

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT
FÜSIOLOOGIA OSAKOND

Agnes Rikk

**Ketamiini antidepressiivne toime Wfs1-puudulikkusega hiirtel ja seos NMDA
ja AMPA retseptorite ekspressiooniga**

Magistritöö (30 EAP)

Geenitehnoloogia

Juhendajad PhD Silva Sütt

MSc Alina Altpere

PhD Lilian Kadaja-Saarepuu

TARTU 2016

Ketamiini antidepressiivne toime *Wfs1*-puudulikkusega hiirtel ja seos NMDA ja AMPA retseptorite ekspressiooniga

Wolframi sündroom on autosomaalne retsessiivne haigus, mida põhjustab mutatsioon *WFS1* geenis. 60% Wolframi sündroomi põdevatest patsientidest kannatavad psühhiaatriliste häirete all, sealhulgas depressioon. Hiirtel põhjustab *Wfs1* puudulikkus suuremat ärevust. *Wfs1*-puudulikkusega hiired on tundlikumad antidepressantide suhtes, seega on nad heaks mudeliks depressiooni uurimisel. Kliinilised uuringud on näidanud, et NMDA antagonist ketamiin on uudne antidepressant. Ketamiin toimib kiiresti ja ühekordne annus leevendab tõhusalt depressiooni sümptomeid. Homosügootsed *Wfs1*-puudulikkusega hiired on ketamiini suhtes tundlikumad võrreldes heterosügootsete ja metsiktüüpi hiirtega. Arvatakse, et ketamiini toime on tingitud NMDA retseptori inhibeerimisest ja AMPA retseptori stimuleerimisest. Seetõttu uurisime NMDA ja AMPA retseptorite alühikute geeniekspressiooni hipokampuses, prefrontaalses koores ja oimusagaras kasutades reaalaaja PCRi peale ketamiini manustamist.

Märksõnad: *Wfs1*, ketamiin, depressioon, NMDA retseptor, AMPA retseptor

CERCS kood: B470 Füsioloogia

Antidepressant effect of ketamine in *Wfs1*-deficient mice and relation between NMDA and AMPA receptor expression

Wolfram syndrome is an autosomal recessive disorder caused by mutation in the *WFS1* gene. Around 60% of Wolfram syndrome patients suffer from psychiatric disorders, including depression. In mice, *Wfs1* deficiency causes higher anxiety-like behavior. *Wfs1*-deficient mice are more sensitive to antidepressants than wild type littermates, thus they are good animal models of depression. Evidence from clinical trials shows that the NMDA antagonist ketamine is a novel antidepressant because it acts rapidly and single infusion of ketamine relieves symptoms of depression in treatment-resistant patients. Homozygous *Wfs1*-deficient mice are more sensitive to ketamine than heterozygous and wild type littermates. It is believed that ketamine action is due to inhibition of NMDA and stimulation of AMPA receptors. Therefore, gene expression of NMDA and AMPA receptor subunits following ketamine treatment was studied by real-time-PCR in hippocampus, prefrontal cortex and temporal lobe.

Keywords: *Wfs1*, ketamine, depression, AMPA receptor, NMDA receptor

CERCS code: B470 Physiology

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	6
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1 Wfs1 iseloomustamine.....	7
1.1.1 Wolframi sündroom.....	7
1.1.2 Wfs1 geeni ja valgu iseloomustamine	8
1.1.3 Wfs1-puudulikkusega hiired	8
1.2 Glutamaadi retseptorid.....	10
1.2.1 NMDA retseptor	10
1.2.2 AMPA retseptor.....	13
1.3 Ketamiin ja depressioon.....	14
2 EKSPERIMENTAALNE OSA	16
2.1 Töö eesmärgid.....	16
2.2 Materjal ja meetodika	16
2.2.1 Katseloomad	16
2.2.2 Ketamiini manustamine	17
2.2.3 Aju prepareerimine	17
2.2.4 RNA eraldamine, cDNA süntees.....	17
2.2.5 Kvantitatiivne reaalaaja PCR	17
2.2.6 Statistika	18
2.3 Tulemused.....	20
2.3.1 AMPA geenide ekspressioon hipokampuses.....	20
2.3.2 NMDA geenide ekspressioon hipokampuses.....	21

2.3.3	AMPA geenide ekspressioon prefrontaalses koores	22
2.3.4	NMDA geenide ekspressioon prefrontaalses koores.....	23
2.3.5	AMPA geenide ekspressioon oimusagaras	25
2.3.6	NMDA geenide ekspressioon oimusagaras	25
2.4	Arutelu	28
KOKKUVÕTE.....		31
SUMMARY		32
TÄNUAVALDUSED.....		34
KASUTATUD KIRJANDUS		35
LIHTLITSENTS.....		47

KASUTATUD LÜHENDID

AMPA	α -amino-3-hüdrosü-5-metüül-4-isoksaool-propioonhape
BDNF	Tserebraalne neurotroofne faktor (<i>brain-derived neurotrophic factor</i>)
CA1	<i>Cornu Ammonis</i> 1
cAMP	Tsükliline adenosiinmonofosfaat
cDNA	Komplementaarne DNA
DIDMOAD	<i>Diabetes Insipidus, Diabetes Mellitus, Optic Atrophy, Deafness</i>
ER	Endoplasmaatiline retiikulum
GABA	γ -aminovõihape
Gabra	γ -aminovõihappe retseptori α alaühik
Gria	Glutamaadi ionotroopse AMPA retseptori alaühiku geen inimesest erineval liigil
GRIA/GluN	Glutamaadi ionotroopse AMPA retseptori alaühiku geen või valk inimesel või inimesest erineval liigil
Grin	Glutamaadi ionotroopse NMDA retseptori alaühiku geen inimesest erineval liigil
GRIN/NR	Glutamaadi ionotroopse NMDA retseptori alaühiku geen või valk inimesel või inimesest erineval liigil
HPRT	Hüpoksantiin-guaaniin fosforibosüültransferaas
KA	Kainaat
mRNA	Informatsiooni (<i>messenger</i>) RNA
NMDA	N-metüül-D-aspartaat
PCR	Polümeraasi ahelreaktsioon (<i>polymerase chain reaction</i>)
SERT	Serotoniini transporter
TST	Sabast riputamise katse (<i>tail suspension test</i>)
WFS1	Wolframi sündroom 1 geen või valk inimesel
Wfs1	Wolframi sündroom 1 geen või valk inimesest erineval liigil
WT	Metsiktüüpi (<i>wild type</i>)
5-HT	5-hüdrosütrüptamiin ehk serotoniin

