töö hüpotees oli, et *GABRA2* polümorfismide rs279826 ja rs279858 A-alleel on seotud kõrgema seisundiärevuse, püsiärevuse ja/või depressiivsusega, võrreldes vastavate polümorfismide G-alleeliga.

3. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

3.1. Ärevus ja depressiivsus

Ärevus ja depressiivsus on kogu maailmas, sh ka Eestis, väga laialt levinud psüühikahäired. Tervise Arengu Instituudi ja Tartu Ülikooli poolt aastatel 2020–2022 läbi viidud Eesti rahvastiku vaimse tervise uuringu alusel leiti, et ligikaudu 20% eestlastest on risk kannatada ärevushäirete ning 28% depressiooni all. Neist kõige suurem riskigrupp oli 18–24-a noored täiskasvanud. Samuti selgus uuringu tulemustest, et aastate 2016–2021 jooksul diagnoositi depressioon 12,4% ja ärevushäired 9,8% inimestest. [1] Seoses Sars-CoV-2 koroonaviiruse ülemaailmse leviku ja sellest tingitud suurenenud isolatsiooni tõttu tõusis 2020. aastal võrreldes 2019. aastaga depressiooni ja ärevuse levimus 25% võrra [2]. Ka enne koroonaviiruse pandeemiat olid mõlemad psüühikahäired tõusutrendis. Ärevuse esinemine on olnud rahvastiku seas laiemalt ja kauem levinud kui depressioon, mis vaimse haigusena oli enne 1970ndaid väga haruldane. 21. sajandi jooksul on depressiooni diagnooside arv tunduvalt suurenenud, ärevuse esinemine on seevastu olnud rahvastiku seas suhteliselt väikse ja pideva kasvutrendiga [3].

Ärevus on vaimne seisund, mida iseloomustab intensiivne hirmu-, pinge- ja muretunne, millega kaasnevad emotsionaalsed, kognitiivsed ning füsioloogilised reaktsioonid ja muutused [4]. Ärevust on kahte tüüpi: seisundiärevus (ingl k *state anxiety*), mis esineb lühiajaliselt kindlas olukorras ja on ajutine, ning püsiärevus (ingl k *trait anxiety*), mis ei ole ajutine ning mõjutab elukvaliteeti igapäevaselt [5]. Püsiärevusega on seostatud psühhopatoloogilisi seisundeid ning korduvat erutus- ja ohuseisundit [6]. Ärevusest saab psühholoogiline häire, kui see segab tavapärast elutegevust ning inimeste igapäevaseid sündmusi saadab pidev hirmu- ja muretunne.

Depressiivsus on vaimne seisund, mida iseloomustab patoloogiline raskustunne, ükskõiksus ja tujutus ning negatiivne suhtumine endasse ja tulevikku [7]. Nii depressiivsuse kui ärevuse üheks põhjuseks on emotsioonide düsregulatsioon, mis on tugevalt seotud neurohormonaalse süsteemiga [8]. Tihtipeale esinevad depressiooniga samaaegselt ärevushäired. Näiteks on ligikaudu 50–60% depressiooni all kannatavatest patsientidest teatanud, et neil on esinenud elu jooksul ärevushäireid ning paljudel diagnoositud ärevushäirega patsientidel on varasemalt depressiooni ravitud. [9]

3.2. Ärevuse ja depressiivsuse geneetilised alused

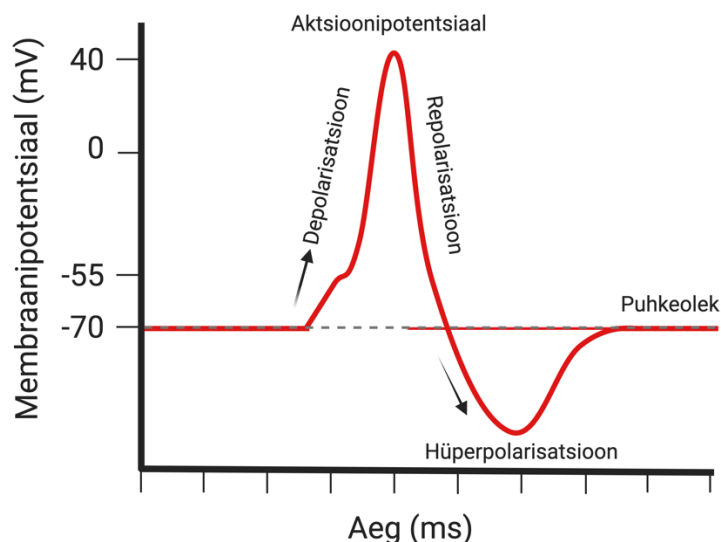
Varasemad uuringud on näidanud, et depressiivsus ja ärevus on 30–50% ulatuses seotud pärilike geneetiliste riskifaktoritega [10,11]. Leitud andmete põhjal on järeldatud, et

geneetilised riskifaktorid kutsuvad koos keskkondlike teguritega esile meeleoluhäireid, sh ka depressiooni ja ärevust, kuid seejuures ei ole jõutud veel arusaamani, millised geneetilised markerid täpselt ärevuse ning depressiooni esinemist mõjutavad [12]. Geneetiliste riskifaktorite alla kuuluvad näiteks DNA polümorfismid. Kuigi inimesed jagavad 99,5% ulatuses identset DNA järjestust, kajastub ülejäänud 0,5% järjestuses polümorfisme, mis võivad avalduda inimeste fenotüüpilises erinevuses. [13]

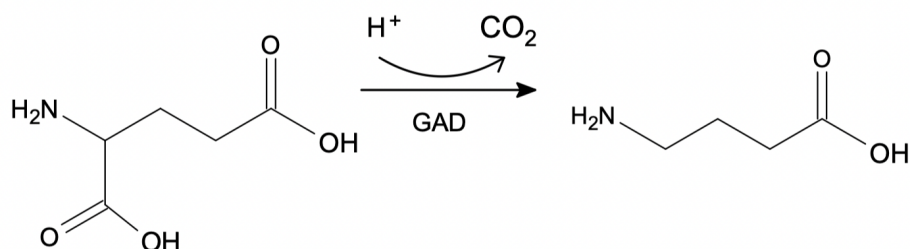
Polümorfism on inimestevaheline geneetiline varieeruvus DNA järjestuses, mis võib väljenduda fenotüüpilises mitmekesisuses. DNA polümorfisme kasutatakse molekulaarsete markeritena geneetilistes analüüsides geenijärjestuses esinevate erinevuste tuvastamiseks. Enim levinud polümorfismid on ühenukleotiidsed polümorfismid (ingl k *single nucleotide polymorphism*, SNP), mille puhul varieerub geenijärjestuses üks nukleotiidi. Samas esineb ka pikemaid polümorfseid geenijärjestusi, kus erinevad mitu nukleotiidi. [14,15] Käesolevas töös uuritud meeleoluhäireid, ärevust ja depressiivsust, on seostatud mitmete ühenukleotiidsete polümorfismidega nii virgatsainete retseptorite, transporterite kui ka lagundavate ensüümide geenides [12].

3.3. γ -aminobutaanhape ja selle seos ärevuse ning depressiivsusega

γ -aminobutaanhape (GABA) on kesknärvisüsteemis laialt levinud inhibeeriva toimega neurotransmitter, mis pidurdab närvisignaalide ülekandeid seondudes postsünaptiliste neuronite (lisa 1) pinnal GABA retseptoritega. See omakorda põhjustab närvirakus hüperpolarisatsiooni, mille tulemusena suureneb kloriidioonide hulk raku sees ning membraani potentsiaali erinevuste vahe. [16] Tekkinud potentsiaal on 15–20 mV võrra madalam kui membraani puhkepotentsiaal -70 mV (joonis 1), alandades seega ka aktsioonipotentsiaali vallandumise tõenäosust raku [17]. Olenevalt ajupiirkonnast kasutab 20–40% neuronitest närviülekanal GABA-t [18]. GABA sünteesitakse presünaptilise neuroni (lisa 1) tsütoplasmas glutamaadist, mis on vastupidiselt GABA-le ergastava toimega virgatsaine (joonis 2) [19]. Nende kahe neurotransmitteri vahelise tasakaalu häiritus närvisüsteemis on seotud mitmete neuroloogiliste ja psühhiaatriliste haigusseisunditega, sh ka depressiivsusega [20].



Joonis 1. Aktsioonipotentsiaal ja hüperpolarisatsioon.



Joonis 2. γ -aminobutaanhappe sünteesireaktsioon glutamaadist. GAD (ingl k *glutamic acid decarboxylase*) tähistab glutamaadi dekarboksülaasi.

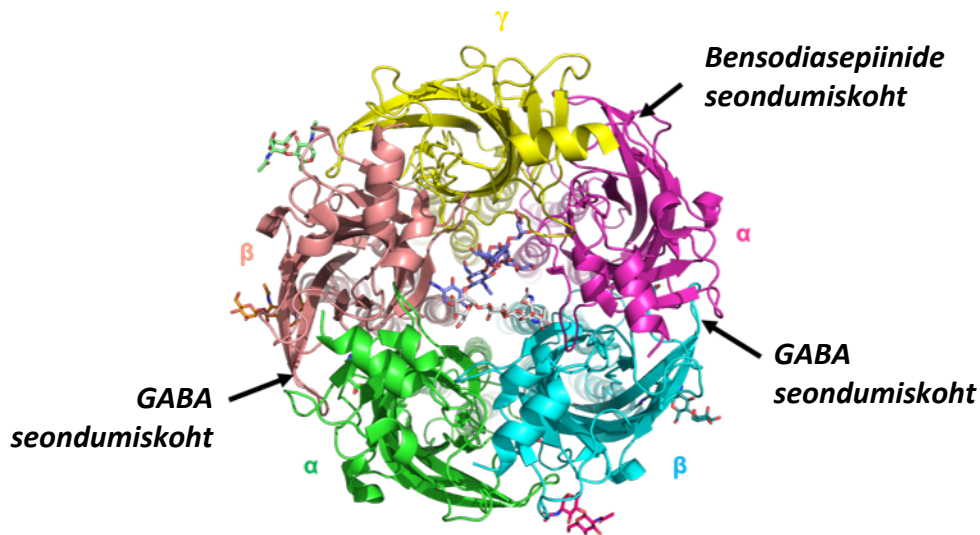
GABA ülekande aktiivsuse seost depressiooniga kinnitavad ka varasemad andmed vähenenud aktiivsuse kohta patsientide ajus ning GABA taseme taastumisest pärast ravi antidepressantidega [21,22]. Samuti on GABAergilise süsteemi ehk GABA tootvate ja GABA retseptoreid sisaldavate närvirakkude süsteemi talitlushäireid seostatud ärevuse ja skisofreeniaga [23,24]. Psühhiaatriliste haiguste seos vähenenud GABA aktiivsusega on põhjenduseks, miks kasutatakse GABA toidulisandina, et leevendada ärevust ja stressi ning parandada unekvaliteeti [25]. Varasemad uuringud on aga leidnud, et γ -aminobutaanhape ei läbi vere-aju barjääri, mistõttu on GABA manustamine suukaudselt kaheldava toimega [26]. Vere-aju barjääri ületab aga γ -aminobutaanhape derivaat β -fenüül- γ -aminobutaanhape (fenibut) (lisa 2), mida kasutatakse närvisüsteemi aktiivsust reguleeriv mõju tõttu ning millel on uinutav ja rahustav toime. Fenibuti poolmaksimaalse inhibeerimiskontsentratsiooni (IC_{50}) väärtus GABA-A retseptorite puhul on $>100 \mu\text{M}$, olles seejuures palju suurem kui GABA enda IC_{50} väärtus $0,12 \mu\text{M}$. Seega seondub fenibut GABA-A retseptoritega võrreldes GABA endaga

palju madalama afiinsusega. Peamiselt avaldab fenibut toimet seondudes GABA-B retseptoritega. [27,28]

3.4. GABA-A retseptor ja selle alaühik α_2

GABA retseptoreid on kahte sorti: GABA-A ja GABA-B retseptorid. GABA-A retseptorid on pentameersed ionotroopsed retseptorid, mis tekitavad hüperpolarisatsiooni transmembraanse kloriidi ionkanali kaudu [29]. GABA-A retseptorid koosnevad erinevate alaühikute kombinatsioonidest, moodustades seega mitmeid isovorme. Kokku on selliseid alaühikuid 19: $\alpha 1-6$, $\beta 1-3$, $\gamma 1-3$, $\rho 1-3$, δ , ϵ , π ja θ . Alaühikute lai valik on ka põhjuseks, miks ulatub GABA-A retseptorite isovormide arv närvisüsteemis sadadesse. Üks funktsionaalne retseptori isovorm koosneb viiest erinevast alaühikust, kõige levinumalt kahest α , kahest β ja ühest γ alaühikust. GABA seondumiskoht A retseptoril asub α ja β alaühiku vahel (joonis 3). Ligandi seostumisel endogeense agonisti seondumiskohta ehk ortosteerilisse saiti toimub retseptoris konformatsioonimuutus, mille tulemusena avaneb kloriidiooni spetsiifiline ionkanal. Ligand seostub retseptorile molekulidevaheliste jõudude alusel. [30,31]

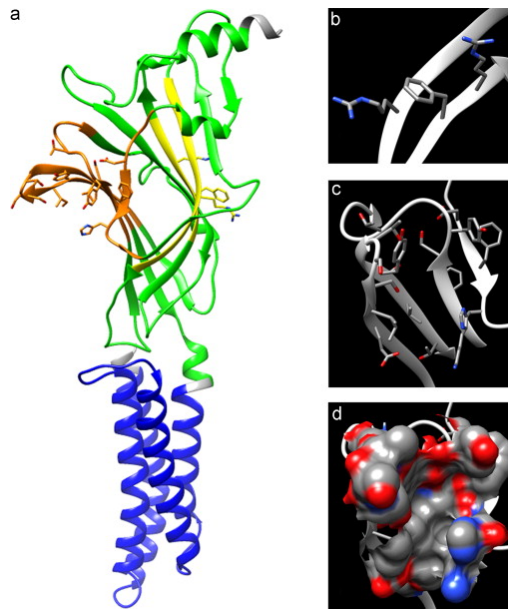
Lisaks ortosteerilistele aktiivtsentritele on GABA-A retseptoritel allosteerilised seondumiskohad, kuhu liituvad GABA modulaatorid, reguleerides GABA-A retseptori toimimist ning GABA toimet. GABA allosteerilised modulaatorid jagunevad negatiivseteks ja positiivseteks, seejuures vastavalt vähendades või suurendades endogeense ligandi afiinsust retseptori suhtes või mõjutades kloriidiooni liikumist rakku. GABA-A retseptoritega seonduvad mitmed olulised rahustina kasutatavad ravimid, mis mõjutavad GABAergilist närviülekanet. Ärevuse raviks kasutatavad bensodiasepiinid (lisa 3) seonduvad allosteerilisse seondumiskohta α ja γ alaühikute vahel (joonis 3), suurendades retseptori afiinsust GABA suhtes. [32] Sigel *et al.* leidsid, et 1 μM diasepaami (bensodiasepiinide perekonda kuuluv ravim, tuntud nt Valiumi nime all) manustamisel vähenes GABA poolmaksimaalse efektiivse kontsentratsiooni (EC_{50}) väärtus poole võrra [33]. See näitab, et diasepaami seondumisel GABA-A retseptorile on maksimaalse inhibeerimise efekti saamiseks vaja väiksemat GABA kontsentratsiooni ja seda efektiivsem on GABA mõju närviülekanete pidurdamisel. Lisaks anksiolüütilisele toimele on bensodiasepiinidel ka rahustav, uimastav, lihaseid lõdvestav ja krambivastane toime [34]. Bensodiasepiinide antagonist on flumaseeniil, mis toimib konkureeriva antagonistina bensodiasepiinide retseptoritel ning mida kasutatakse nende üleannustamise korral [35]. Teised positiivsed modulaatorid on nt barbituraadid, alkohol, anesteetikumid ja neurosteroidid, mis suurendavad GABA toimet, pikendades seondumisel ionkanali avanenud oleku kestust ja suurendades avanemise sagedust [36,37].