SISSEJUHATUS

Wolframi sündroom on autosomaalne retsessiivne haigus, mille põhjustajaks on mutatsioonid *WFS1* geenis. Sündroom on kõige paremini kirjeldatav kui neurodegeneratiivne häire, mis on seotud kesknärvisüsteemiga, perifeersete närvide ja neuroendokriinsete kudedega (Strom *et al.*, 1998). Suur osa Wolframi sündroomi põdevatest inimestest kannatab erinevate psühhiaatriliste häirete all, sealhulgas depressioon (Swift *et al.*, 1990). Heterosügootsetel mutantse *WFS1* alleeli kandjatel on tõenäosus haigestuda erinevatesse psühhiaatrilistesse haigustesse 26 korda suurem ning on näidatud, et polümorfismid *WFS1* geenis muudavad inimesed vastuvõtlikumaks meeleoluhäiretele (Swift ja Swift, 2000; Koido *et al.*, 2005; Swift ja Swift, 2005).

Depressiooni põdevatel inimestel on leitud muutusi glutamaadi tasemes ning NMDA retseptorite ekspressioonis (Sanacora *et al.*, 2004; McCullumsmith *et al.*, 2007; Chandley *et al.*, 2014). Praeguseks on erinevates katsetes tõestatud ketamiini toime meeleoluhäiretega inimestele. Ketamiin on NMDA retseptori antagonist, mis seondudes NMDA retseptorile takistab Ca^{2+} ionide sissevoolu. On näidatud, et ketamiini ühekordne annus (0,5 mg/kg) vähendab kiirelt depressiooni sümptomeid ning ketamiini tõhus antidepressiivne toime mõjub teistele ravimitele mitte alluvatele depressiooni põdevatele patsientidele (Berman *et al.*, 2000). Ketamiin blokeerib NMDA retseptorit ning, kuna glutamaat ei saa NMDA retseptorile seonduda, aktiveerib see AMPA retseptorid (Moghaddam *et al.*, 1997; Maeng *et al.*, 2008).

Käesoleva Tartu Ülikooli Bio- ja siirdemeditsiini instituudis füsioloogia osakonnas valminud magistritöö eesmärkideks on uurida ketamiini mõju NMDA retseptori alaühikute ja AMPA retseptori alaühikute geeniekspressioonile *Wfs1*-puudulikkusega homosügootsetel ja heterosügootsetel hiirtel.

1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Wfs1 iseloomustamine

1.1.1 Wolframi sündroom

Wolframi sündroom (MIM #2223000), akronüümiga DIDMOAD (*diabetes inspidius, diabetes mellitus, optic atrophy, deafness*), on haruldane autosomaalne retsessiivne haigus, mida iseloomustab varajane diabeet, magediabeet, nägemisnärv atroofia ja erinevad neuroloogilised sümptomid, nagu kurtus, ataksia, perifeerne neuropaatia, kusetrakti atoonia ja vaimne arengupeatatus (Kinsley *et al.*, 1995; Strom *et al.*, 1998). Sündroom on kõige paremini kirjeldatav kui neurodegeneratiivne häire, mis on seotud kesknärvisüsteemiga, perifeersete närvide ja neuroendokriinsete kudedega (Strom *et al.*, 1998). Haiguse esmakirjeldajateks olid Wolfram ja Wagener, kes teatasid aastal 1938 neljast haigusjuhtumist. Nad kirjeldasid haigust kui juveniilset suhkruhaigust koos tugeva nägemisnärv atroofiaga (Wolfram ja Wagener, 1938).

Magediabeet avaldub keskmiselt 6-aastaselt ja progressiivne nägemisnärv atroofia 11-aastaselt. Wolframi sündroomi patsientide keskmine eluiga on 30 aastat. Peamisteks surma põhjusteks on tsentraalne hingamispuudulikkus, mis on põhjustatud ajutüve atroofiast, ning sekundaarne neerupuudulikkuse infektsioon (Kinsley *et al.*, 1995; Barrett ja Bunday, 1997).

60% Wolframi sündroomiga inimesi kannatab psühhiaatriliste häirete all, enim esineb depressiooni, psühhoosi, impulsiivsust ja agressiivsust (Swift *et al.*, 1990). Heterosügootsetel *WFS1* mutatsiooni kandjatel on 26 korda suurem psühhiaatriliste häirete tekkimise tõenäosus (Swift ja Swift, 2000). On näidatud, et polümorfismid *WFS1* geenis muudavad inimesed vastuvõtlikumaks meelelühäiretele (Swift ja Swift, 2000; Koido *et al.*, 2005; Swift ja Swift, 2005). Meelelühäireid on seostatud muutustega serotonergilises, noradrenergilises ja dopamiinergilises süsteemis (Matto *et al.*, 2011; Visnapuu *et al.*, 2013a; Visnapuu *et al.*, 2013b).

Wolframi sündroomi keskmine esinemissagedus Inglismaal on 1/770 000 ja Põhja-Ameerikas 1/100 000 (Barrett *et al.*, 1995; Kinsley *et al.*, 1995).