Joonis 3. GABA ja bensodiasepiinide seondumiskohad GABA-A retseptoril [38]. Kollasega on märgitud γ alaühik, roosa ja rohelisega α alaühikud, sinise ja beežiga β alaühikud. Pulkadena on struktuuris tähistatud valgule seondunud glükaani molekulid. (Joonis on kohandatud inglise keelest)

Nii ärevuse kui ka depressiivsuse seostamine GABA retseptorite defitsiidiga on leidnud teadusmaailmas aina enam tõendeid. Varasemad uurimistööd on analüüsinud kroonilise stressi mõju suurajukooses ning leidnud, et stressi ulatust mõjutas GABA-A retseptorite vähenenud aktiivsus ja toime, soodustades depressiivsuse esinemist [39]. Earnheart *et al.* on 2007. a läbiviidud loomkatsetega demonstreerinud, kuidas GABA-A retseptori defitsiit ajus käivitab hiirtel depressioonilaadse käitumise [40]. Vollenweider *et al.* leidsid 2011. a kliiniliste katsete raames, et α_2 alaühikut sisaldavate GABA-A retseptorite modulaatorid võiksid sobida kasutamiseks antidepressantidena [41]. Lisaks kajastati Atask *et al.* 2006. a teadusartiklis, et ligandid, mis seonduvad suure afiinsusega just α_2 või α_3 alaühikut sisaldavate GABA-A retseptoritega, avaldasid närvisüsteemile anksiolüütilist mõju [42]. Seega võib järeldada, et α_2 alaühik on oluline ärevust ja depressiivsust leevendava toime vahendamisel.

GABA-A retseptori alaühik α_2 (GABRA2) on 451-st aminohappejäägist koosnev valk (joonis 4), mis sisaldub ligi 15–20% GABA-A retseptorites [43,44]. Seejuures on vastavat alaühikut rohkelt ekspresseeritud mesolimbilise dopaminergilise raja piirkonnas, sh naalduvas tuumas, mediaalses ja basolateraalses amügdalas ning hipokampuse CA1 ja CA3 osades. Limbilisel süsteemil on oluline roll just informatsiooni seostamisel emotsioonidega ja käitumise motivatsioonide kujundamisel, mis on seotud nii ärevuse, stressi kui ka hirmu tajuga. [45,46]



Joonis 4. GABA-A retseptori alaühik α_2 [47]. Joonisel 4a on kujutatud üldine α_2 struktuur, kus sinine osa tähistab membraanisest domeeni, roheline osa rakuvälise domeeni, kollasega on märgitud GABA seondumiskoht alaühikul ja oranžiga bensodiazepiinide seondumiskoht. Joonisel 4b on detailsem vaade GABA seondumiskohast koos oluliste aminohappejääkidega (Phe92, Arg94, Arg159). Joonisel 4c on detailsem vaade bensodiazepiinide seondumiskohast, kus on märgitud ära olulisemad aminohappejäägid (Asp97, Phe99, Gly157, Ala160, Thr162, Ser204-205, Thr206, Tyr209, Val211). Joonisel 4d on näha bensodiazepiinide seondumiskoha molekulaarne pind. (Joonis on kohandatud inglise keelest)

α_2 alaühikul esineb ka posttranslatoorseid modifikatsioone, mis reguleerivad GABA-A retseptorite vahendatavat sünaptilist inhibeerimise tugevust. Peamine posttranslatoorne modifikatsioon on proteiinkinaas A reguleeritud Ser359 fosforülatsioon, mille tulemusena väheneb α_2 alaühikut sisaldavate GABA-A retseptorite tihedus postsünaptilistel neuronitel ja seeläbi ka närviülekanne pidurdus. [48]

3.5. *GABRA2* geeni seos ärevuse ja depressiivsusega

Üha enam on leitud tõendeid selle kohta, et GABA-A alaühikute geenide polümorfismid on seotud meeleoluhäiretega. *GABRA2* valku kodeeriva geeni (*GABRA2*) SNP-de haplotüüpide väiksema esinemissagedusega alleele ehk mutantalleele on seostatud vähenenud GABA inhibeeriva aktiivsusega ajus ja sellest tulenevalt ka kõrgeenenud emotsionaalse erutuvusega [49]. *GABRA2* geeni on rohkelt uuritud just alkoholi tarvitamise ja uimastisõltuvusega seoses ning on leitud palju tõendeid selle kohta, et *GABRA2* SNP-d mõjutavad mainitud

psühholoogiliste probleemide esinemist. Strac *et al.* 2015. a ilmunud artiklis kajastati GABA-A retseptori seost alkoholi tarbimisest tuleneva agressiivse käitumisega ning leiti seos *GABRA2* SNP-de rs279858 ja rs567926 A-C haplotüübi kandjate ja suurenenud agressiivsuse vahel [50]. Jin *et al.* leidis 2014. a avaldatud uuringus, et alkohoolikutel on võrreldes alkoholi mittetarbijatega vähenenud *GABRA2* mRNA ekspressioon amügdala piirkonnas, millest võib järeldada, et pidev alkoholi tarbimine mõjutab *GABRA2* retseptorite toimimist mRNA tasemel [51]. Varasemad andmed viitavad, et alkoholisõltuvuse riski määramisel tuleb hinnata ka *GABRA2* interaktsiooni keskkondlike ja elustiilist tulenevate faktoritega [52]. Lisaks alkoholisõltuvusele seostatakse *GABRA2* polümorfisme ka uimastisõltuvusega, seejuures on leitud, et *GABRA2* on seotud tasu kognitsiooni reguleeriva süsteemi toimimisega ajus [53]. Seda kinnitab ka Sun *et al.* 2018. a leitud seos *GABRA2* SNP rs279858 G-alleeli ja suurenenud heroini tarbimise vahel. Sama uuringu raames leiti, et heroinitarbijatel on tasusüsteemiga seotud juhteteed ajus häiritud. [54] *GABRA2* seos uimastitega seotud närviraja talitlusega viitab ka selle võimalikule korrelatsioonile ärevuse ja depressiivsusega.

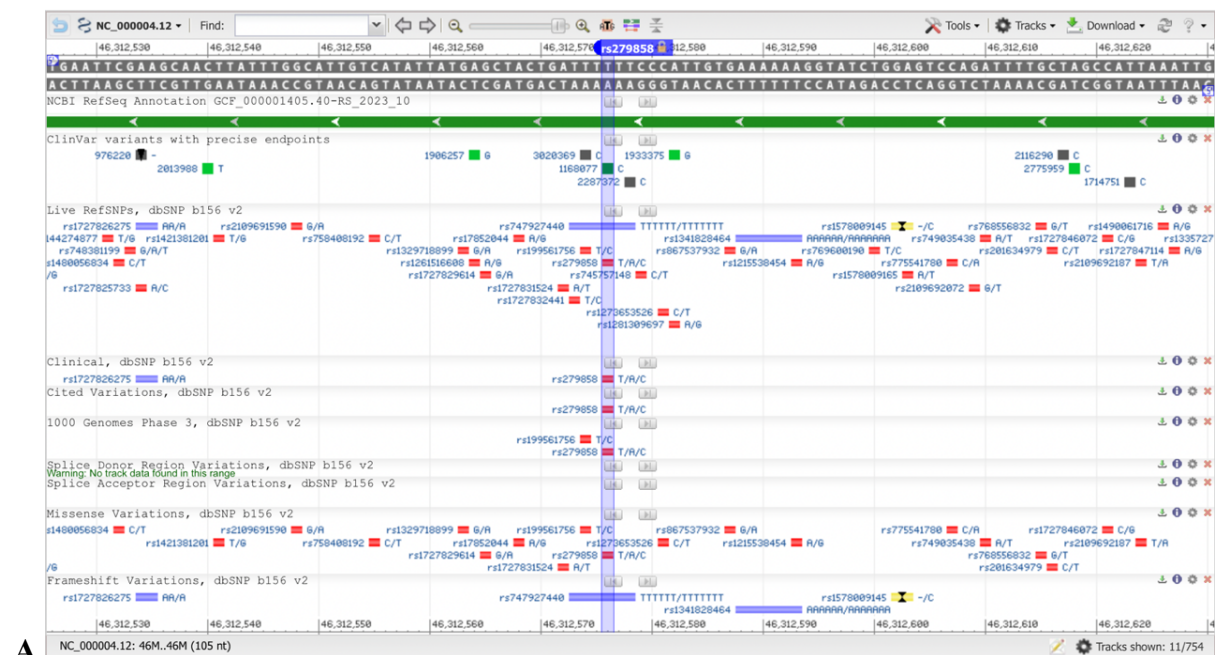
Agrawal *et al.* 2006. a ilmunud artiklis kajastati seevastu andmeid selle kohta, et rs279871, rs279858 ja rs279826 peamine (A) alleel on seotud suurenenud alkoholi ja uimastisõltuvuse riskiga [55]. Sarnase tulemuseni jõudis ka Tartu Ülikooli neuropsühhofarmakoloogia õppetooli poolt 2017. a tehtud teadustöö. Uuring viidi läbi Eesti laste isiksuse, käitumise ja tervise uuringu (ELIKTU) raames, kus analüüsiti inimeste agressiivsuse tunnuseid ja alkoholi tarbimist spetsiifiliste küsimustike alusel. Uuringu tulemusena leiti, et A-alleeliga lastel, kes kogesid lapseas stressirohkemaid sündmusi, arenes tugevam alkoholisõltuvus ja esines ka agressiivsuse tunnuseid. Antud uuringus leiti, et rs279826 ja rs279858 on tugevalt aheldatud, mis tähendab, et nende mõju retseptorile on sarnane ja on alust uurida mõlemat SNP-d koos. [56]

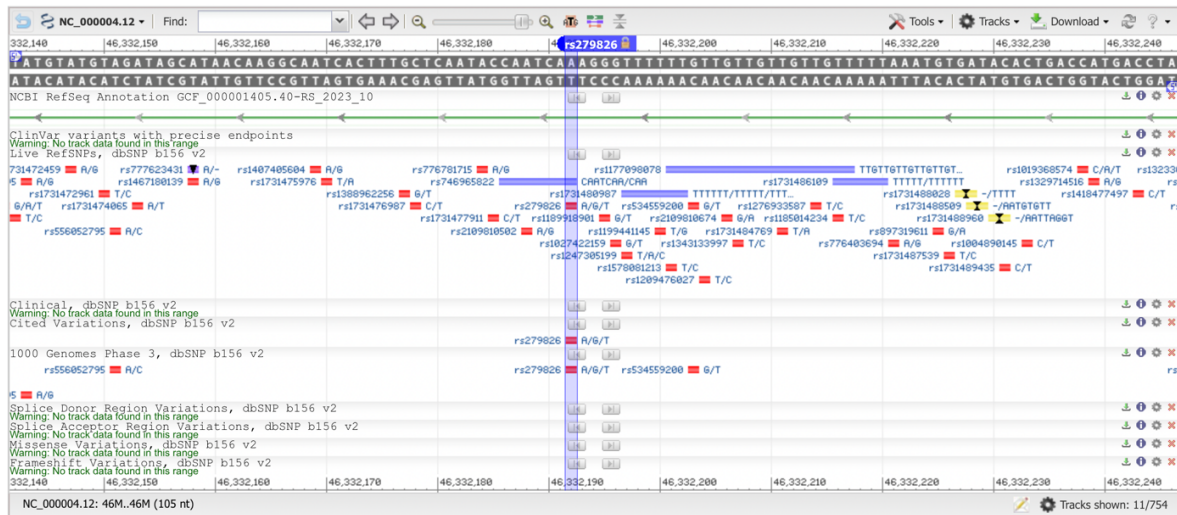
Inimesed tarbivad ärevuse maandamiseks alkoholi ja teisi uimasteid. Braun *et al.* on 2012. a välja antud artikli raames leidnud, et alkoholisõltuvuse häired on tugevalt komorbiidsed ärevushäiretega. [57] Samuti on depressiivsus tugevalt komorbiidne ärevushäiretega ning 2020. a läbiviidud geneetilise assotsiatsiooniuuringu raames leiti, et ärevushäirete ja depressiooni fenotüüpide vahel on geneetiline seos [58]. Sellest järelduvalt võib liigset alkoholi ja narkootikumide tarbimist seostada ka kõrgema ärevuse ning depressiivsusega. Kuna *GABRA2* on ajus ärevuse juhteteid kontrolliva GABAergilise neurotransmissiooni moduleerimisel oluline, tuleks uurida *GABRA2* geeni polümorfismide seost ärevuse ja depressiivsusega.

Käesolevas töös uuritud SNP-d on mõlemad funktsionaalsed ehk on leitud, et neil on mõju närvisüsteemi toimimisele ajus [59]. Kuna uuritav geenivariatsioon rs279826 asub DNA intronpiirkonnas, ei ole sellel mõju peptiidjärjestuse funktsionaalsusele. Siiski on näidatud, et intronpiirkonnad võivad reguleerida geeniekspressiooni näiteks mittekodeerivate RNA-de kaudu, mõjutades mRNA taset rakus [60]. Seevastu rs279858 asub geeni mRNA-d kodeerivas eksonpiirkonnas, millelt omakorda transleeritakse vastav peptiidjärjestus. Siiski on teada, et rs279858 polümorfismi puhul on tegemist vaikiva mutatsiooniga ehk see SNP ei avalda mõju valgu aminohappelisele järjestusele ja seda seostatakse samuti muutustega *GABRA2* mRNA ekspressioonis [61].

3.6. Töö eesmärgid

Käesoleva töö eesmärk oli uurida, kas ELIKTU lapsevanemate valimis on *GABRA2* geeni SNP-d rs279826 ja rs279858 (joonis 5) seotud laiemalt ärevuse ja depressiivsusega. Antud töö puhul hinnati genotüübi seost nii seisundi- ja püsiärevusega kui ka depressiivsusega. *GABRA2* rs279826 ja rs279858 polümorfismi mutantalleel ehk väiksema esinemissagedusega nukleotiid genijärjestuses on guaniin (G) ja peamine alleel ehk suurema esinemissagedusega nukleotiid on adeniin (A). Varasematest uuringutest on teada, et Eestis on rs279826 polümorfismi alleelisagedused vastavalt A = 51% ja G = 49% ning rs279858 korral A = 56% ja G = 44% [62].





B NC_000004.12: 46M..46M (105 nt)

Joonis 5. A – SNP rs297858 asukoht *GABRA2* geenis [63]; B – rs279826 asukoht *GABRA2* geenis [64]. Numbrid ülemises ääres tähistavad nukleotiidide loetelu kromosoomis, punased täpid ja lillad lõigud tähistavad erinevaid polümorfisme.

Antud töö hüpotees oli, et *GABRA2* polümorfismide rs279826 ja rs279858 A-alleel on võrreldes vastavate polümorfismide G-alleeliga seotud kõrgema seisundiärevuse, püsiaärevuse ning depressiivsusega. Kuigi kirjanduses on rohkem andmeid selle kohta, et G-alleel on seotud suurema psühhopatoloogiliste seisundite esinemise tõenäosusega, siis käesoleva töö puhul oli hüpotees püstitatud uurimisrühma eelneva teadustöö põhjal, mille raames leiti A-alleeli seos kõrgema agressiivsuse ja alkoholi tarbimisega ELIKTU laste valimis.

Teadusprojekti laiem eesmärk on ärevust ja depressiivsust soodustavate geneetiliste riskifaktorite tuvastamine, mille põhjal saaks tulevikus potentsiaalselt ennetada ning ravida vastavaid psüühikahäireid. *GABRA2* SNP-de rs279826 ja rs279858 seos seisundi- ja püsiaärevuse ning depressiivsusega võimaldaks ennetada psüühikahäireid ning uurida, kuidas keskkondlikud tingimused nimetatud fenotüüpe genotüübiväliselt mõjutavad ning soodustavad. Samuti saab uurida, kas ravimite toime sõltub SNP-dest ja kas ning milliseid, erinevusi leidub uuritavate SNP-de vahel. Lisaks saab laste valimi põhjal analüüsida lastevanematel esinevate polümorfismide pärandumist ning sellest tulenevaid seoseid lastel püsi- ja seisundiärevusega, depressiivsusega ning ka genotüübi mõju perekeskonnale. Saadud info võimaldab eelmainitud faktoreid arvesse võttes luua paremaid personaliseeritud ravistrateegiaid.