1.1.2 Wfs1 geeni ja valgu iseloomustamine

WFS1 geen paikneb inimesel neljanda kromosoomi 16-ndas piirkonnas (4p16.1) ja koosneb kaheksast eksonist, millest ekson 1 on mittekodeeriv. Enamik Wolframi sündroomi põhjustavaid mutatsioone on leitud 8. eksonis, mis on ühtlasi ka kõige suurem ekson (2,6 kb) (Collier *et al.*, 1996; Inoue *et al.*, 1998; Strom *et al.*, 1998). *WFS1* kodeerib endoplasmaatilise retiikulumi (ER) glükoproteiini volframiini, mis on 890 aminohappe suurune transmembraanne valk molekulmassiga 100 kDa. Volframiin on hüdrofoobne valk, millel on üheksa transmembraanset domääni ja suured hüdrofiilsed piirkonnad mõlemas terminuses (Takeda *et al.*, 2001; Hofmann *et al.*, 2003). Volframiini üheks võimalikuks funktsiooniks on rakusisese Ca^{2+} homöostaasi regulatsioon (Takei *et al.*, 2006).

Volframiin ekspresseerub paljudes kudedes üle terve organismi. *Wfs1* ekspressiooni tase on eriti kõrge ajus, südames ja pankreases insuliini sekreteerivates β -rakkudes. Ajus ekspresseeritakse *Wfs1* valku suurtes kogustes eelkõige emotsionaalse käitumisega seotud struktuurides nagu hipokampuse CA1 regioonis, laiendatud amügdalas, ventraalses juttkehas ning prefrontaalses koores (Takeda *et al.*, 2001; Luuk *et al.*, 2008).

Nii inimestel kui ka hiirtel põhjustab volframiini puudulikkus pankrease β -rakkude vähenemist, mis on tingitud β -rakkude suurenenud apoptoosist, kuna rakud ei tule toime ER-stressiga (Karasik *et al.*, 1989; Riggs *et al.*, 2005; Yamada *et al.*, 2006). *Wfs1* on seega oluline insuliini tootvate pankrease β -rakkude ellujäämiseks ja funktsioneerimiseks ning *Wfs1* ekspressioon ajus viitab valgu rollile emotsionaalse käitumise regulatsioonis (eelkõige hirm ja ärevus) (Luuk *et al.*, 2009).

1.1.3 Wfs1-puudulikkusega hiired

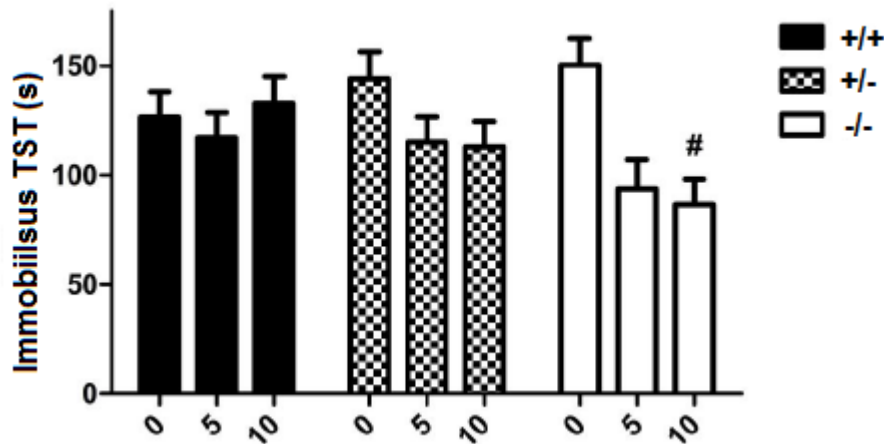
Praeguseks on loodud kaks erinevat *Wfs1*-puudulikkusega hiirte liini (Ishihara *et al.*, 2004; Luuk *et al.*, 2009). Tartu Ülikooli Bio- ja siirdemeditiini instituudis füsioloogia osakonnas on loodud *Wfs1*-puudulikkusega hiired, kellel on välja lülitatud 8. ekson. Võrreldes metsiktüüpi pesakaaslastega on nad väiksema kehakaaluga. Lisaks sellele on *Wfs1*-puudulikkusega hiirtel suurenenud ärevus ja plasma kortikosterooni tase stressirohkes keskkonnas võrreldes metsiktüüpi hiirtega (Luuk *et al.*, 2009).

Wfs1-puudulikkusega hiirtel on vähenenud tundlikkus amfetamiinile ja suurenenud tundlikkus apomorfiinile. Amfetamiini stimuleeriva toime vähenemine Wfs1-puudulikkusega hiirtel võib viidata madalamale presünaptilise dopamiini vabastamisele mesolimbilises rajas. Seevastu postsünaptiline dopamiini retseptori agonist apomorfiin indutseerib kõrgemat motoorset aktivatsiooni, mis peegeldab dopamiini ülesregulatsiooni postsünaptilises retseptoris mesolimbilises süsteemis. Wfs1-puudulikkusega hiirte käitumusliku aktiivsuse vähenemine võib olla tingitud Wfs1-ekspresseerivate neuronite madalamast aktiivsusest, mis ulatuvad välja naalduvast tuumast kuni keskaju dopamiinergiliste neuroniteni. Selle põhjal võib oletada, et Wfs1 valk on närilistel oluline käitumuslike adaptatsioonide vahendaja (Luuk *et al.*, 2009).

Wfs1-puudulikkusega hiired on oluliselt tundlikumad antidepressantide paroksetiini ja imipramiini manustamisele võrreldes metsiktüüpi hiirtega, mis võib olla tingitud vähenenud 5-HT transporteri (SERT) ekspressioonist Wfs1-puudulikkusega hiirtel (Visnapuu *et al.*, 2013b).

Samuti on näidatud Wfs1-puudulikkusega hiirtel GABA_A retseptorite alaühikute *α1* (*Gabra1*) ja *α2* (*Gabra2*) mRNA ekspressiooni vähenemist oimusagaras ja prefrontaalses koos võrreldes metsiktüüpi hiirtega (Raud *et al.*, 2009) ja GABA_A retseptori antagonist diasepaami (1 mg/kg) manustamine Wfs1-puudulikkusega hiirtele vähendab ärevust tõstetud pluss-puuri katses (Luuk *et al.*, 2009). Uuringud on näidanud, et homosügootsed Wfs1-puudulikkusega hiired on tundlikud etanooli suhtes, kus etanooli manustamine (2 g/kg) tõstis *Gabra2* mRNA ekspressiooni oimusagaras ja prefrontaalses koos (Raud *et al.*, 2015). Nende tulemuste põhjal võib järeldada, et Wfs1-puudulikkusega hiirtel esineb häireid GABA-ergilises närviülekanades.

Hiljutised uuringud tõestavad Wfs1-puudulikkusega homosügootsete hiirte suurenenud tundlikust ketamiinile võrreldes metsiktüüpi ja Wfs1-puudulikkusega heterosügootsete pesakaaslastega. Nimelt, sabast riputamise katses (*tail suspension test*, TST) vähenes homosügootsetel hiirtel immobiilsus 30 minutit peale ketamiini (10 mg/kg) manustamist (Joonis 1.) (Reimets *et al.*, 2016). Lähtuvalt käitumiskatsete tulemustest, oli käeoleva töö eesmärgiks uurida kas suurenenud ketamiini tundlikkus Wfs1-puudulikkusega hiirtel on seotud NMDA ja AMPA retseptorite geeni ekspressiooni muutustega aju erinevates piirkondades.



Joonis 1. Ketamiini toime (5 mg/kg ja 10 mg/kg) metsiktüüpi (+/+), Wfs1-puudulikkusega heterosügootsete (+/-) ja Wfs1-puudulikkusega homosügootsete (-/-) hiirte immobiilsusele TSTs. Tukey HSD test peale kahe-suunalist ANOVAT: genotüüp $F(2, 96)=1,1$, $p=0,32$; ketamiini manustamine $F(2, 96)=7,5$, $p<0,01$; genotüüp x ketamiin $F(4,96)$, $p<0,01$ (kohandatud Reimets *et al.*, 2016).

1.2 Glutamaadi retseptorid

Glutamaat on imetajate kesknärvisüsteemis peamine erutusvirgatsaine, mis seondub postsünaptilise membraani spetsiifilistele retseptoritele. Need retseptorid on jagatud kahte suurde klassi, lähtudes aktivatsiooni mehhanismidest: ionotroopsed (ligandseoselised katiooni kanalid) ja metabotroopsed (G-valguga seotud) retseptorid (Kew ja Kemp, 2005; Niciu *et al.*, 2012). Glutamaadi ionotroopsed retseptorid on ioonsed kanalid, mis lasevad läbi väikseid katioone (Na^+ ja Ca^{2+}) ekstratsellulaarsest ruumist tsütosooli (Niciu *et al.*, 2014). Ioonkanaleid moodustavad glutamaadi retseptorid jagunevad kolme suurde klassi, mis on oma nime saanud neid aktiveerivate agonistide järgi: N-metüül-D-aspartaadi (NMDA), α -amino-3-hüdroksü-5-metüül-4-isoksasool-propioonhappe (AMPA) ja kainaadi (KA) retseptorid (Kew ja Kemp, 2005; Niciu *et al.*, 2014). Glutamaat seondub suurima afiinsusega NMDA retseptoritele (Zito ja Scheuss, 2009).

1.2.1 NMDA retseptor

NMDA retseptorite perekond koosneb seitsmest alühikust: NR1 (*GRIN1*) (Moriyoshi *et al.*, 1991), NR2A-D (*GRIN2*) (Ishii *et al.*, 1993), NR3A (*GRIN3A*) (Ciabarra *et al.*, 1995; Sucher *et al.*, 1995) ja NR3B (*GRIN3B*) (Nishi *et al.*, 2001; Matsuda *et al.*, 2002), mis moodustavad

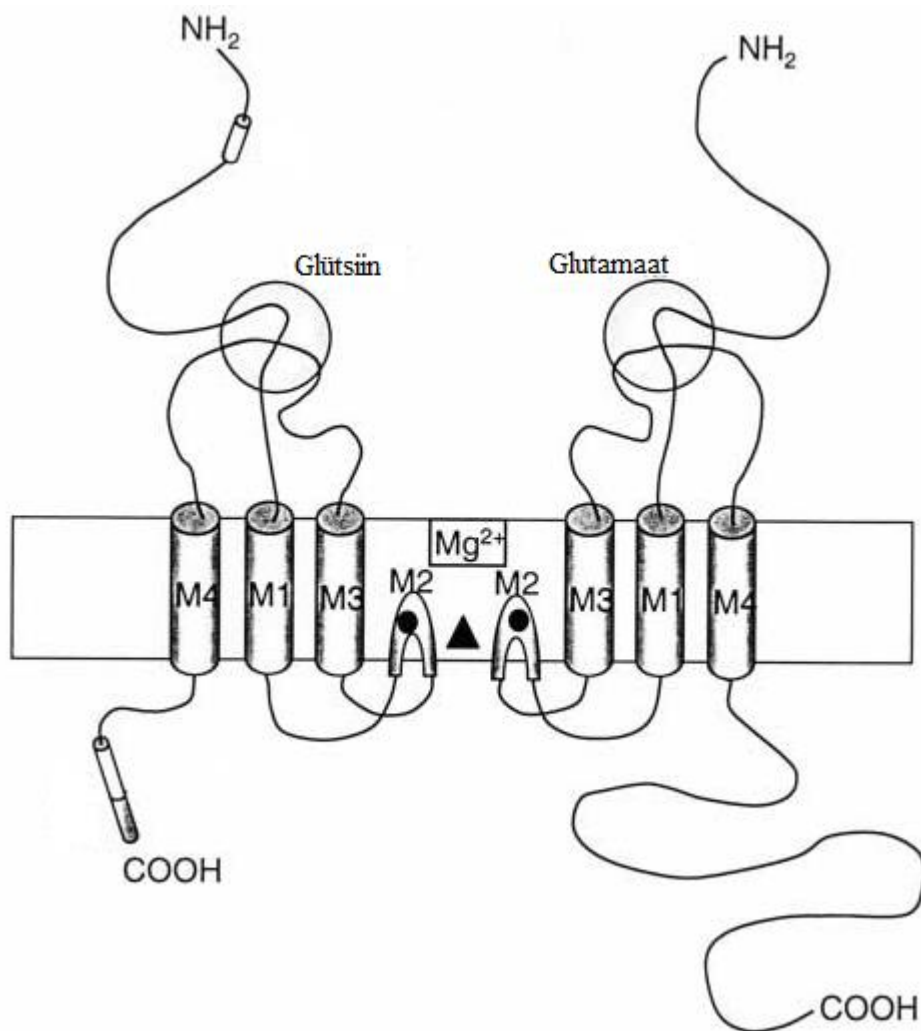
tetrameerse heteromeerse kompleksi (Monyer *et al.*, 1992; Rosenmund *et al.*, 1998). NMDA retseptorite alaühikutel, nagu ka teistel ionotroopsete retseptorite alaühikutel, on ekstratsellulaarne N-terminaalne domään, kolm transmembraanset domääni ja intratsellulaarne C-terminaalne domään (Mayer ja Armstrong, 2004) (Joonis 2.). NR1 on NMDA retseptori funktsioneerimisel tähtis alaühik, seega on alati retseptori kompleksi koosseisus vähemalt üks NR1 alaühik. NR1 on kombineeritud vähemalt ühe NR2 (A-D) alaühikuga, harvemini ka NR3 (A, B) alaühikuga (Monyer *et al.*, 1992; Schorge ja Colquhoun, 2003; Ulbrich ja Isacoff, 2008).