4. METOODIKATE KIRJELDUS

4.1. Ärevuse ja depressiivsuse hindamine

Antud töös hinnati ärevuse ja depressiivsuse sümptomteid, kasutades Tartu Ülikooli ja Tervise Arengu Instituudi teadlaste poolt tehtud ELIKTU lapsevanemate uuringu tulemusi. ELIKTU on longituudne ja laiahaardeline uuring, mis hõlmab 1176 last, keda jälgitakse aktiivselt teatud ajaperioodide tagant lapseast täiskasvanuni. ELIKTU uuringu eesmärk on uurida Eesti laste tervise kujunemist, jälgida riskitegureid, mis mõjutavad tervistkahjustavat käitumist, ja nende muutumist ajas. Lähteuuring toimus aastatel 1998/1999, milles osalesid Tartu linna ja maakondade 9- ja 15-aastased lapsed, moodustades kaks kohorti. Nüüdseks on noorem kohort käinud uuringus viis ja vanem kohort neli korda. Aastatel 2011-2013 koguti andmeid laste emade-isade kohta, moodustades ELIKTU lapsevanemate valimi. [65] ELIKTU lapsevanemate uuring on tehtud eetikakomitee loa nr 197T-14 alusel.

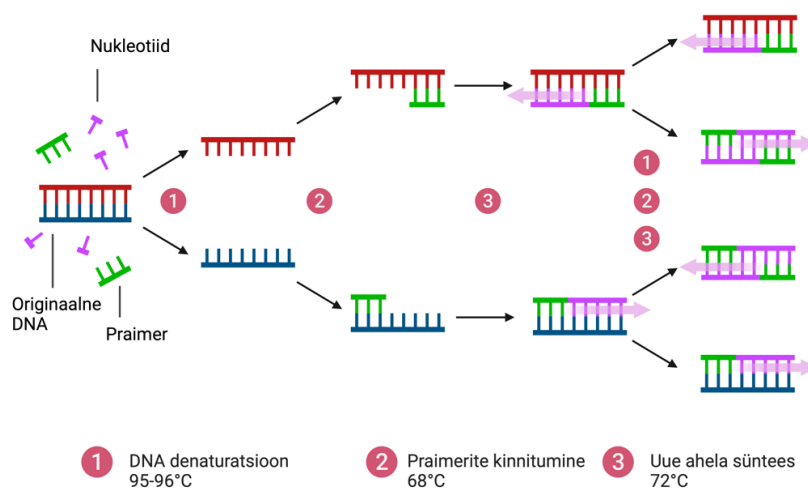
ELIKTU uuringus on ärevust hinnatud Stait-Trait Anxiety Inventory (STAI) küsimustiku alusel ning depressiivsust Montgomery–Åsbergi depressiooni skaalaga (MÅDRS). STAI küsimustik koosnes kahest eraldi osast: üks seisundi- (STATE) ja teine püsiärevuse (TRAIT) jaoks. Mõlemas küsimustikus oli kokku 20 küsimust ning maksimaalne skoor oli mõlemal juhul 80. Tulemus 20–37 viitas madalale ärevusele, 38–44 mõõdukale ärevusele ja 45–80 kõrgele ärevusele. MÅDRS küsimustik koosnes 9 küsimusest maksimaalse skooriga 54, kus tulemus 0–6 viitas depressiooni puudumisele, 7–19 kergekujulisele depressioonile, 20–34 mõõdukale depressioonile ja 35–54 raskekujulisele depressioonile. [66,67]

4.2. RT-PCR meetod

GABRA2 polümorfismide identifitseerimiseks kasutati reaalaaja polümeraasi ahelreaktsiooni (ingl k *Real Time Polymerase Chain Reaction*, RT-PCR) meetodit. Erinevalt tavalisest PCR-ist võimaldab RT-PCR jälgida DNA amplifitseerumise protsessi reaajas, saada seetõttu ka täpsemaid tulemusi ning vajadusel läbi viia kvantitatiivset analüüsi. RT-PCR eeliseks on kõrge efektiivsus, tundlikkus, kiirus, järjestus-spetsiifilisus ning võimalus kasutada vähe geneetilist algmaterjali – minimaalne genoomse DNA kogus reaktsiooni jaoks on 5 ng. Samas on RT-PCR puuduseks võimalikud vale-positiivsed tulemused, mida võib esineda kuni 7% ulatuses. Vale-positiivsed tulemused tulenevad proovide suurest tundlikkusest saastatuse suhtes ja vigasest sünteesisprotsessist, mida mõjutavad muutused DNA-s ja inhibeerivad ühendid lahuses. [68,69] Nende vältimiseks kasutati töös kõrge puhtusega reagente ja positiivseid kontrollid.

Meetodi kasutamise käigus valmistatakse PCR-i tarbeks iga uuritava DNA kohta reaktsioonisegu, milles toimub PCR-i jooksul väljavalitud DNA lõigu amplifitseerimine (joonis 6). PCR koosneb kolmest peamisest etapist. Esmalt denatureeritakse DNA, katkestades ca 95 °C juures DNA kaksikeheliksi vahelised sidemed. Teiseks seonduvad temperatuuri alandamisel eelnevalt välja valitud kindla DNA piirkonna otstesse komplementaarse järjestusega praimerid. Praimer on ühtlasi nukleinhappe lõik, mis märgistab DNA replikatsiooni alguskoha. Kolmandaks toimub DNA polümeraasi abil uue ahela süntees ning uuritava DNA piirkonna lõikude arv suureneb kaks korda. Pärast n tsükli on lahuses 2^{n+1} DNA lõiku, mille tulemusena toimubki uuritava DNA piirkonna paljundamine. [70]

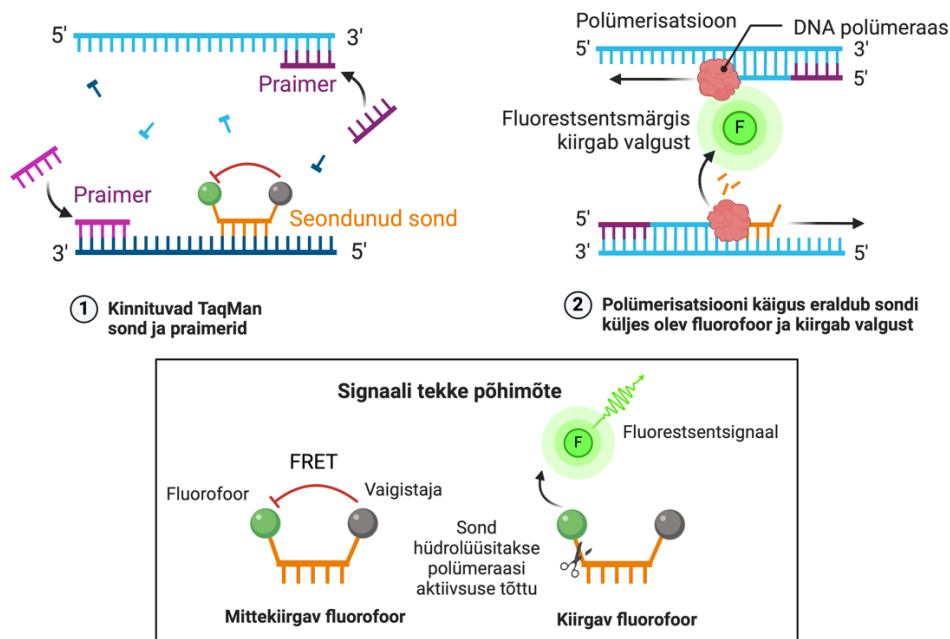
Polümerisatsiooni ahelreaktsioon - PCR



Joonis 6. Polümerisatsiooni ahelreaktsioon. Numbrid tähistavad PCR reaktsiooni etappe, kus 1. on denaturatsioon, 2. praimerite kinnitumine ja 3. uue ahela süntees. Etapid korduvad iga tsükli korral.

PCR-i teostades asub praimerite vahelisel DNA alal antud töös uuritav polümorfism rs279826 või rs279858, millele seonduv genotüpiseerimise protsessi käigus *TaqMan*TM sond (joonis 7). *TaqMan*TM sondid on oligonukleotiidsed DNA järjestused, mis koosnevad 5' otsas paiknevast fluorestsentsmärgisest ja 3' otsas paiknevast vaigistajast. Vaigistaja summutab fluorofoori kiirgust Försteri-tüüpi resonantse energiaülekanne (FRET) teel kuni see asub vaigistaja vahetus läheduses ehk seotuna oligonukleotiidsed sondi külge [71]. Käesolevas töös kasutatav vaigistaja oli NFQ-MGB, kus MGB tähistab väikese vao ligandi (ingl k *minor groove binder*) ning NFQ tähistab mittefluorestseeruvat vaigistajat (ingl k *nonfluorescent quencher*). Seejuures võimaldab MGB kasutamine suurendada sondi sulamistemperatuuri (T_m) ehk temperatuuri, mille juures 50% kaheaahelalisest DNA-st on denatureerunud olekus. Kõrge sulamistemperatuur

aitab kaasa sondi ja geenijärjestuse vahelise stabiilsuse suurendamisele ning võimaldab seega kasutada lühemaid sonde. NFQ kasutamine võimaldab summutada fluorofoori kiirgust kuni sond on seotud DNA külge ning seekaudu mõõta täpsemat signaali, kuna vaigistaja ise fluorestsentssignaali ei eralda. *TaqMan*TM sondi nukleotiidjärjestus on komplementaarne uuritava polümorfismiga – vastavalt ühele või teisele nukleotiidile, kinnitub polümorfismi piirkonna geenijärjestusele ainult komplementaarse järjestusega *TaqMan*TM. [72,73]



Joonis 7. *TaqMan*TM sondi põhimõte ja fluorestsentssignaali teke polümeraasi reaktsioonil.

DNA polümeraas on ensüüm, mis sünteesib üheaahelalisele DNA-le komplementaarse järjestuse. Polümeraas alustab sünteesi praimerit juurest DNA 5' otsas. Kui ensüüm jõuab polümeerisatsiooni käigus DNA matriitsahelale kinnitunud *TaqMan*TM sondini, toimub sondi hüdrolüüs, mida võimaldab DNA polümeraasi 5'–3' eksonukleasne aktiivsus. Selle tulemusena lõhutakse fluorestsentsmärgis sondi küljest lahti ja see vabaneb lahusesse. Vabanenud fluorofoor kiirgab valgust (joonis 7) ning vastav signaal jõuab masina vastuvõtjasse. Mõlemale võimalikule alleelile vastab fluorofoori erineva struktuuri tõttu kindla intensiivsusega fluorestseeruv signaal, mille järgi hindab masin, millise nukleotiidiga on tegemist. [74] Iga uuritav proov kiirgab vastavalt SNP-le seondunud fluorestsentsmärgisele signaali kahe nukleotiidi kohta, sest rakutuumas on kaks koopiat samast geenijärjestusest. Seejärel on kahe nukleotiidi signaalide alusel võimalik tuvastada proovi genotüüp. A/G genotüübi puhul on fluorestsentssignaal vastavalt kahe fluorofoori poolt kiirratava valguse segu. Juhul, kui tekib probleem praimerite seondumisel, kas ebasobiva komplementaarsuse, DNA materjali kehva kvaliteedi või liiga madala kontsentratsiooni tõttu, jääb genotüüp määramata.

5. EKSPERIMENTAALNE OSA

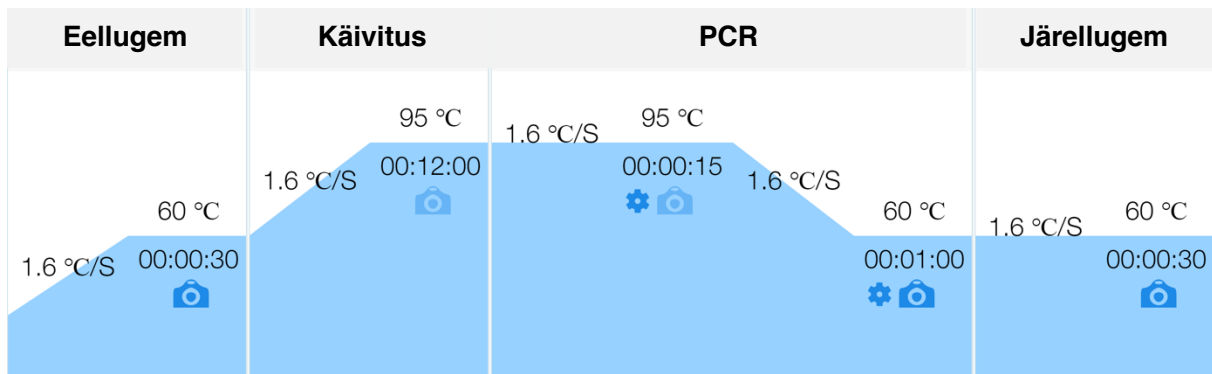
5.1. Kasutatud reagentid

PCR-i üldlahusena kasutati töös HOT FIREPol® Probe qPCR Mix Plus'i, mis on toodetud Solis Biodyne'i poolt. Lahus sisaldas keemiliselt modifitseeritud FIREPol® kuumkäivitust võimaldavat DNA polümeraasi ja 5x qPCR puhverlahust. Puhver omakorda sisaldas 15 mM MgCl₂ lahust, desoksüribonukleotiide (dNTP-d: dATP, dCTP, dGTP ja dTTP) ja referentsfluorofoori. Polümorfismi rs279826 spetsiifilise seguna, mis sisaldas vastavaid primereid ja *TaqMan*TM sondi, kasutati Applied Biosystems'i poolt toodetud C__1027170_10 lahust. Amplifitseeritava järjestuse ala oli selle lahuse korral vastavalt CAATCACTTTGCTCAATACCAATCA[A/G]AGGGTTTTTTGTTGTTGTTGTTGTT (51 aluspaari) ning asukoht kromosoomis 4: 46332192–46332192. Muu teave oli tootja poolt omandiõigusega kaitstud. Polümorfismi rs279858 spetsiifilise seguna kasutati sama tootja poolt lahust C_2073557_1, mille amplifitseeritava järjestuse ala oli vastavalt TTGTCATATTATGAGCTACTGATTT[C/T]TTCCCATTGTGAAAAAAGGTATCTG (51 aluspaari) ja asukoht kromosoomis 4: 46312576–46312576. Töös kasutatud ELIKTU lapsevanemate genome DNA oli juba eelnevalt veenivereproovidest eraldatud, kasutades Qiagen QIAamp® DNA Blood Midi Kit'i või NucleoSpin® Blood Kit'i. DNA-d säilitati -20 °C juures 5 mM Tris-HCl puhverlahuses pH-ga 8,5. Varasemalt NanoDrop spektrofotomeetriga leitud DNA kontsentratsioon proovides oli vahemikus 20–30 ng/μl ja DNA puhtus A280/260 suhte järgi vahemikus 1,5–2. PCR lahuses kasutatud Milli-Q vesi oli puhtusega 18,2 MΩ-cm.

Juhul, kui geeni polümorfismes alas esines A nukleotiid, seondus polümorfismile 6-VIC fluorofoori (2'-kloro-7'-fenüül-1,4-dikloro-6-karboksüfluorestseiini fosforamidaat; struktuur toodud lisa 4) kandev *TaqMan*TM sond, mille ergastuseks vajalik lainepikkus oli 526 nm ning emissiooni lainepikkus 543 nm. Kui aga geeni polümorfismes alas esines G nukleotiid, siis seondus polümorfismile 6-FAM fluorofoori (6-karboksüfluorestseiini fosforamidaat; struktuur toodud lisa 4) kandev sond, mille ergastamiseks vajalik lainepikkus oli 495 nm ning emissiooni lainepikkus 520 nm. [75] Mõõdetud fluorofoori (VIC või FAM) fluorestsentssignaal normaliseeriti referentsfluorofoori suhtes. Käesolevas töös kasutati referentsfluorofoorina inertset 6-ROX-i (6-karboksü-X-rodamiini; struktuur toodud lisa 4), mille signaal ei sõltunud PCR reaktsioonist. ROX-i fluorestsentssignaali mõõtmine võttis arvesse optilise tee varieeruvust plaatide süvendites ning võimaldas leida optimaalseima tulemuse. ROX-i ergastuslainepikkus oli 578 nm ja emissiooni lainepikkus 604 nm. [76,77]

5.2. Kasutatud masin ja temperatuuriprogramm

Proovide analüüsimiseks kasutati RT-PCR meetodil töötavat masinat QuantStudio Pro 6 ja tulemuste leidmiseks tarkvara Design & Analysis 2.2 Real-Time PCR System, kus koostati ka kasutatud temperatuuriprogramm (joonis 8). Temperatuuriprogrammi järgi tõusis algselt temperatuur 30 sekundi jooksul 60 °C-ni, mille ajal mõõdeti masina esialgne taustsignaal, mille suhtes PCR-i käigus saadud fluorestsentsandmeid korrigeeriti. Sealt edasi tõusis temperatuur 12 minuti jooksul 95 °C-ni ja toimus DNA polümeraasi aktiveerumine. Järgnevalt algas PCR etapp, kus 95 °C juures toimus 15 sekundi jooksul DNA kaksikheeliksi denatureerumine kaheks eraldi järjestuseks. Seejärel langes temperatuur 1 minuti jooksul tagasi 60 °C juurde, mille jooksul toimus praimerite kinnitumine ning DNA polümeraasi abil uue ahela süntees. PCR tsüklitel kordus uuesti 40 korda. Pärast PCR etappi mõõdeti 60 °C juures 30 sekundi jooksul lõplikud fluorestsentssignaalid, millest lahutati maha eellugemi käigus mõõdetud taustsignaal. Järellugemi käigus mõõdetud signaalide alusel leiti genotüüpiseerimistulemused. Proovide ergastamine ja signaalide detekteerimine toimus viies kanalis. Masinas kasutatav detektor oli fotodiod ja ergastusallikas LED lamp.