NMDA retseptori funktsioonid on vahendatud läbi Ca^{2+} ioonide sisenemise avatud kanalist (MacDermott *et al.*, 1986). Kui NMDA retseptori poor on blokeeritud ekstratsellulaarse Mg^{2+} iooniga, takistab see Ca^{2+} sissevoolu (Nowak *et al.*, 1984; Nowak ja Wright, 1992). Glutamaadi ja glütsiini seondumine retseptorile on vajalik NMDA retseptori aktiveerimiseks (Clements ja Westbrook, 1991). NR1 alaühik omab seondumiskohta glütsiini jaoks (Kuryatov *et al.*, 1994) ning NR2 alaühik on oluline glutamaadi seondumiseks (Laube *et al.*, 1997; Anson *et al.*, 1998). Lisaks sellele on näidatud, et NR3A alaühik omab kõrget afiinsust glütsiini suhtes ja madalat afiinsust glutamaadi suhtes, mis näitab seda, et NR3A on samuti oluline glütsiini seondumiseks retseptorile (Yao ja Mayer, 2006).

NMDA retseptor on oluline sünaptilises plastilisuses, mälus ja õppimises. Katse transgeensete hiirtega näitas, et NR2B üleekspressioon täiskasvanud hiirte eesajus toob kaasa suurema sünaptilise plastilisuse ning hea õppimisvõime ja mälu (Tang *et al.*, 2001).

GRIN1 alaühiku mRNA ekspresseerub kõikjal täiskasvanud koe kesknärvisüsteemis. Roti lootelises arengujärgus on ekspressioon madal, kuid arengu kulgedes ekspressioon suureneb ja muutub laiaulatuslikuks (Takai *et al.*, 2003). *GRIN2A* alaühiku ekspressioon on kõrge eesajus, eelkõige hipokampuses, ajukoores, taalamuses ja väikeajus (Monyer *et al.*, 1992; Ishii *et al.*, 1993; Loftis ja Janowsky, 2003). *GRIN2B* ekspresseerub peamiselt täiskasvanud koe eesaju piirkonnas – hipokampuses, ajukoores ja taalamuses (Loftis ja Janowsky, 2003). *GRIN2C* alaühik ekspresseerub täiskasvanud rotil enamasti ainult väikeajus (Monyer *et al.*, 1992; Ishii *et al.*, 1993; Wenzel *et al.*, 1997) ning *GRIN2D* ekspressioon on piiratud subkortikaalses alas (vaheaju ja keskaju piirkonnas) ja on silmapaistev just varajases arengukäigus (Ishii *et al.*, 1993; Wenzel *et al.*, 1996). *NR3A* ekspresseerub rotil arenemise käigus ajukoores, keskajus ja hipokampuses (Al-Hallaq *et al.*, 2002). *GRIN3B* alaühik on kõrgelt ekspresseerunud aju somaatilistes motoneuronites, ajutüves ja selgroos (Nishi *et al.*, 2001; Matsuda *et al.*, 2003). Hiljutised uuringud on näidanud, et *GRIN3B* ekspresseerub ka väikeaju kooses ja hipokampuses (Andersson *et al.*, 2001; Bendel *et al.*, 2005).

NMDA retseptoreid seostatakse paljude närvihaigustega, nagu näiteks skisofreenia, meeleoluhäired (eelkõige depressioon ja bipolaarne häire), Huntingtoni tõbi ja Alzheimer. NMDA retseptorid pakuvad potentsiaalseid sidumiskohti paljudele ravimitele ning antagonistid inhibeerivad või deaktiveerivad retseptori aktiivsust. Antagonistid võivad seonduda retseptori erinevatele aladele, sealhulgas agonisti sidumiskohtadele, allosteerilistele saitidele ja ioonkanali poorile (Lakhan *et al.*, 2013).



Joonis 2. NMDA retseptori skemaatiline joonis. Vasakul pool on NR1 alaiühik, mis seob glütsiini, ning paremal pool NR2 alaiühik, mis on seondumiskohaks glutamaadile. Alaiühikutel on ekstratsellulaarne N-terminaalne domään, kolm transmembraanset domääni (M1, M3 ja M4) ja intratsellulaarne C-terminaalne domään. Lisaks on alaiühikutel ka tagasi sisenev silmus (*re-entrant loop*) (M2) (kohandatud Stephenson, 2001).

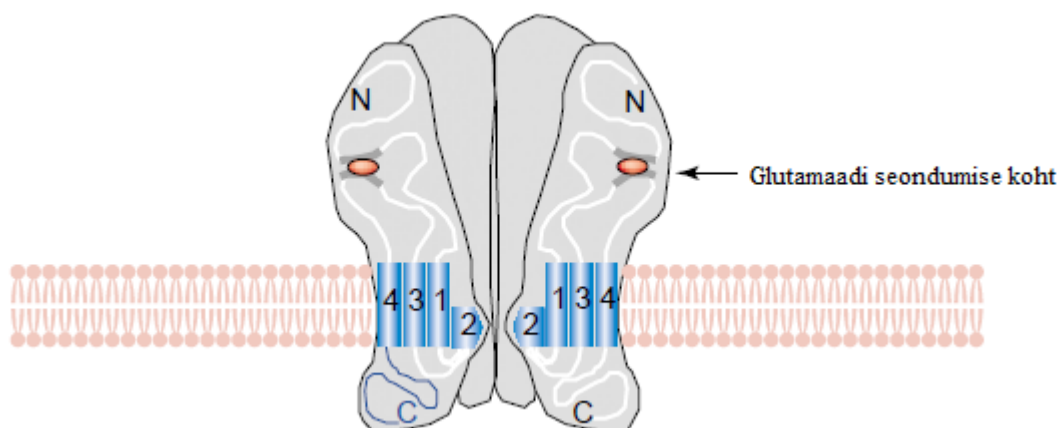
1.2.2 AMPA retseptor

Peale NMDA retseptorite on imetajate kesknärvisüsteemis laialdaselt ka AMPA retseptoreid. AMPA retseptor koosneb neljast alaühikust: GluR1 (*GRIA1*) (Hollmann *et al.*, 1989), GluR2 (*GRIA2*), GluR3 (*GRIA3*) (Nakanishi *et al.*, 1990) ja GluR4 (*GRIA4*) (Keinanen *et al.*, 1990) ning nagu NMDA retseptorid, on ka AMPA retseptorid tetrameersed heteromeerid (Wenthold *et al.*, 1992; Rosenmund *et al.*, 1998). AMPA retseptorid sisaldavad suurt ekstratsellulaarset N-terminust, kolm transmembraanset domääni ja intratsellulaarset C-terminaalset domääni, nagu ka teised glutamaadi retseptorid (Mayer ja Armstrong, 2004) (Joonis 3.). AMPA retseptorite vahendatud aktivatsioon on kiire (Palmer *et al.*, 2005), samas kui NMDA vahendatud aktivatsioon on aeglasem, kuid kauakestvam (Niciu *et al.*, 2014). Glutamaat seondub AMPA retseptorile nõrgema affiinsusega kui NMDA retseptorile (Zito ja Scheuss, 2009).

AMPA retseptorid lasevad läbi Na⁺ ioone (Palmer *et al.*, 2005), kuid on kindlaks tehtud, et retseptorid, millel puuduvad GluR2 alaühikud, lasevad läbi ka Ca²⁺ ioone (Hollmann *et al.*, 1991; Bennett *et al.*, 1996). Seega GluR2 alaühik määrab ära retseptoriiooni selektiivsuse (Wenthold *et al.*, 1992).

AMPA retseptorid ekspresseeruvad laialdaselt üle kogu kesknärvisüsteemi. *GRIA1*, *GRIA2* ja *GRIA3* ekspresseeruvad rohkesti näiteks hipokampuses, ajukoos, basaalganglionis ja amügdalas. Väikeajus ekspresseeruvad *GRIA2*, *GRIA3* ja *GRIA4* (Keinanen *et al.*, 1990; Sato *et al.*, 1993). *GRIA4* mRNA ekspressioonitase on kõrge retikulaartaalamuse tuumas (Keinanen *et al.*, 1990). AMPA retseptorite alaühikute ekspressioon on detekteeritav juba roti väga varajases arengukäigus (Monyer *et al.*, 1991).

Nii nagu NMDA retseptorite puhul, seostatakse ka AMPA retseptoreid mitmete närvihaigustega. Näiteks epilepsiat põdevatel patsientidel on *GRIA1* ja *GRIA4* mRNA tase langenud hipokampuses (Grigorenko *et al.*, 1997), mis näitab, et AMPA retseptorite ekspressioonis on toimunud muutused võrreldes tervete indiviididega.



Joonis 3. AMPA retseptori skemaatiline joonis. Alaühikud sisaldavad suurt ekstratsellulaarset N-terminust, kolm transmembraanset domääni (1, 3 ja 4) ning intratsellulaarset C-terminust. Nagu NMDA retseptor, sisaldab ka AMPA retseptor tagasi sisenevat silmust (*re-entrant loop*) (2) (kohandatud Song ja Huganir, 2002).

1.3 Ketamiin ja depressioon

Ketamiin on NMDA retseptori antagonist, seondues NMDA retseptoril katiooni siduvale saidile ja takistades katioonide sissevoolu (eelkõige Ca^{2+}) (Fagg, 1987; O'Shaughnessy ja Lodge, 1988). Ketamiini ühekordne annus (0,5 mg/kg) vähendab kiirelt depressiooni sümptomeid (Berman *et al.*, 2000). Praeguseks läbi viidud mitmed uuringuid on näidanud, et ketamiinil on kiire ja tõhus antidepressiivne toime isegi neil depressiooni põdevatel patsientidel, kes on teiste ravimite suhtes resistentsed (Zarate *et al.*, 2006; Murrough *et al.*, 2013). Ketamiini antidepressiivne toime kestab keskmiselt üks nädal (Zarate *et al.*, 2006), mistõttu on vajalik ketamiini mitmekordne süstimine (aan het Rot *et al.*, 2010; Messer *et al.*, 2010).

NMDA retseptorite blokeerimiseks piisab väiksest ketamiini doosist, selle tulemusena suureneb sünaptilise glutamaadi vabanemine, mis soodustab glutamaatergilist närviülekannet AMPA retseptorile. Kui postsünaptilised NMDA retseptorid on blokeeritud, aktiveerib sünaptiline glutamaat eelistatult AMPA retseptoreid (Moghaddam *et al.*, 1997). Kuna ketamiini antidepressiivset toimet on võimalik blokeerida AMPA retseptori antagonistide manustamisel (Maeng *et al.*, 2008; Koike *et al.*, 2011) võib järeldada, et ketamiini antidepressiivne toime on vahendatud AMPA retseptori poolt.