Joonis 8. Kasutatatud RT-PCR temperatuuriprogramm.

5.3. Töö käik

Enne igat katset soojendati vajalikud reagentid toatemperatuurini. Seejärel segati Eppendorf tuubis kokku vastavalt analüüsitavate proovide arvule vajalikes kogustes ja sobivates vahekordades reaktsioonisegu. Reaktsioonisegu sisaldas Milli-Q vett, HOT FIREPol® Probe qPCR Mix Plus üldist PCR segu ja rs279826 korral C__15866557_10 spetsiifilist segu ning rs279858 puhul C_2073557_1 spetsiifilist segu. Vajaliku koguse reaktsioonisegu valmistamiseks arvestati, et proovid kantakse 384-süvendiga mikrotiiterplaadile.

Teises etapis lisati plaadi kõikidesse süvenditesse (v.a esimesse ja viimasesse süvendisse ning teise, kolmandasse ja neljandasse süvendisse) 1 µL DNA-d. Kahte viimasesse süvendisse lisati negatiivse kontrollina 1 µL Milli-Q ning plaadi teise, kolmandasse ja neljandasse süvendisse pipeteeriti positiivse kontrollina igal mõõtmisel 1 µL DNA-d, mille genotüübid (vastavalt A/A, A/G, G/G) olid varasemalt teada.

Ühe tulba jagu proovide genotüpiseerimiseks läks vaja 110 µL Milli-Q vett, 30 µL HOT FIREPol® Probe qPCR Mix Plus üldist PCR segu ja 2 µL spetsiifilist segu. Reaktsioonisegu segati vorteksil ning seejärel kanti võrdsed kogused segu automaatpipetiga kaheksasse väikesesse Eppendorfi PCR-toru tuubi. Vastavalt planeeritud tulpade arvule kanti mitmekanalilise pipetiga 9 µL reaktsioonisegu plaadi igasse süvendisse.

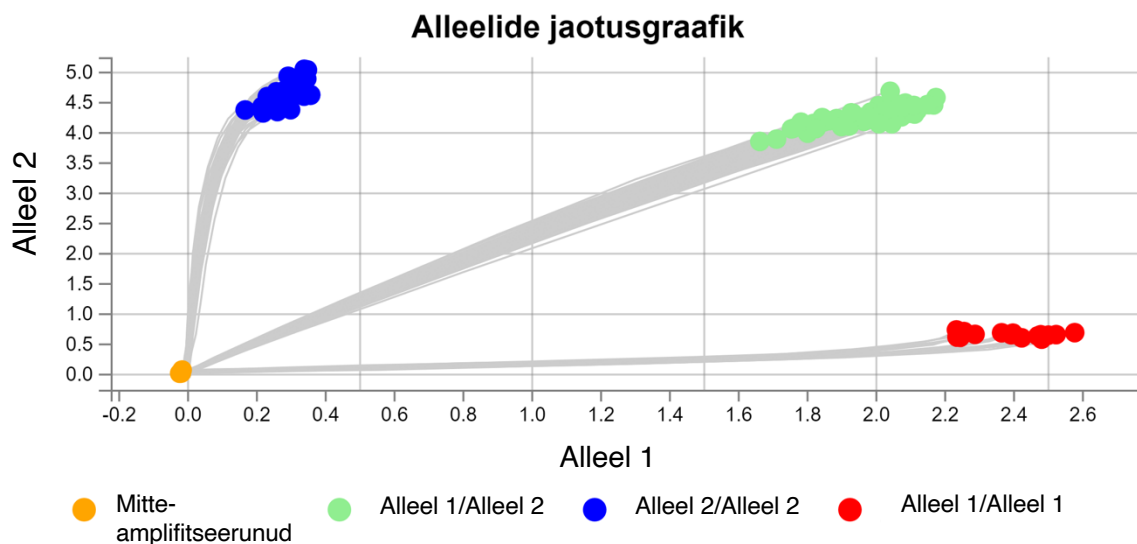
Pärast reaktsioonisegu lisamist igasse süvendisse, kaeti plaat kattekilega ning tsentrifuugiti 10 minutit 1200 x g juures. Seejärel asetati plaat RT-PCR masinasse, kus VIC signaali mõõtmine toimus esimeses ja FAM signaali mõõtmine teises kanalis. Esimese kanali läbilastav ergastuslainepikkus oli 470 ± 15 nm ja emissiooni lainepikkus 520 ± 15 nm. Teise kanali läbilastav ergastuslainepikkus oli 520 ± 10 nm ja emissiooni lainepikkus 558 ± 12 nm. Referentsfluorofoori ROX signaali mõõtmine toimus neljandas kanalis, mille läbilastav ergastuslainepikkus oli 580 ± 10 nm ja emissiooni lainepikkus 623 ± 14 nm. Filtri seadete alusel ei toimunud fluorestsentssignaalide kattumist, seega ei esinenud valguse läbikumamist ühest kanalist teise.

5.4. RT-PCR tulemuste analüüs

Katseseeria käigus saadud andmete korrektsust kontrolliti negatiivse ning positiivse kontrolli alusel. Proovid, mille genotüpiseerimine tulemust ei andnud, läbisid kordusmõõtmise. Pärast igat katseseeriat sooritati genotüpiseerimistulemuste analüüsiprogrammis tulemuste kvaliteedikontroll. Selle käigus jälgiti amplifikatsiooni graafiku alusel (lisa 5), kas kõikide proovide ampifikatsioonikurvid kasvasid eksponentsiaalselt ning ega Milli-Q vett sisaldavate proovide süvendites ei toimunud amplifikatsiooni. Samuti jälgiti fluorestsentssignaalide graafiku (lisa 5) alusel, kas referentsvärvi fluorestsentssignaal püsis muutumatuna kogu katse vältel ning ega ei esinenud äkilisi muutusi fluorofooride signaalides.

PCR tsükli 5–15 ajal mõõtis masin baastaseme signaali, sest siis ei olnud proovide signaalid müratasemega võrreldes eraldatavad. Vastavalt iga katse käigus mõõdetud baastasemele leiti programmi poolt hiljem fluorestsentssignaali lävend (lävend on näidatud amplifikatsiooni

graafiku joonisel lisas 5), mille ületamisel määras programm amplifikatsioonikurvi olemasolul genotüübi. Kõik signaalid, mis jäid alla lävendi, märgistati mitte-amplifitseerunuks ehk tulemust mitteandvateks. Fluorestsentslävendi põhjal leiti programmi poolt igale proovile ka Ct (ingl k *Cycle Threshold*) väärtus, mis iseloomustas tsüklite arvu, millest alates fluorestsentssignaal ületas taustamüra lävendi. Mida väiksem oli Ct väärtus, seda efektiivsemalt oli toimunud PCR reaktsioon. Tarkvaraprogrammi poolt tehtud amplifitseerumise analüüsi alusel leiti, kas signaal on genotüpiseerimistulemuse määramiseks piisav ning genotüüpide klastrite moodustamise põhjal leiti programmis lõplikud genotüpiseerimistulemused (joonis 9).



Joonis 9. Näide RT-PCR SNP rs279858 ühe katseseeria alleelide jaotusgraafikust ja moodustunud genotüüpide klastritest. X-teljel on normaliseeritud FAM fluorestsentssignaal ja y-teljel normaliseeritud VIC fluorestsentssignaal, millest on maha lahutatud ka eellugemiskäigus mõõdetud taustsignaalid. Alleel 1 tähistab A-alleeli ja alleel 2 tähistab G-alleeli. (joonis on kohandatud inglise keelest)

5.5. Andmetöötlus

Genotüpiseerimise tulemusena määrati uuritavatel vastavalt A/A ehk A-alleeli homosügootsus, A/G ehk heterosügootsus ja G/G ehk G-alleeli homosügootsus. Saadud tulemused vormistati Exceli failis, kus lisati igale inimesele vastav ID-kood leitud SNP-de genotüüpide ja uuritavate fenotüüpide skooridega. Katseandmete põhjal teostati ANOVA dispersioonanalüüs JASP 0.18.3 tarkvaraga. Dispersioonanalüüs mõõdab pideva tunnuse sõltuvust kategooriaalsest tunnusest. Genotüüp on kategooriaalne tunnus, millel on kindel hulk võimalikke väärtuseid, antud töö puhul kolm. Seisundiärevus, püsiärevus ning depressiivsus on pidevad tunnused, mida hinnati küsimustike skooridena, mis varieerusid teatud skaala piires. Käesoleva töö puhul

viidi läbi kolm analüüsi ehk hinnati seisundi- ja püsiärevuse ning depressiivsuse sõltuvust genotüübist. Dispersioonanalüüsil saadud tulemustest võeti arvesse F-statistiku väärtust (1), efekti suurust (η^2) (2), mille väärtused leiti kasutades ruutude summasid (ingl k *Sum of Squares*) (3), ning statistilist usaldusväärsust p-väärtuse abil. Tulemustevahelisi erinevusi peeti statistiliselt usaldusväärseks kui $p \leq 0,05$. Seose olemasolul viidi läbi *post hoc* analüüsid, et selgitada, mis genotüüpide vahel täpsemalt erinevus esines. *Post hoc* analüüsina kasutati Fisheri vähima olulise erinevuse (LSD) testi. Valimi normaaljaotust hinnati Shapiro-Wilk'i testi alusel ja dispersiooni homogeensust kontrollis JASP tarkvara automaatselt Brown-Forsythe testi alusel.

$$F = \frac{\text{Keskmine } SS(\text{gruppidevaheline})}{\text{Keskmine } SS(\text{gruppidesisene})} = \frac{\text{gruppidevaheline dispersioon}}{\text{gruppidesisene dispersioon}} \quad (1)$$

$$\eta^2 = \frac{SS(\text{gruppidevaheline})}{SS(\text{kogu})} \quad (2)$$

$$SS(\text{Sum of Squares}) = \sum_{i=0}^n (x_i - \bar{x})^2 \quad (3)$$

6. TULEMUSED JA ARUTELU

6.1. Leitud alleelisagedused

Valim koosnes 1416 lapsevanemast, kellel õnnestus rs279826 genotüüp määrata 1359 inimesel ($n(A/A) = 376$; $n(A/G) = 679$; $n(G/G) = 304$) ja rs279858 genotüüp 1363 inimesel ($n(A/A) = 459$; $n(A/G) = 657$; $n(G/G) = 247$). Valimi seisundi-, püsiärevuse ja depressiivsuse skoorid olid genotüüpidesiseselt normaaljaotusega ning homogeensete dispersioonidega. Andmeanalüüsist jäid välja inimesed, kellel puudus STAI või MÅDRS küsimustiku skoor või kelle genotüpiseerimine ei andnud tulemust.

Varasemast Geenivaramu uuringust on teada, et Eestis on rs279826 polümorfismi alleelisagedused vastavalt $A = 51\%$ ja $G = 49\%$ ja rs279858 omad $A = 56\%$ ja $G = 44\%$ [62]. Uuritud valimi põhjal olid leitud rs279826 alleelisagedused vastavalt $A = 53\%$ ja $G = 47\%$ ning rs279858 SNP-l $A = 58\%$ ja $G = 42\%$, mis on Hardy-Weinbergi tasakaalus ja võrreldavad varasemalt Eestis määratud alleelisagedustega.

6.2. rs279826 seos seisundi- ja püsiärevusega ning depressiivsusega

Kahefaktorilise ANOVA dispersioonanalüüsi tulemusena leiti *GABRA2* rs279826 genotüübi ja soo vaheline interaktsioon püsiärevuse korral ($F(2,1289) = 3,041$, $p = 0,048$) (tabel 1). *Post hoc* analüüsist nähtus, et statistiliselt erinesid *GABRA2* rs279826 tulemused naistel ja meestel A/A homosügootide vahel ($p < 0,001$), kus naiste püsiärevuse tase oli kõrgem võrreldes meestega. Kogu valimi ulatuses ei leitud ühefaktorilise ANOVA dispersioonanalüüsi tulemusena seoseid genotüübi ning püsiärevuse vahel (tabel 2). Kuna püsiärevuse tase oli meeste ja naiste vahel erinev (tabel 1), viidi läbi ka ühefaktorilised dispersioonanalüüsid naistel ja meestel eraldi (tabel 2). Dispersioonanalüüsi tulemusena leiti, et naistel oli *GABRA2* rs279826 genotüübil mõju püsiärevusele ($F(2,763) = 4,230$, $p = 0,015$). *Post hoc* analüüsist järeldus, et statistiliselt erinesid omavahel A/A ($M = 43,5 \pm 9,7$) ja A/G ($M = 41,3 \pm 8,3$) genotüübid ($p = 0,005$) ning A/A ja G/G ($M = 41,7 \pm 8,9$) genotüübid ($p = 0,041$). Seejuures A-alleeli homosügootide püsiärevuse tase oli naiste korral kõrgem, võrreldes G-alleeli kandjate püsiärevuse tasemega (Joonis 10).

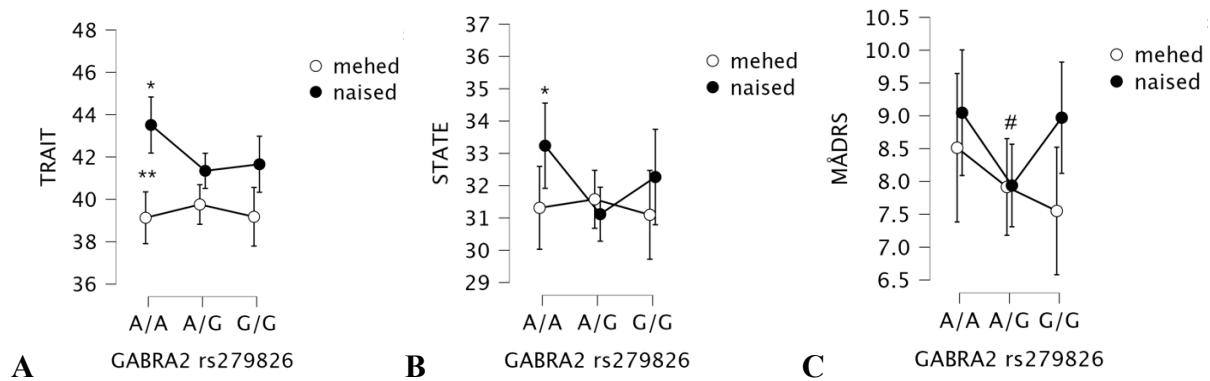
Tabel 1. *GABRA2* rs279826 püsiärevuse kahefaktorilise ANOVA genotüübi ja soo interaktsiooni tulemused, kus n tähistab vaatluste arvu, F sümbol F-statistiku väärtust, p-väärtus statistilist usaldusväärsust ja η^2 efekti suurust.

	n	F	p	η^2
<i>GABRA2</i> rs279826	1289	1,199	0,302	0,002
<i>sugu</i>	1289	32,449	<0,001	0,024
<i>GABRA2</i> rs279826 * <i>sugu</i>	1289	3,041	0,048	0,005

Seisundiärevuse uurimisel ei leitud ühefaktorilise ANOVA dispersioonanalüüsi tulemusena kogu valimi ulatuses seoseid genotüübi ning seisundiärevuse vahel (tabel 2). Samuti ei täheldatud kahefaktorilise ANOVA analüüsi läbiviimisel interaktsiooni soo ja genotüübi vahel (lisa 6). Siiski esines soo ja seisundiärevuse vahel piiripealse usaldusväärsusega ($F(1,1289) = 3,042$, $p = 0,081$) efekt (lisa 6), mis andis alust arvata, et meeste ja naiste seisundiärevuse tase on erinev ning seetõttu viidi läbi ühefaktorilised dispersioonanalüüsid meestel ja naistel eraldi (tabel 2). Dispersioonanalüüsi tulemusena leiti, et naistel oli *GABRA2* rs279826 genotüübil mõju seisundiärevusele ($F(2,765) = 3,808$, $p = 0,028$). *Post hoc* analüüsist järelendus, et statistiliselt erinesid omavahel A/A ($M = 33,2 \pm 9,6$) ja A/G ($M = 31,1 \pm 8,3$) genotüübid ($p = 0,007$). Seejuures A/A homosügootide seisundiärevuse tase oli naiste korral kõrgem võrreldes A/G heterosügootide tasemega (joonis 10).