Praeguste teadmiste põhjal on välja pakutud, et depressiooni põdevatel ja bipolaarse meeleoluhäirega inimestel on glutamaadi tase ja NMDA retseptorite ekspressioonitase muutunud

võrreldes tervete isikutega. Depressiooni põdevatel inimestel on tõusnud glutamaadi tase ajukooses (Sanacora *et al.*, 2004). Prefrontaalses kooses on depressiivsetel patsientidel vähenenud NR2A ja NR2B alaühikute hulk (Feyissa *et al.*, 2009), samas kui *locus coeruleus*'es on kõrge kuni mõõdukas *GRIN1*, *GRIN2A*, *GRIN2B*, *GRIN2D*, *GRIA2* ja *GRIA4* geenide ekspressioonitase (Chandley *et al.*, 2014). Lisaks on bipolaarse meeleoluhäirega inimestel langenud *GRIN1* ja *GRIN2A* mRNA ekspressioonitase hipokampuses (McCullumsmith *et al.*, 2007).

Arvatakse, et ketamiin toimib neile NMDA retseptoritele, mille koosseisu kuulub NR2B alaühik. NR2B alaühiku deletsioon vähendab hiirtel meeleheitele sarnast ja depressiooni-laadset käitumist (Miller *et al.*, 2014).

2 EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Töö eesmärgid

Käesoleva töö eesmärkideks on:

- Välja selgitada ketamiini mõju AMPA retseptorite alaühikute geenide (*Gria1* ja *Gria2*) ekspressioonile homosügootsetel Wfs1-puudulikkusega hiirtel, heterosügootsetel Wfs1-puudulikkusega hiirtel ja metsiktüüpi loomadel peale ketamiini ja füsioloogilise lahuse manustamist 30 minuti jooksul.
- Välja selgitada ketamiini mõju NMDA retseptorite alaühikute geenide (*Grin1*, *Grin2a*, *Grin2b*) ekspressioonile homosügootsetel Wfs1-puudulikkusega hiirtel, heterosügootsetel Wfs1-puudulikkusega hiirtel ja metsiktüüpi loomadel peale ketamiini ja füsioloogilise lahuse manustamist 30 minuti jooksul.

2.2 Materjal ja meetodika

2.2.1 Katseloomad

Katseloomadeks olid Tartu Ülikooli Bio- ja siirdemeditsiini instituudis füsioloogia osakonnas loodud emased Wfs1-puudulikkusega homosügootsed (Luuk *et al.*, 2009), Wfs1-puudulikkusega heterosügootsed ja metsiktüüpi hiired. Katseloomade paljundamine ja genotüüpiseerimine viidi läbi Tartu Ülikooli füsioloogia osakonnas. Katseloomadeks olid F2 põlvkond geneetilise taustaga (129S6/SvEvTac × C57BL/6) × (129S6/SvEvTac × C57BL/6). Loomade vanus oli 2-3 kuud. Hiiri hoiti puurides 6-8 kaupa 20 °C juures 12-h/12-h valge/pime tsüklis. Hiirtel oli vaba ligipääs toidule ja veele. Loomkatsed viidi läbi ajavahemikus 8.00 - 17.00. Katsed viidi läbi Eesti Vabariigi põllumajandusministeeriumi antud loa alusel (nr. 88, välja antud 25.august 2011).

2.2.2 Ketamiini manustamine

Wfs1-puudulikkusega homosügootsetele, Wfs1-puudulikkusega heterosügootsetele ja metsiktüüpi hiirtele süstiti kas füsioloogilist lahust (kontrollgrupp) või ketamiini (10 mg/kg) intraperitonaalselt 30 minutit enne ajude eemaldamist.

2.2.3 Aju prepareerimine

Katseloomad surmati tservikaalse dislokatsiooni teel ja eraldati aju. Peale seda prepareeriti aju jääl, millest eemaldati oimusagar (sisaldab amügdalat), hipokampus ja prefrontaalne koor. Eraldatud ajustruktuurid külmutati vedelas lämmastikus ja hoiti kuni edasiste analüüsideni -80 °C juures.

2.2.4 RNA eraldamine, cDNA süntees

RNA eraldamiseks kasutati *Trizoli* (Invitrogen), cDNA sünteesimiseks kasutati oligod(T)18 primereid ja Superscript pöördtranskriptaas III (Invitrogen) vastavalt etteantud protokollidele.

2.2.5 Kvantitatiivne reaalaaja PCR

Kvantitatiivse reaalaaja PCRi teostamiseks kasutati QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR Süsteemi (PE Applied Biosystems, USA) ja QuantStudio 12K Flex v1.2.2 tarkvara. Praimerite ja sondide järjestused on toodud tabelis 1. Koduhoidja geeniks oli *Hprt1*, mis on eelnevalt tõestatud katsetes kõige efektiivsemalt ja stabiilsemalt ekspresseeruv geen (Raud *et al.*, 2009).

Kõik reaktsioonid teostati neljas korduses, et vähendada võimalikke vigu. Kõikide reaktsioonide lõppmahuks oli 10 µl, kasutades 50-100 ng cDNA-d. Kõikide gruppide geeni ekspressioonid teostati paralleelselt. Ekspressiooni analüüsimiseks kasutati 2-deltadeltaCt meetodit (Livak ja Schmittgen, 2001).

2.2.6 Statistika

Geeni ekspressiooni tulemused on analüüsitud kahe-suunalise ANOVAGA (genotüüp ja ketamiini manustamine). Post hoc võrdlused on teostatud Tukey HSD testiga kasutades Statistica 10 (StatSoft, USA).

Tabel 1. Kvantitatiivse reaalaaja PCRi praimerid ja sondid.