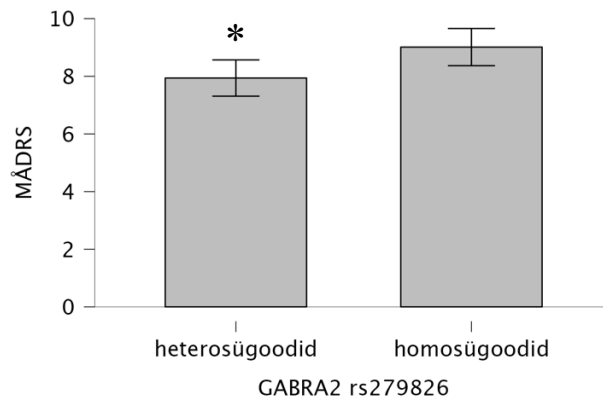
Tabel 2. *GABRA2* rs279826 ühefaktorilise ANOVA tulemused püsi- ja seisundiärevuse ning depressiivsuse korral, kus n tähistab vaatluste arvu, η^2 efekti suurust, p-väärtus statistilist usaldusväärsust ning F sümbol F-statistiku väärtust.

		n	F	p	η^2
<i>Kogu valim</i>	Seisundiärevus	1293	2,027	0,132	0,003
	Püsiärevus	1293	1,945	0,143	0,003
	Depressiivsus	1312	2,367	0,094	0,004
<i>Naised</i>	Seisundiärevus	765	3,808	0,028	0,010
	Püsiärevus	765	4,230	0,015	0,011
	Depressiivsus	780	2,749	0,065	0,007
<i>Mehed</i>	Seisundiärevus	524	0,184	0,832	0,001
	Püsiärevus	524	0,414	0,662	0,002
	Depressiivsus	529	0,887	0,412	0,003



Joonis 10. *GABRA2* rs279826 genotüüpide keskmised skoorid: A – püsiärevus; B – seisundiärevus; C – depressiivsus. Tähistused *,** ja # näitavad rühmade vahelisel võrdlusel saadud statistilist usaldusväärust $p < 0,05$. * tähistab naistel A/A genotüübi erinevust püsiärevuse korral teistest genotüüpidest ja seisundiärevuse korral A/G genotüübist, ** tähistab A/A genotüübi meeste erinevust naistest ning # tähistab heterosügootide ja homosügootide omavahelisel võrdlusel leitud heteroosiefekti naistel. Veavälbad tähistavad standardhälvet.

Depressiivsuse uurimisel ei leitud ühefaktorilise ANOVA dispersioonanalüüsi tulemusena seoseid genotüübi ning depressiivsuse vahel kogu valimi ulatuses (tabel 2) ning kahefaktorilise ANOVA dispersioonanalüüsist soo ja genotüübi vahelist interaktsiooni ei täheldatud (lisa 6). Samuti ei tuvastatud meeste ja naiste ühefaktoriliste dispersioonanalüüsitude tulemustest genotüübi mõju depressiivsusele (tabel 2). Naiste tulemustes esines piiripealse usaldusväärusega efekt ($p = 0,065$) (tabel 2), mis viitas sellele, et heterosügootide depressiivsuse tase oli madalam võrreldes homosügootidega (joonis 10), kuna A/G genotüübi MÅDRS keskmised skoorid erinesid A/A ja G/G homosügootide skooridest ühe skaalapunkti võrra (lisa 7). Seega viidi naistel läbi edasised ANOVA analüüsid homosügootide ja heterosügootide vahel, uurimaks heteroosiefekti olemasolu. Dispersioonanalüüsist selgus, et naiste depressiivsuse tulemustes esines heteroosiefekt ($F(1,781) = 5,491$, $p = 0,019$) ehk A/G heterosügootide depressiivsuse tase ($M = 7,9 \pm 6,4$) oli madalam võrreldes homosügootide tasemega ($M = 9,0 \pm 6,5$) (joonis 11).



Joonis 11. Naiste *GABRA2* rs279826 heterosügootide ja homosügootide depressiivsuse keskmised skoorid, kus * tähistab rühmadevahelisel võrdlusel saadud statistilist usalduväärsust $p < 0,05$. Veavälbad tähistavad standardhälvet.

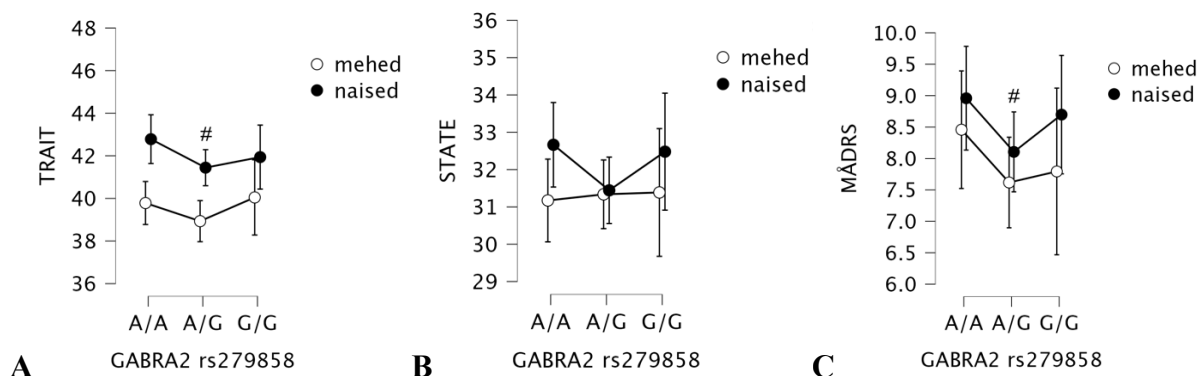
GABRA2 rs279826 naiste dispersioonanalüüsi käigus leiti, et A/A genotüübi püsiärevuse tase oli kõrgem võrreldes teiste genotüüpidega ja A/A genotüübi seisundiärevuse tase oli kõrgem võrreldes A/G genotüübiga. Antud tulemus kinnitab naistel hüpoteesi, et rs279826 A-alleel on seotud kõrgema püsiärevusega. Lisaks leiti naistel, et A/G genotüübi depressiivsuse tase oli kõrgem võrreldes homosügootide tasemega. Sellest järeldub, et depressiivsuse esinemine naistel on seotud *GABRA2* rs279826 genotüübiga. Püsiärevuse korral täheldati ka soo ja genotüübi interaktsiooni, mis annab alust arvata, et soolised erinevused mängivad rolli A/A genotüübil püsiärevuse esinemise määras.

6.3. rs279858 seos seisundi- ja püsiärevusega ning depressiivsusega

ANOVA dispersioonanalüüsi käigus ei leitud statistiliselt olulisi seoseid rs279858 genotüübi ja püsi-, seisundiärevuse ning depressiivsuse vahel (tabel 3). Analüüs viidi läbi nii kogu valimi ulatuses kui ka naistel ja meestel eraldi. Samuti ei täheldatud kahefaktorilise ANOVA analüüsi tulemusena soo ja genotüübi vahelisi interaktsioone (lisa 6). Dispersioonanalüüsi käigus leitud efektid kogu valimis olid püsiärevuse ja depressiivsuse korral piiripealsed ehk veidi suuremad kui konventsionaalselt usaldusväärseteks loetavad p-väärtused (tabel 3), aga ei viidanud siiski statistilisele usaldusväärsele ning seetõttu ei viidud läbi ka edasisi *post hoc* analüüse.

Tabel 3. *GABRA2* rs279858 ühefaktorilise ANOVA tulemused püsi-, ja seisundiärevuse ning depressiivsuse korral, kus n tähistab vaatluste arvu, η^2 efekti suurust, p-väärtus statistilist usalduväärsust ning F sümbol F-statistiku väärtust.

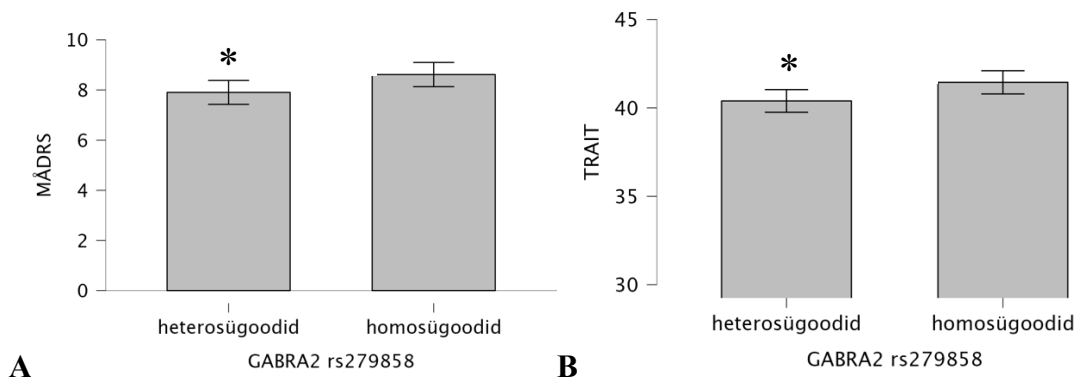
		n	F	p	η^2
Kogu valim	Seisundiärevus	1291	0,990	0,372	0,002
	Püsiärevus	1291	2,643	0,072	0,004
	Depressiivsus	1316	2,445	0,087	0,004
Naised	Seisundiärevus	766	1,581	0,206	0,004
	Püsiärevus	766	1,746	0,175	0,005
	Depressiivsus	783	1,475	0,229	0,004
Mehed	Seisundiärevus	522	0,033	0,967	<0,001
	Püsiärevus	522	1,030	0,358	0,004
	Depressiivsus	530	1,016	0,363	0,004



Joonis 12. *GABRA2* rs279858 genotüüpide keskmised skoorid: A – püsiärevus; B – seisundiärevuse; C – depressiivsus. # tähistab heterosügootide ja homosügootide omavahelisel võrdlusel leitud heteroosiefekti, mille korral statistiline usaldusväärsus oli $p < 0,05$. Veavälbad tähistavad standardhälvet.

Nii naiste kui meeste tulemustest on näha, et A/G heterosügootide püsiärevuse ja depressiivsuse tase oli võrreldes homosügootide A/A ja G/G tasemega väiksem (joonis 12). Sellest lähtuvalt kontrolliti dispersioonanalüüsi kaudu heteroosiefekti olemasolu. Ühefaktorilise ANOVA tulemustest selgus, et kogu valimis esines depressiivsuse ($F(1,1313) = 4,241$, $p = 0,04$) ja püsiärevuse ($F(1,1292) = 5,054$, $p = 0,025$) korral heteroosiefekt. A/G heterosügootide

püsiärevuse ($M = 40,4 \pm 8,2$) ja depressiivsuse ($M = 7,9 \pm 6,1$) tase oli madalam võrreldes homosügootidega ($M(\text{püsiärevus}) = 41,5 \pm 8,7$; $M(\text{depressiivsus}) = 8,6 \pm 6,4$) (joonis 13).



Joonis 13. *GABRA2* rs279858 heterosügootide ja homosügootide depressiivsuse (A) ja püsiärevuse (B) keskmised skoorid, kus * tähistab rühmadevahelisel võrdlusel saadud statistilist usalduväärsust $p < 0,05$. Veavälbad tähistavad standardhälvet.

6.4. Tulemuste diskussioon

Käesoleva töö eesmärk oli uurida *GABRA2* SNP-de rs279826 ja rs279858 genotüübi mõju seisundi- ja püsiärevusele ning depressiivsusele. Töö uudsus seisnes selles, et *GABRA2* geeni SNP-de rs279826 ja rs279858 seost ärevuse ja depressiivsuse tasemega on väga vähe uuritud. Lisaks viidi katsed läbi ELIKTU lapsevanemate valimil, mida ei ole varem nende SNP-de suhtes genotüpiseeritud ja mille eeliseks on hea esinduslikkus populatsiooni suhtes. Küll aga on rohkem uuritud nimetatud SNP-de seost agressiivsuse, impulsiivsuse, alkoholismi ja uimastiõltuvusega ning muude käitumuslike eripäradega, mis olid ka käesoleva töö idee aluseks [50,54,56]. Varasemad uuringud on aga leidnud just palju seoseid rs279826 ja rs279858 G-alleeli ning mainitud psüühika kõrvalekallete vahel. Antud töö leidis seejuures vastupidise efekti ehk seose A-alleeliga. Siinkohal võib arutleda, et ärevus ja agressiivsus on omavahel vastanduvad psühholoogilised reaktsioonid. Mida suurem ärevus, seda vähem esineb äkilist agressiivsust. Seejuures võib ärevuse esinemine olla kaitsemehhanism, mis hoiab ära inimese ülereageerimise teatud emotsiooni ajendil. Seega esineb teatav loogika selles, et G-alleeliga on seotud suurem agressiivsus ning A-alleeliga kõrgem ärevus. Nii ebakohane käitumine kui ka alkoholism võivad tuleneda kas ärevuse puudumisest või just suuremast ärevuse foonist. Ühel juhul on alkohol inimesele rahusti eest, teisalt aga, kui puudub ärevus ehk teatav kartlikkus, ei ole inimesel piisavat ettevaatlikkust, et alkoholi mõistlikult tarbida.

Antud töös leiti rs279826 SNP puhul soo ja genotüübi interaktsioon püsiärevuse korral, mille järgi A/A genotüübiga naiste püsiärevuse tase oli kõrgem võrreldes sama genotüübiga meeste

püsiärevuse tasemega. Saadud genotüüpide ja soo vaheline interaktsioon annab alust arvata, et sooline erinevus avaldab mõju püsiärevuse väljendumise tasemele rs279826 genotüübi puhul. Seetõttu peaks edaspidi uurima, millised tegurid lisaks genotübile mõjutavad naiste puhul ärevuse esinemise määra. On tõendeid selle kohta, et *GABRA2* haplotüüpide geneetiline efekt psüühikahäirete puhul esineb ainult naistel. Villafuerte *et al.* leidsid 2011. aastal välja antud teadusartikli raames, et ainult naistel esinesid rs279826 ja rs279858 haplotüübi G/G homosügootidel tugevamad impulsiivsuse ja alkoholisõltuvuse sümptomid. Uuringus leiti, et *GABRA2* geneetiline variatsioon on seotud impulsiivsusega läbi suurenenud insula pidurdusaktiivsuse. Insula aktiivsust on ühtlasi seostatud ka negatiivsete emotsionaalsete seisunditega nagu ärevus ja uimastite kontrollimatu ihaldamine. [59] Samuti on Enoch *et al.* leidnud, et *GABRA2* haplotüübi ja eluaegsete ärevushäirete vaheline seos esines ainult naistel [78]. Varasemate uuringute tulemused on vastavuses käesoleva töö tulemustega, mille kohaselt rs279826 A/A genotüübi mõju esineb ainult naistel püsi- ja seisundiärevuse korral.

ANOVA dispersioonanalüüsi tulemusena leiti, et *GABRA2* rs279826 polümorfismi A/A genotüüp on seotud naiste puhul kõrgema püsiärevuse ja seisundiärevusega. Saadud tulemus kinnitab töös esitatud hüpoteesi, et naistel on rs279826 A-alleel seotud kõrgema püsiärevusega. Eelnevatest uuringutest on teada, et antud SNP ei ole kodeeriv, kuid on seotud muutustega RNA ekspressioonitasemes. Kuna meestel seost ei leitud, siis võib arvata, et tegemist on sooliste eripäradega GABA retseptorite avaldumises või hormonaalsete erinevustega, mis mõjutavad geenide või retseptorite ekspressiooni. Kirjanduses on tõendeid selle kohta, et suguhormoonid mõjutavad GABA retseptorite toimimist ja aktiivsust. Mukherjee *et al.* on leidnud, et östradiol vähendab inhibeerivate sünapside stabiilsust läbi funktsionaalsete GABA-A retseptorite arvu. Östradiol mõjutab GABA-A retseptoritega seostunud karkassvalku gefüriini, mis stabiliseerib GABA-A retseptorite komplekse [79]. Samuti on leitud, et menstruaaltsükliga oluliselt seotud oleva hormooni progesterooni taseme kõikumine mõjutab depressiooni ja ärevuse esinemist. Gulinello *et al.* leidsid, et pikaajaline kokkupuude progesterooniga põhjustas emastel rottidel tugevamat ärevuselaadset käitumist võrreldes isaste rottidega. [80] Seetõttu võib arvata, et hormoonid on seotud erinevustega meeleoluhäirete esinemise määras naistel ja meestel ning muutustega GABA süsteemi modulatsioonis, mõjutades GABA retseptorite ekspressiooni ja/või funktsiooni.

Käesolevas töös esines naistel rs279826 korral depressiivsuse tulemustes ja rs279858 kogu valimi depressiivsuse ja püsiärevuse tulemustes heteroosiefekt ehk madalaim skoor A/G heterosügootide puhul. Heteroosiefekt on üsna tavapärane nähtus, mis iseloomustab

heterosügootide paremat bioloogilist funktsiooni ja elujõulisust geneetilise segunemise tagajärjel. On tõendeid, et heteroosiefekt võib olla soospetsiifiline. [81] See on vastavuses antud töö tulemustega, mille kohaselt heteroosiefekt esines rs279826 puhul kõikide fenotüüpide osas ainult naistel. rs279858 korral esines efekt aga kogu valimis, mis annab alust arvata, et erinevalt eespool kajastatud rs279826 mõjust naistele, on rs279858 mõju nii naistele kui meestele ühesugune.

Edaspidi tuleks uurida, kuidas variatiivsus rs279826 genotüübis mõjutab GABRA2 sisaldavate närvirakkude toimimist ning mis täpsemalt põhjustab ärevuse esinemist rs279826 A/A genotüübi puhul. Varasemalt on loomkatsega leitud, et hiirtel esinev ärevus on seotud *GABRA2* geeni vähenenud ekspressiooniga aju otsmikukoos ja oimusagarates ning seega ka α_2 alaühikut sisaldavate GABA-A retseptorite vähenenud aktiivsusega ajus [82]. On teada, et GABA-A retseptorid on ühed olulisemad anesteetikumide seondumiskohad anesteetilise mõju vahendamisel. Anesteetikumide rahustav ja uinutav toime tuleneb üldjuhul asjaolust, et need tugevdavad inhibeerivaid signaale ajus. [32] Ma *et al.* leidsid 2022. a läbiviidud teadustöö raames, et anesteetikumina kasutatava etomidaadi intravenoosel manustamisel esines *GABRA2* rs279858 G-alleeli kandjatel suurem tundlikkus anesteesiale võrreldes A-alleeli homosügootidega [83]. Saadud tulemus viitab sellele, et α_2 alaühik on seotud anesteetilise toimega ning *GABRA2* SNP-de G-alleeli kandjatel on suurem α_2 alaühiku moduleeritud pidurdusaktiivsus ajus. Seega saab arutleda, et A-alleeli kandjatel on seevastu vähenenud *GABRA2* pidurdusaktiivsus ajus, mis põhjendab ka suurenenud ärevust A-alleeli korral. Sellest järelduvalt tuleks edaspidi uurida A-alleeli homosügootide *GABRA2* geeni ekspressiooni, mRNA tasemeid rakus ning *GABRA2* retseptorite aktiivsust ajus. Lisaks peaks järgnevalt uurima, kas ELIKTU lastel on samasugused seosed genotüübi ning ärevuse ja depressiivsuse vahel ning kas esineb interaktsioone uuritud SNP-de ja keskkonna vahel.

Kuna rs279826 ja rs279858 genotüübi seost ärevuse ja depressiivsusega on vähe uuritud, siis leitud tulemuste kinnitamiseks on vaja läbi viia veel katseid teiste valimitega, et olla kindel saadud tulemuste üldkehtivuses.

7. KOKKUVÕTE

Bakalaureusetöö raames uuriti GABA-A retseptori α_2 alaühiku geenis esinevate SNP-de rs279826 ja rs279858 seost ärevuse ja depressiivsusega ELIKTU lapsevanemate valimil. SNP-de genotüpiseerimiseks kasutati RT-PCR meetodit, mille käigus toimus uuritava DNA lõigu paljundamine ja SNP-le vastava signaali detekteerimine.

Töö teoreetilises osas anti ülevaade GABA ja GABA-A retseptorite funktsioonist, tähtsusest emotsioonide regulatsioonis, seosest meeleoluhäireid põhjustavate muutustega närviülekanes ning GABA-A retseptorite olulisusest ärevusevastaste ravimite toimemehhanismis. Samuti selgitati *GABRA2* geeni seost ärevuse ja depressiivsusega ning varasemaid teadustöid, mis kajastavad uuritud polümorfisme.

Eksperimentaalses osas viidi läbi katsed ELIKTU lapsevanemate DNA proovidega RT-PCR meetodil. Iga proovi jaoks valmistati reaktsioonisegu, mis sisaldas erinevate fluorestsentsmärgistega *TaqMan*TM sonde, mis seonduvad uuritavatele SNP-dele. Geenid esinevad nukleotiid, kas adeniin (A) või guaniin (G), tuvastati fluorestsentssignaali alusel.

GABRA2 geeni polümorfismide katsete tulemusena määrati edukalt genotüübid ning valimis leitud alleelisagedused olid vastavuses varasemalt Eestis mõõdetutega. Saadud tulemused illustreerisid kasutatud meetodi sobivust genotüpiseerimisanalüüsiks, mistõttu võib sellist lähenemist kasutada ka edaspidi. Antud töö tulemuste põhjal saab järeldada, et rs279826 ja rs279858 genotüüp mõjutab depressiivsuse ja ärevuse esinemise määra. Dispersioonanalüüsi tulemusena leiti, et rs279826 polümorfismil on mõju seisundiärevuse ja püsiarevuse tasemele naistel, mille järgi A/A genotüüp on seotud kõrgema tasemega. Lisaks leiti, et rs279826 naiste depressiivsuse tulemustes ning rs279858 püsiarevuse ja depressiivsuse tulemustes esines heteroosiefekt ehk heterosügootide madalam tase võrreldes homosügootidega.

Edaspidi tuleks uurida, kuidas rs279826 A-alleel mõjutab *GABRA2* retseptori toimimist ning sellega seotud närviülekanet naistel. Samuti peaks analüüsima, kas ELIKTU laste andmed kinnitavad antud töö tulemusi. GABA ja selle retseptorite ning nende geenide uurimise käigus saadavad teadmised on tulevikus potentsiaalne panus neuropsühhofarmakoloogiliste ravimite tööstuses ning psühhiaatriliste häirete ennetamises.

Antud bakalaureusetöö on osa Eesti Teadusagentuuri poolt rahastatavast projektist PRG1213.

8. SUMMARY

The aim of this work was to study the effect of GABA-A receptor subunit α_2 gene SNPs rs279826 and rs279858 on anxiety and depressiveness in a sample of parents from the ECPBHS study. The RT-PCR method was used for genotyping the SNPs which involved the amplification of the target DNA segment and detection of the signal corresponding to the SNP.

In the theoretical part of the thesis, an overview was provided on the function of GABA and GABA-A receptors, their importance in emotion regulation, their association with mood disorder-related changes in neurotransmission and importance of GABA-A receptors in mediating the effect of anxiolytic drugs. The relation between the *GABRA2* gene and anxiety and depressiveness was explained, along with previous studies that examined the polymorphisms under investigation.

In the experimental part, tests were conducted on the DNA of parents from the ECPBHS study using the RT-PCR method. For each sample, a reaction mixture was prepared containing *TaqMan*[™] probes labeled with different fluorescent markers that bound to the SNP's being studied. The nucleotide present in the gene, either adenine (A) or guanine (G), was identified based on the fluorescence signal.

The experiment to analyse polymorphisms in the *GABRA2* gene was successful, genotypes were accurately determined, and the allele frequencies found in the sample were consistent with those previously measured in Estonia. Based on the results of this study, it can be concluded that the genotype of rs279826 and rs279858 is related to the level of anxiety and depressiveness. The results of analysis of variance showed that rs279826 A/A genotype is associated with higher levels of state and trait anxiety. Additionally, a heterosis effect was observed in the depressiveness scores for women regarding rs279826 and in the trait anxiety and depressiveness scores for rs279858. Heterosis effect is a lower score in heterozygotes compared to homozygotes.

Future research should examine how the A -allele of rs279826 influences the functioning of the GABRA2 receptor and related neurotransmission in women. It should also be analyzed whether the data from the ECPBHS children study confirm the results of this work. Knowledge gained from studying GABA and its receptors and their genes could potentially contribute to the neuropsychopharmacological drug industry and the prevention of psychiatric disorders.

This bachelor's thesis is part of the project PRG1213, funded by the Estonian Research Council.

9. KASUTATUD KIRJANDUS

1. Uuring: levinuimad vaimse tervise probleemid on depressioon ja ärevushäired | Sotsiaalministeerium. <https://www.sm.ee/uudised/uuring-levinuimad-vaimse-tervise-probleemid-depressioon-ja-arevushaired> (viimati uuendatud 27.11.2023).
2. COVID-19 pandemic triggers 25% increase in prevalence of anxiety and depression worldwide. <https://www.who.int/news/item/02-03-2022-covid-19-pandemic-triggers-25-increase-in-prevalence-of-anxiety-and-depression-worldwide> (viimati uuendatud 27.11.2023).
3. A.V. Horwitz, How an Age of Anxiety Became an Age of Depression, *Milbank Q.* 88 (2010) 112–138. <https://doi.org/10.1111/j.1468-0009.2010.00591.x>.
4. D.H. Barlow, B.F. Chorpita, J. Turovsky, Fear, panic, anxiety, and disorders of emotion, *Neb. Symp. Motiv.* 43 (1996) 251–328.
5. B.E. Hutchins, S.G. Young, State Anxiety, in: V. Zeigler-Hill, T.K. Shackelford (Eds.), *Encycl. Personal. Individ. Differ.*, Springer International Publishing, Cham, 2018: pp. 1–3. https://doi.org/10.1007/978-3-319-28099-8_1919-1.
6. F. Saviola, E. Pappaianni, A. Monti, A. Grecucci, J. Jovicich, N. De Pisapia, Trait and state anxiety are mapped differently in the human brain, *Sci. Rep.* 10 (2020) 11112. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68008-z>.
7. J.W. Kanter, A.M. Busch, C.E. Weeks, S.J. Landes, The Nature of Clinical Depression: Symptoms, Syndromes, and Behavior Analysis, *Behav. Anal.* 31 (2008) 1–21.
8. K.S. Young, C.F. Sandman, M.G. Craske, Positive and Negative Emotion Regulation in Adolescence: Links to Anxiety and Depression, *Brain Sci.* 9 (2019) 76. <https://doi.org/10.3390/brainsci9040076>.
9. J. Kaufman, D. Charney, Comorbidity of mood and anxiety disorders, *Depress. Anxiety.* 12 Suppl 1 (2000) 69–76. [https://doi.org/10.1002/1520-6394\(2000\)12:1+<69::AID-DA9>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/1520-6394(2000)12:1+<69::AID-DA9>3.0.CO;2-K).
10. H. Lindholm, I. Morrison, A. Krettek, D. Malm, G. Novembre, L. Handlin, Genetic risk-factors for anxiety in healthy individuals: polymorphisms in genes important for the HPA axis, *BMC Med. Genet.* 21 (2020) 184. <https://doi.org/10.1186/s12881-020-01123-w>.
11. M. Shadrina, E.A. Bondarenko, P.A. Slominsky, Genetics Factors in Major Depression Disease, *Front. Psychiatry.* 9 (2018) 334. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2018.00334>.
12. S.F. Lacerda-Pinheiro, R.F.F. Pinheiro Junior, M.A.P. de Lima, C.G.L. da Silva, M. do S.V. dos Santos, A.G. Teixeira Júnior, P.N.L. de Oliveira, K.D.B. Ribeiro, M.L. Rolim-Neto,

- B.A.V. Bianco, Are there depression and anxiety genetic markers and mutations? A systematic review, *J. Affect. Disord.* 168 (2014) 387–398. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2014.07.016>.
13. F. Robert, J. Pelletier, Exploring the Impact of Single-Nucleotide Polymorphisms on Translation, *Front. Genet.* 9 (2018). <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2018.00507> (viimati uuendatud 21.04.2022).
 14. Polymorphism. <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Polymorphism> (viimati uuendatud 28.11.2023).
 15. N. Orr, S. Chanock, Common genetic variation and human disease, *Adv. Genet.* 62 (2008) 1–32. [https://doi.org/10.1016/S0065-2660\(08\)00601-9](https://doi.org/10.1016/S0065-2660(08)00601-9).
 16. Gamma-Aminobutyric Acid | C₄H₉NO₂ | CID 119 - PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/119> (viimati uuendatud 21.10.2023).
 17. T. Goetz, A. Arslan, W. Wisden, P. Wulff, GABAA receptors, *Prog. Brain Res.* 160 (2007) 21–41. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(06\)60003-4](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(06)60003-4).
 18. N.L. Beebe, J.G. Mellott, B.R. Schofield, Inhibitory Projections from the Inferior Colliculus to the Medial Geniculate body Originate from Four Subtypes of GABAergic Cells, *eNeuro.* 5 (2018) ENEURO.0406-18.2018. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0406-18.2018>.
 19. B.E. Jewett, S. Sharma, Physiology, GABA, in: *StatPearls*, StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2023. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513311/> (viimati uuendatud 11.11.2023).
 20. A. Sarawagi, N.D. Soni, A.B. Patel, Glutamate and GABA Homeostasis and Neurometabolism in Major Depressive Disorder, *Front. Psychiatry.* 12 (2021). <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpsy.2021.637863> (viimati uuendatud 21.10.2023).
 21. G. Sanacora, G.F. Mason, D.L. Rothman, J.H. Krystal, Increased occipital cortex GABA concentrations in depressed patients after therapy with selective serotonin reuptake inhibitors, *Am. J. Psychiatry.* 159 (2002) 663–665. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.159.4.663>.
 22. G. Sanacora, R. Gueorguieva, C.N. Epperson, Y.-T. Wu, M. Appel, D.L. Rothman, J.H. Krystal, G.F. Mason, Subtype-specific alterations of gamma-aminobutyric acid and glutamate in patients with major depression, *Arch. Gen. Psychiatry.* 61 (2004) 705–713. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.61.7.705>.

23. P. Nuss, Anxiety disorders and GABA neurotransmission: a disturbance of modulation, *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 11 (2015) 165–175. <https://doi.org/10.2147/NDT.S58841>.
24. J.C. de Jonge, C.H. Vinkers, H.E. Hulshoff Pol, A. Marsman, GABAergic Mechanisms in Schizophrenia: Linking Postmortem and In Vivo Studies, *Front. Psychiatry.* 8 (2017) 118. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2017.00118>.
25. E. Boonstra, R. de Kleijn, L.S. Colzato, A. Alkemade, B.U. Forstmann, S. Nieuwenhuis, Neurotransmitters as food supplements: the effects of GABA on brain and behavior, *Front. Psychol.* 6 (2015) 1520. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2015.01520>.
26. K. Kuriyama, P.Y. Sze, Blood-brain barrier to H³- γ -aminobutyric acid in normal and amino oxyacetic acid-treated animals, *Neuropharmacology.* 10 (1971) 103–108. [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(71\)90013-X](https://doi.org/10.1016/0028-3908(71)90013-X).
27. N.G. Bowery, D.R. Hill, A.L. Hudson, Characteristics of GABAB receptor binding sites on rat whole brain synaptic membranes., *Br. J. Pharmacol.* 78 (1983) 191–206.
28. I. Lapin, Phenibut (β -Phenyl-GABA): A Tranquilizer and Nootropic Drug, *CNS Drug Rev.* 7 (2001) 471–481. <https://doi.org/10.1111/j.1527-3458.2001.tb00211.x>.
29. E. Sallard, D. Letourneur, P. Legendre, Electrophysiology of ionotropic GABA receptors, *Cell. Mol. Life Sci.* 78 (2021) 5341–5370. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03846-2>.
30. U. Rudolph, F. Crestani, H. Möhler, GABA(A) receptor subtypes: dissecting their pharmacological functions, *Trends Pharmacol. Sci.* 22 (2001) 188–194. [https://doi.org/10.1016/s0165-6147\(00\)01646-1](https://doi.org/10.1016/s0165-6147(00)01646-1).
31. A. Ghit, D. Assal, A.S. Al-Shami, D.E.E. Hussein, GABAA receptors: structure, function, pharmacology, and related disorders, *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 19 (2021) 123. <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00224-0>.
32. R.W. Olsen, Chapter Seven - Allosteric Ligands and Their Binding Sites Define γ -Aminobutyric Acid (GABA) Type A Receptor Subtypes, in: U. Rudolph (Ed.), *Adv. Pharmacol., Academic Press,* 2015: pp. 167–202. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2014.11.005>.
33. E. Sigel, B.P. Lüscher, A closer look at the high affinity benzodiazepine binding site on GABAA receptors, *Curr. Top. Med. Chem.* 11 (2011) 241–246. <https://doi.org/10.2174/156802611794863562>.
34. U. Rudolph, H. Möhler, GABA-based therapeutic approaches: GABAA receptor subtype functions, *Curr. Opin. Pharmacol.* 6 (2006) 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2005.10.003>.
35. J.G. Whitwam, Flumazenil: a benzodiazepine antagonist., *BMJ.* 297 (1988) 999–1000.

36. M. Davies, The role of GABAA receptors in mediating the effects of alcohol in the central nervous system, *J. Psychiatry Neurosci.* 28 (2003) 263–274.
37. W. Sieghart, GABAA receptors: ligand-gated Cl⁻ ion channels modulated by multiple drug-binding sites, *Trends Pharmacol. Sci.* 13 (1992) 446–450. [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(92\)90142-s](https://doi.org/10.1016/0165-6147(92)90142-s).
38. GABA_A receptor, Wikipedia. (2024). https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=GABAA_receptor&oldid=1216024951 (viimati uuendatud 28.05.2024).
39. R.C. Drugan, A.L. Morrow, R. Weizman, A. Weizman, S.I. Deutsch, J.N. Crawley, S.M. Paul, Stress-induced behavioral depression in the rat is associated with a decrease in GABA receptor-mediated chloride ion flux and brain benzodiazepine receptor occupancy, *Brain Res.* 487 (1989) pp. 45–51. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(89\)90938-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(89)90938-4).
40. J.C. Earnheart, C. Schweizer, F. Crestani, T. Iwasato, S. Itohara, H. Mohler, B. Lüscher, GABAergic control of adult hippocampal neurogenesis in relation to behavior indicative of trait anxiety and depression states, *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27 (2007) 3845–3854. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3609-06.2007>.
41. I. Vollenweider, K.S. Smith, R. Keist, U. Rudolph, Antidepressant-like properties of α 2-containing GABAA receptors, *Behav. Brain Res.* 217 (2011) 77–80. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.10.009>.
42. J.R. Atack, K.A. Wafford, S.J. Tye, S.M. Cook, B. Sohal, A. Pike, C. Sur, D. Melillo, L. Bristow, F. Bromidge, I. Ragan, J. Kerby, L. Street, R. Carling, J.L. Castro, P. Whiting, G.R. Dawson, R.M. McKernan, TPA023 [7-(1,1-dimethylethyl)-6-(2-ethyl-2H-1,2,4-triazol-3-ylmethoxy)-3-(2-fluorophenyl)-1,2,4-triazolo[4,3-b]pyridazine], an agonist selective for α 2- and α 3-containing GABAA receptors, is a nonsedating anxiolytic in rodents and primates, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 316 (2006) pp. 410–422. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.089920>.
43. Gabra2 - Gamma-aminobutyric acid receptor subunit alpha-2 - *Rattus norvegicus* (Rat) | UniProtKB | UniProt. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P23576/entry> (viimati uuendatud 11.11.2023).
44. H. Möhler, J.M. Fritschy, U. Rudolph, A new benzodiazepine pharmacology, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 300 (2002) 2–8. <https://doi.org/10.1124/jpet.300.1.2>.
45. C. Stephani, Limbic System, in: M.J. Aminoff, R.B. Daroff (Eds.), *Enycl. Neurol. Sci.* Second Ed., Academic Press, Oxford, 2014: pp. 897–900. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385157-4.01157-X>.

46. H.V. Morris, G.R. Dawson, D.S. Reynolds, J.R. Atack, T.W. Rosahl, D.N. Stephens, Alpha2-containing GABAA receptors are involved in mediating stimulant effects of cocaine, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 90 (2008) 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2008.02.010>.
47. V. Gonzalez-Nunez, Role of gabra2, GABAA receptor alpha-2 subunit, in CNS development, *Biochem. Biophys. Rep.* 3 (2015) 190–201. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2015.08.003>.
48. Y. Nakamura, D.H. Morrow, A.J. Nathanson, J.M. Henley, K.A. Wilkinson, S.J. Moss, Phosphorylation on Ser-359 of the $\alpha 2$ subunit in GABA type A receptors down-regulates their density at inhibitory synapses, *J. Biol. Chem.* 295 (2020) 12330–12342. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.014303>.
49. H.J. Edenberg, D.M. Dick, X. Xuei, H. Tian, L. Almasy, L.O. Bauer, R.R. Crowe, A. Goate, V. Hesselbrock, K. Jones, J. Kwon, T.-K. Li, J.I. Nurnberger, S.J. O'Connor, T. Reich, J. Rice, M.A. Schuckit, B. Porjesz, T. Foroud, H. Begleiter, Variations in GABRA2, Encoding the $\alpha 2$ Subunit of the GABAA Receptor, Are Associated with Alcohol Dependence and with Brain Oscillations, *Am. J. Hum. Genet.* 74 (2004) 705–714. <https://doi.org/10.1086/383283>.
50. D.S. Strac, G.N. Erjavec, M.N. Perkovic, K.N. Sziglin, F. Borovecki, N. Pivac, Association of GABAA receptor $\alpha 2$ subunit gene (GABRA2) with alcohol dependence-related aggressive behavior, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 63 (2015) 119–125. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.06.010>.
51. Z. Jin, A.K. Bhandage, I. Bazov, O. Kononenko, G. Bakalkin, E.R. Korpi, B. Birnir, Expression of specific ionotropic glutamate and GABA-A receptor subunits is decreased in central amygdala of alcoholics, *Front. Cell. Neurosci.* 8 (2014). <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00288>.
52. D.M. Dick, A. Agrawal, M.A. Schuckit, L. Bierut, A. Hinrichs, L. Fox, J. Mullaney, C.R. Cloninger, V. Hesselbrock, J.I. Nurnberger, L. Almasy, T. Foroud, B. Porjesz, H. Edenberg, H. Begleiter, Marital status, alcohol dependence, and GABRA2: evidence for gene-environment correlation and interaction, *J. Stud. Alcohol.* 67 (2006) 185–194. <https://doi.org/10.15288/jsa.2006.67.185>.
53. M.-A. Enoch, C.A. Hodgkinson, Q. Yuan, P.-H. Shen, D. Goldman, A. Roy, The influence of GABRA2, childhood trauma, and their interaction on alcohol, heroin, and cocaine dependence, *Biol. Psychiatry.* 67 (2010) 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.08.019>.

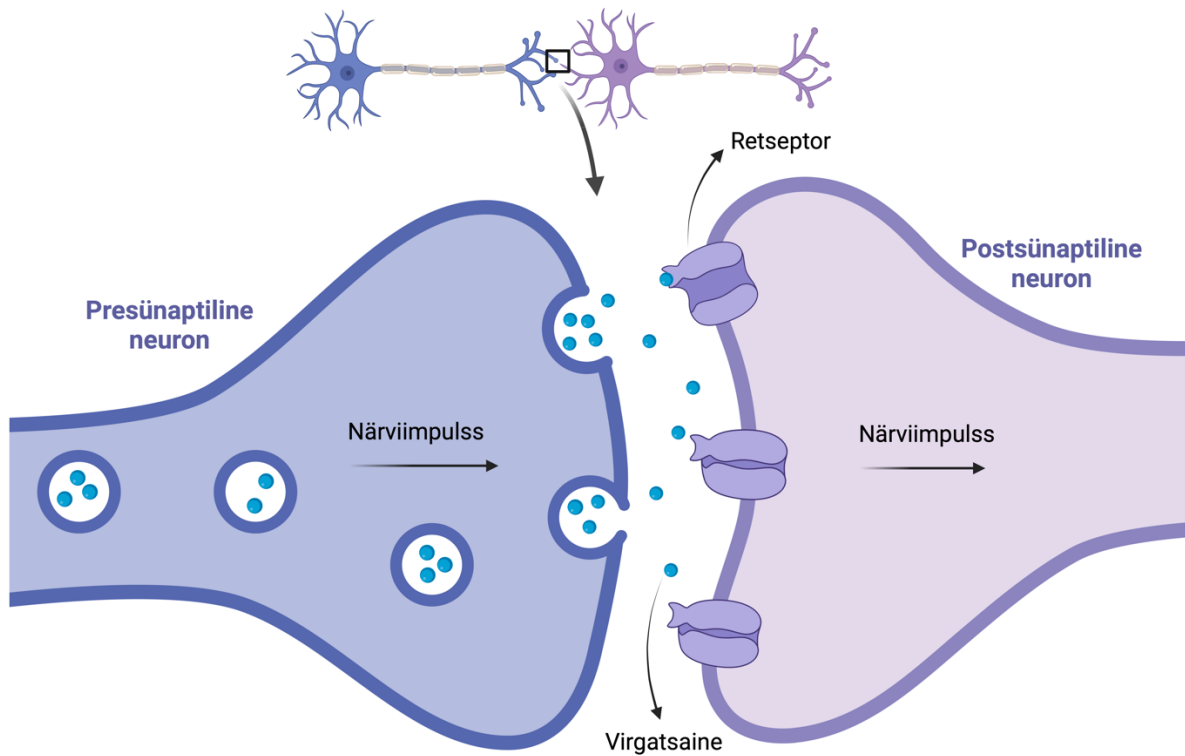
54. Y. Sun, Y. Zhang, D. Zhang, S. Chang, R. Jing, W. Yue, L. Lu, D. Chen, Y. Sun, Y. Fan, J. Shi, GABRA2 rs279858-linked variants are associated with disrupted structural connectome of reward circuits in heroin abusers, *Transl. Psychiatry*. 8 (2018) 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41398-018-0180-0>.
55. A. Agrawal, H.J. Edenberg, T. Foroud, L.J. Bierut, G. Dunne, A.L. Hinrichs, J.I. Nurnberger, R. Crowe, S. Kuperman, M.A. Schuckit, H. Begleiter, B. Porjesz, D.M. Dick, Association of GABRA2 with drug dependence in the collaborative study of the genetics of alcoholism sample, *Behav. Genet.* 36 (2006) 640–650. <https://doi.org/10.1007/s10519-006-9069-4>.
56. E. Kiive, K. Laas, M. Vaht, T. Veidebaum, J. Harro, Stressful life events increase aggression and alcohol use in young carriers of the GABRA2 rs279826/rs279858 A-allele, *Eur. Neuropsychopharmacol.* 27 (2017) 816–827. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2017.02.003>.
57. A.R. Braun, A.J. Heinz, J.C. Veilleux, M. Conrad, S. Weber, M. Wardle, J. Greenstein, D. Evatt, D. Drobos, J.D. Kassel, The separate and combined effects of alcohol and nicotine on anticipatory anxiety: A multidimensional analysis, *Addict. Behav.* 37 (2012) 485–491. <https://doi.org/10.1016/j.addbeh.2011.12.013>.
58. I.D. Waldman, H.E. Poore, J.M. Luningham, J. Yang, Testing structural models of psychopathology at the genomic level, *World Psychiatry.* 19 (2020) 350–359. <https://doi.org/10.1002/wps.20772>.
59. S. Villafuerte, M.M. Heitzeg, S. Foley, W.-Y.W. Yau, K. Majczenko, J.-K. Zubieta, R.A. Zucker, M. Burmeister, Impulsiveness and insula activation during reward anticipation are associated with genetic variants in GABRA2 in a family sample enriched for alcoholism, *Mol. Psychiatry.* 17 (2012) 511–519. <https://doi.org/10.1038/mp.2011.33>.
60. D. Rearick, A. Prakash, A. McSweeney, S.S. Shepard, L. Fedorova, A. Fedorov, Critical association of ncRNA with introns, *Nucleic Acids Res.* 39 (2011) 2357–2366. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1080>.
61. R. Lieberman, H.R. Kranzler, P. Joshi, D.-G. Shin, J. Covault, GABRA2 alcohol dependence risk allele is associated with reduced expression of chromosome 4p12 GABAA subunit genes in human neural cultures, *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 39 (2015) 1654–1664. <https://doi.org/10.1111/acer.12807>.
62. T. Tasa, K. Krebs, M. Kals, R. Mägi, V.M. Lauschke, T. Haller, T. Puurand, M. Remm, T. Esko, A. Metspalu, J. Vilo, L. Milani, Genetic variation in the Estonian population:

- pharmacogenomics study of adverse drug effects using electronic health records, *Eur. J. Hum. Genet. EJHG*. 27 (2019) 442–454. <https://doi.org/10.1038/s41431-018-0300-6>.
63. rs279858 RefSNP Report - dbSNP - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs279858> (viimati uuendatud 19.12.2023).
 64. rs279826 RefSNP Report - dbSNP - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs279826> (viimati uuendatud 19.12.2023).
 65. Lapsest täiskasvanuks, Eestis. ELIKTU 1998–2015 | Tervise Arengu Instituut. <https://tai.ee/et/valjaanded/lapsest-taiskasvanuks-eestis-eliktu-1998-2015> (viimati uuendatud 24.05.2024).
 66. C.D. Spielberger, Manual for the State-Trait Anxiety Inventory (Self-evaluation Questionnaire), No Title. (1970). <https://cir.nii.ac.jp/crid/1370285712575158016> (viimati uuendatud 28.05.2024).
 67. S.A. Montgomery, M. Asberg, A new depression scale designed to be sensitive to change, *Br. J. Psychiatry J. Ment. Sci.* 134 (1979) 382–389. <https://doi.org/10.1192/bjp.134.4.382>.
 68. PCR Setup—Six Critical Components to Consider | Thermo Fisher Scientific - EE. <https://www.thermofisher.com/ee/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-component-considerations.html> (viimati uuendatud 19.12.2023).
 69. M.L. Wong, J.F. Medrano, Real-time PCR for mRNA quantitation, *BioTechniques*. 39 (2005) 75–85. <https://doi.org/10.2144/05391RV01>.
 70. N. Khehra, I.S. Padda, C.J. Swift, Polymerase Chain Reaction (PCR), in: *StatPearls*, StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2024. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK589663/> (viimati uuendatud 22.05.2024).
 71. M. Behlke, L. Huang, L. Bogh, S. Rose, E. Devor, Fluorescence and Fluorescence Applications, in: 2005. <https://www.semanticscholar.org/paper/Fluorescence-and-Fluorescence-Applications-Behlke-Huang/cd272287f31602717de8c6436fb4fe4ef746ee41> (viimati uuendatud 13.03.2024).
 72. TaqMan™ MGB Probe. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4316034> (viimati uuendatud 13.03.2024).
 73. Essentials of Real-Time PCR | Thermo Fisher Scientific - EE. <https://www.thermofisher.com/ee/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/essentials-real-time-pcr.html> (viimati uuendatud 25.11.2024).

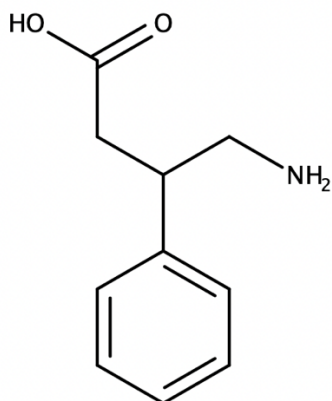
74. M. Manzano, Chapter 6 - Labelled and unlabelled probes for pathogen detection with molecular biology methods and biosensors, in: V. Gurtler (Ed.), *Methods Microbiol.*, Academic Press, 2021: pp. 179–225. <https://doi.org/10.1016/bs.mim.2021.03.001>.
75. Fluorescent or Dye Modifications - Microsynth - CH. <https://www.microsynth.com/dyes.html> (viimati uuendatud 19.12.2023).
76. 6-ROX [6-Carboxy-X-rhodamine] *CAS 194785-18-7* | AAT Bioquest. <https://www.aatbio.com/products/6-rox-6-carboxy-x-rhodamine-cas-194785-18-7> (viimati uuendatud 28.05.2024).
77. ROX Passive Reference Dye | Thermo Fisher Scientific - EE. <https://www.thermofisher.com/ee/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/reagents-kits/other/rox-passive-reference-dye.html> (viimati uuendatud 25.11.2023).
78. M.-A. Enoch, L. Schwartz, B. Albaugh, M. Virkkunen, D. Goldman, Dimensional Anxiety Mediates Linkage of GABRA2 Haplotypes With Alcoholism, *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet. Off. Publ. Int. Soc. Psychiatr. Genet.* 0 (2006) 599–607. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.30336>.
79. J. Mukherjee, R.A. Cardarelli, Y. Cantaut-Belarif, T.Z. Deeb, D.P. Srivastava, S.K. Tyagarajan, M.N. Pangalos, A. Triller, J. Maguire, N.J. Brandon, S.J. Moss, Estradiol modulates the efficacy of synaptic inhibition by decreasing the dwell time of GABAA receptors at inhibitory synapses, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114 (2017) 11763–11768. <https://doi.org/10.1073/pnas.1705075114>.
80. M. Gulinello, S.S. Smith, Anxiogenic Effects of Neurosteroid Exposure: Sex Differences and Altered GABAA Receptor Pharmacology in Adult Rats, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 305 (2003) 541–548. <https://doi.org/10.1124/jpet.102.045120>.
81. D.E. Comings, J.P. MacMurray, Molecular Heterosis: A Review, *Mol. Genet. Metab.* 71 (2000) 19–31. <https://doi.org/10.1006/mgme.2000.3015>.
82. S. Raud, S. Sütt, H. Luuk, M. Plaas, J. Innos, S. Kõks, E. Vasar, Relation between increased anxiety and reduced expression of alpha1 and alpha2 subunits of GABAA receptors in Wfs1-deficient mice, *Neurosci. Lett.* 460 (2009) 138–142. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.05.054>.
83. L. Ma, Y. Huang, S. Huang, F. Xu, Y. Wang, S. Zhao, D. Deng, Y. Ding, T. Zhang, W. Zhao, X. Chen, Polymorphisms of pharmacogenetic candidate genes affect etomidate anesthesia susceptibility, *Front. Genet.* 13 (2022). <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.999132>.

10. LISAD

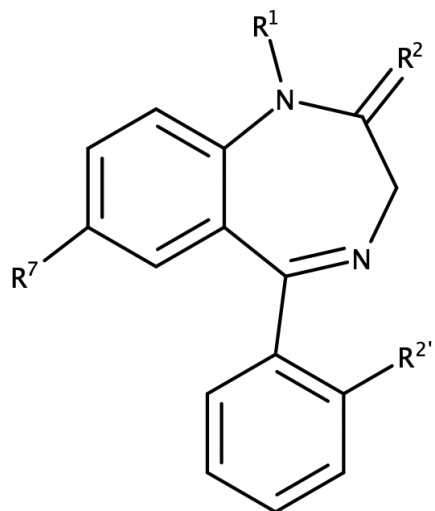
Lisa 1. Joonis pre- ja postsünaptilisest neuronist ja nende vahelisest sünaptilisest pilust.



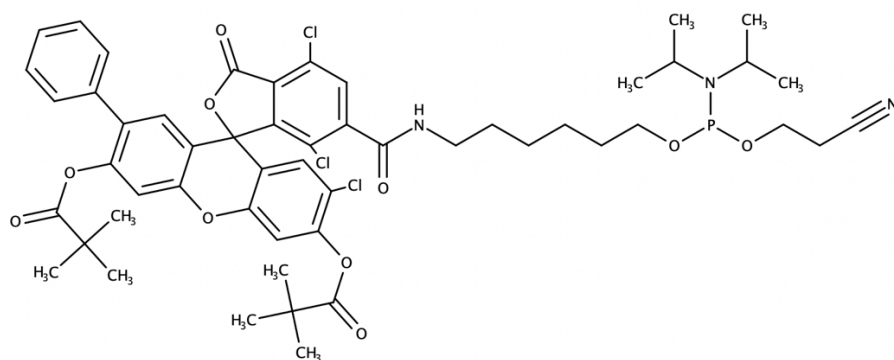
Lisa 2. γ -aminobutaanhappe derivaadi fenibuti (β -fenüül- γ -aminobutaanhape) struktuur. Joonistatud programmiga MarvinSketch.



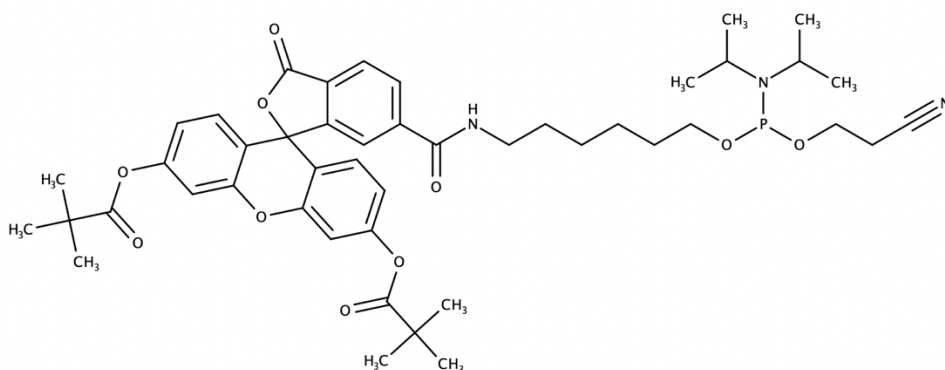
Lisa 3. Bensodiasepiinide keemiline struktuur. Joonistatud programmiga MarvinSketch.



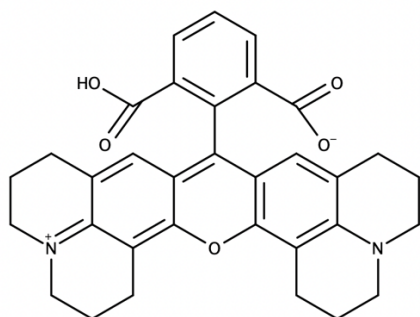
Lisa 4. RT-PCR meetodi käigus kasutatud fluorofooride struktuurid: A – 6-VIC-fosforamidaat ($C_{52}H_{59}Cl_3N_3O_{10}P$); B – 6-FAM-fosforamidaat ($C_{46}H_{58}N_3O_{10}P$); C – 6-ROX, 6-karboksü-X-rodamiin ($C_{33}H_{30}N_2O_5$). Struktuurid on joonistatud programmiga MarvinSketch.



A

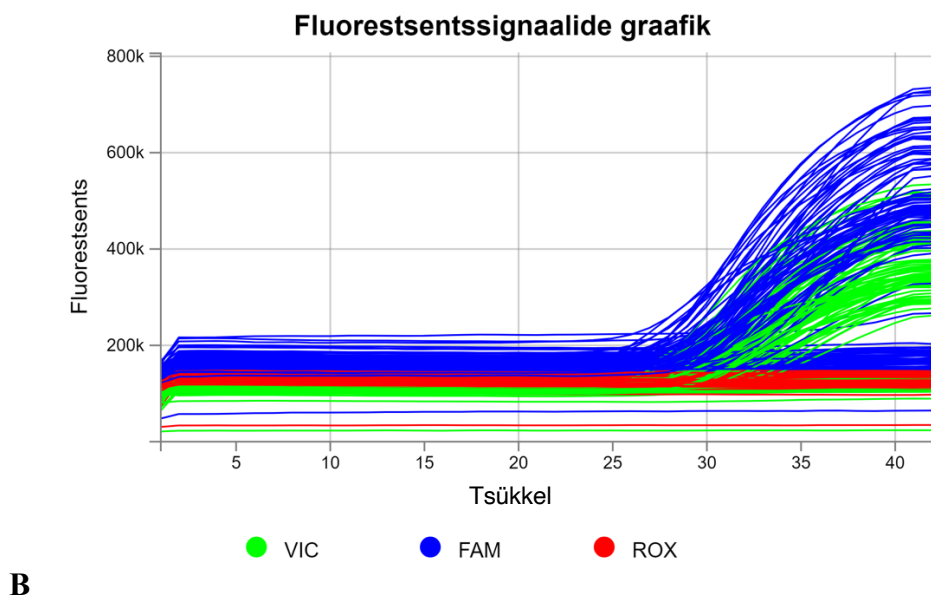
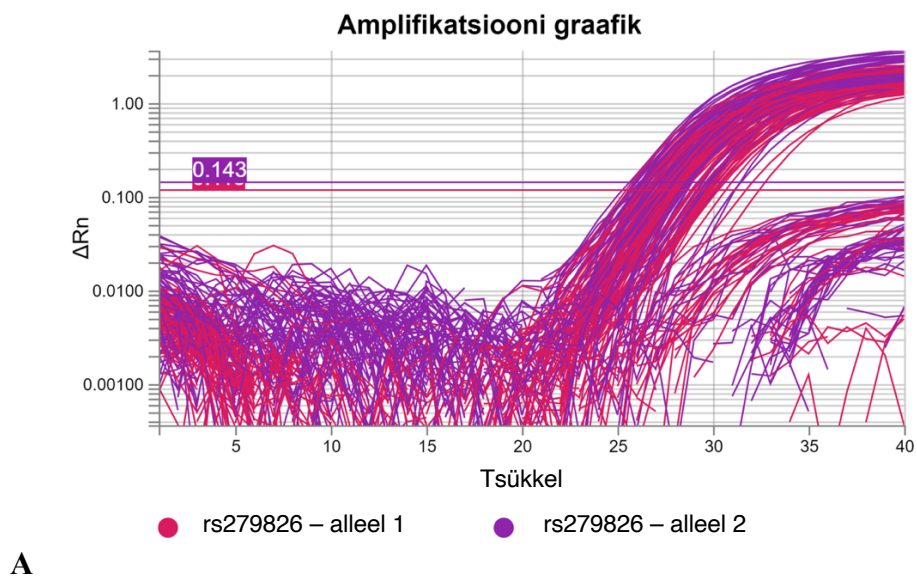


B



C

Lisa 5. Näide RT-PCR rs27926 SNP ühe katseseeria amplifikatsiooni graafikust (A) ja fluorestsentssignaalide graafikust (B). Amplifikatsiooni graafiku y-teljel on normaliseeritud fluorestsentssignaal. X-teljel on PCR tsükli number, kokku 40. Amplifikatsiooni kõverad on saadud ühe katseseeria proovide PCR analüüsil, kus üks joon graafikul iseloomustab ühe DNA proovi paljundamise protsessi. Roosa värv vastab alleeli 1 (A) signaalile ja lilla värv alleeli 2 (G) signaalile. 0,143 on eellugemi käigus leitud alleeli 2 fluorestsentssignaali lävend, millest alates PCR reaktsiooni signaal ületab taustamüra. Roosaga tähistatud horisontaalne joon tähistab alleeli 1 signaali lävendit. Fluorestsentssignaalide graafikul on y-teljel fluorestsentssignaali intensiivsus ja x-teljel PCR tsükli number, kokku 40. Jooned graafikul tähistavad ühe katseseeria proovide FAM, ROX ja VIC fluorestsentssignaalide intensiivsuse muutust PCR tsükelite jooksul.



Lisa 6. *GABRA2* rs279826 (A) ja rs279858 (B) seisundi-, püsiärevuse ja depressiivsuse kahefaktorilise ANOVA tulemused genotüübi ja soo vahel. n tähistab vaatluste arvu, F sümbol F-statistiku väärtust, p-väärtus statistilist usaldusväärsust ja η^2 efekti suurust.

A

		n	F	p	η^2
<i>Püsiärevus</i>	GABRA2 rs279826	1289	1,199	0,302	0,002
	sugu	1289	32,449	<0,001	0,024
	GABRA2 rs279826 * sugu	1289	3,041	0,048	0,005
<i>Seisundiärevus</i>	GABRA2 rs279826	1289	1,293	0,275	0,002
	sugu	1289	3,042	0,081	0,002
	GABRA2 rs279826 * sugu	1289	2,380	0,093	0,004
<i>Depressiivsus</i>	GABRA2 rs279826	1309	2,013	0,134	0,003
	sugu	1309	3,148	0,662	0,002
	GABRA2 rs279826 * sugu	1309	1,261	0,412	0,002

B

		n	F	p	η^2
<i>Püsiärevus</i>	GABRA2 rs279858	1288	2,302	0,100	0,003
	sugu	1288	23,012	<0,001	0,017
	GABRA2 rs279858 * sugu	1288	0,323	0,724	0,0005
<i>Seisundiärevus</i>	GABRA2 rs279858	1288	0,615	0,541	0,001
	sugu	1288	2,939	0,087	0,002
	GABRA2 rs279858 * sugu	1288	0,880	0,415	0,001
<i>Depressiivsus</i>	GABRA2 rs279858	1313	2,292	0,101	0,003
	sugu	1313	2,714	0,100	0,002
	GABRA2 rs279858 * sugu	1313	0,100	0,904	0,0002

Lisa 7. *GABRA2* rs279826 (A) ja rs279858 (B) seisundiärevuse, püsiärevuse ja depressiivsuse skooride statistilised näitajad genotüüpide võrdluses. n on andmeanalüüsis kasutatud vaatluste arv, SD on standardhälve, SE on standardviga, variatsioonikordaja arvutatakse SD/Mean.

A

Seisundiärevuse (STAI-STATE) tulemused

GABRA2 rs279826	sugu	n	Keskmine (M)	SD	SE	Variatsioonikordaja
A/A	mehed	144	31,313	7,788	0,649	0,249
	naised	207	31,117	8,339	0,425	0,268
A/G	mehed	249	33,237	9,622	0,669	0,289
	naised	207	31,097	8,049	0,695	0,259
G/G	mehed	385	31,578	7,189	0,456	0,228
	naised	176	32,267	9,933	0,749	0,308

Püsiärevuse (STAI-TRAIT) tulemused

GABRA2 rs279826	sugu	n	Keskmine (M)	SD	SE	Variatsioonikordaja
A/A	mehed	144	39,132	7,419	0,618	0,190
	naised	207	43,512	9,665	0,672	0,222
A/G	mehed	249	39,759	7,491	0,475	0,188
	naised	207	41,348	8,285	0,422	0,200
G/G	mehed	385	39,179	8,091	0,699	0,207
	naised	176	41,659	8,892	0,670	0,213

Depressiivsuse (MÅDRS) tulemused

GABRA2 rs279826	sugu	n	Keskmine (M)	SD	SE	Variatsioonikordaja
A/A	mehed	144	8,514	6,859	0,572	0,806
	naised	395	7,917	6,357	0,320	0,801
A/G	mehed	211	7,939	7,048	0,485	0,779
	naised	136	7,551	5,727	0,491	0,758
G/G	mehed	252	7,917	5,930	0,374	0,749
	naised	177	8,972	5,709	0,429	0,636

B**Seisundiärevuse (STAI-STATE) tulemused**

GABRA2 rs279858	sugu	n	Keskmine (M)	SD	SE	Variatsioonikordaja
A/A	mehed	175	31,171	7,430	0,562	0,238
	naised	256	32,664	9,199	0,575	0,282
A/G	mehed	262	31,336	7,571	0,468	0,242
	naised	365	31,444	8,648	0,453	0,275
G/G	mehed	88	31,386	8,075	0,861	0,257
	naised	148	32,480	9,653	0,793	0,297

Püsiärevuse (STAI-TRAIT) tulemused

GABRA2 rs279858	sugu	n	Keskmine (M)	SD	SE	Variatsioonikordaja
A/A	mehed	175	39,783	6,761	0,511	0,170
	naised	256	42,781	9,302	0,581	0,217
A/G	mehed	262	38,931	7,921	0,489	0,203
	naised	365	41,444	8,198	0,429	0,198
G/G	mehed	88	40,045	8,332	0,888	0,208
	naised	148	41,939	9,250	0,760	0,221

Depressiivsuse (MÅDRS) tulemused

GABRA2 rs279858	sugu	n	Keskmine (M)	SD	SE	Variatsioonikordaja
A/A	mehed	177	8,458	6,305	0,474	0,745
	naised	265	8,958	6,825	0,419	0,762
A/G	mehed	264	7,617	5,947	0,366	0,781
	naised	372	8,105	6,237	0,323	0,770
G/G	mehed	92	7,793	6,403	0,668	0,822
	naised	149	8,698	5,821	0,477	0,669

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Stella Lise Maanurm,

1. Annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

„*GABRA2* geeni polümorfismide rs279826 ja rs279858 seos ärevuse ja depressiivsusega“, mille juhendajad on Jaanus Harro ja Karita Laugus,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Stella Lise Maanurm

28.05.2024