Geeni sümbol	Assay ID või järestus	Geeni ID
Gria1 for	5'-GCTGGTTGCCTTAATCGAGTTC-3'	NM_001113325.2
Gria1 rev	5'-TCGATGTCCGTATGGCTTCA-3'	
Gria1 probe	5'-AGCGAGTCGAAGCGGATGAAGGGT-3'	
Gria2 for	5'-GACTGACACCCCATATCGACAA-3'	NM_001083806.1
Gria2 rev	5'-CGCATAGACGCCTCTTGAAAAC-3'	
Gria2 probe	5'-TCACCAATGCTTTCTGCTCCC-3'	
Grin1 for	5'-CATGACTGGCTCTGGGTACGT-3'	NM_008169.3
Grin1 rev	5'-TCTTGCCGTTGATTAGCTGAAG-3'	
Grin1 probe	5'-CCCTGCGCTACGCTCCTGACG-3'	
Grin2a for	5'-CCTCAGTGACAAGAAGTTCCA-3'	NM_008170.2
Grin2a rev	5'-ACTTCCATTGGGTACTGTCC-3'	
Grin2a probe	5'-TGACTATTCTCCGCCTTTC-3'	
Grin2b for	5'-GATGGGGAGATGGAAGAAGT-3'	NM_008171.3
Grin2b rev	5'-GCTCATAACCTCATTCTTCTC-3'	

Grin2b probe	5'-CTCTGGCTCACTGGCATTG-3'	
Hprt1 for	5'-GCAGTACAGCCCCAAAATGG-3'	NM_013556
Hprt1 rev	5'-AACAAAGTCTGGCCTGTATCCAA-3'	
Hprt1 probe (VIC_MGB)	5'-VIC-AAGCTTGCTGGTGAAAAGGACCTCTCG MGB-3'	

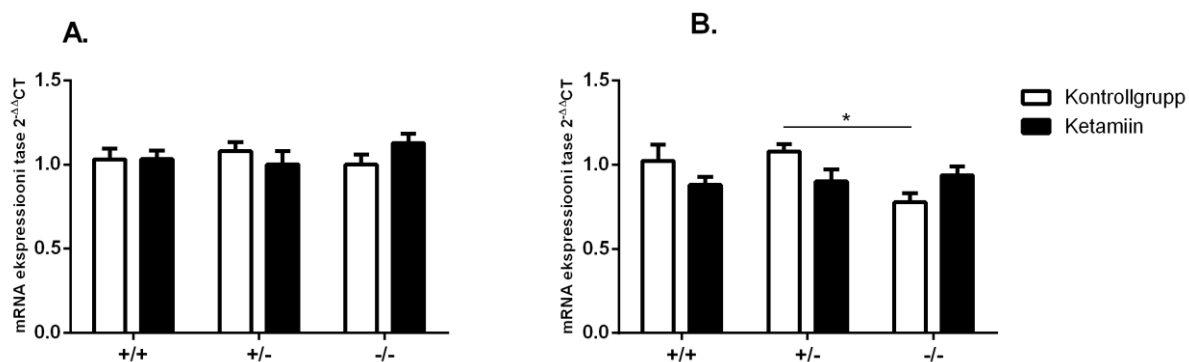
Gria1 – glutamaadi ionotroopne AMPA retseptor, alähik 1; *Gria2* – glutamaadi ionotroopne AMPA retseptor, alähik 2; *Grin1* – glutamaadi ionotroopne NMDA retseptor, alähik 1; *Grin2a* – glutamaadi ionotroopne NMDA retseptor, alähik 2A; *Grin2b* – glutamaadi ionotroopne NMDA retseptor, alähik 2B; *Hprt1* - hüpoksaantiin-guaaniin fosforibosüültransferaas 1.

2.3 Tulemused

2.3.1 AMPA geenide ekspressioon hipokampuses

Gria1 geeni ekspressioonis gruppide vahel statistiliselt olulisi erinevusi hipokampuses ei tuvastatud: genotüüp ($F(2,46)=0,151$, $p=0,861$), ketamiini manustamine ($F(1,46)=0,131$, $p=0,719$), genotüüp \times ketamiin ($F(2,46)=1,407$, $p=0,255$) (Joonis 4. A).

Kahesuunaline ANOVA tuvastas *Gria2* mRNA ekspressioonis interaktsiooni genotüübi ja ketamiini manustamise vahel ($F(2,38)=4,430$, $p=0,019$). Nimelt, peale ketamiini manustamist langes *Gria2* geeni ekspressioon metsiktüüpi ($F(1,38)=1,111$, $p=0,576$) ja heterosügootsetel Wfs1-puudulikkusega hiirtel ($F(1,38)=1,111$, $p=0,327$) ning tõusis homosügootsetel Wfs1-puudulikkusega hiirtel ($F(1,38)=1,111$, $p=0,480$) võrreldes kontrollgrupi hiirtega, kuid Post hoc tulemused ei olnud statistiliselt olulised. Kontrollgrupi homosügootsetel Wfs1-puudulikkusega hiirtel oli *Gria2* ekspressioon madalam võrreldes sama grupi metsiktüüpi hiirtega ($F(2,38)=2,382$, $p=0,130$) ja statistiliselt oluliselt madalam võrreldes heterosügootsete Wfs1-puudulikkusega pesakaaslastega ($F(2,38)=2,382$, $p=0,026$). Ketamiiniga süstitud homosügootsete Wfs1-puudulikkusega hiirte ekspressioon ei erinenud sama grupi metsiktüüpi ($F(2,38)=2,382$, $p=0,978$) ja Wfs1-puudulikkusega heterosügootsete hiirtega ($F(2,38)=2,382$, $p=0,999$) (Joonis 4. B).



Joonis 4. *Gria1* (A) ja *Gria2* (B) geenide ekspressiooni muutused hipokampuses peale füsioloogilise lahuse ja ketamiini manustamist metsiktüüpi (+/+), Wfs1-puudulikkusega heterosügootsetel (+/-) ja Wfs1-puudulikkusega homosügootsetel (-/-) hiirtel. Igas grupis 6-10 looma.

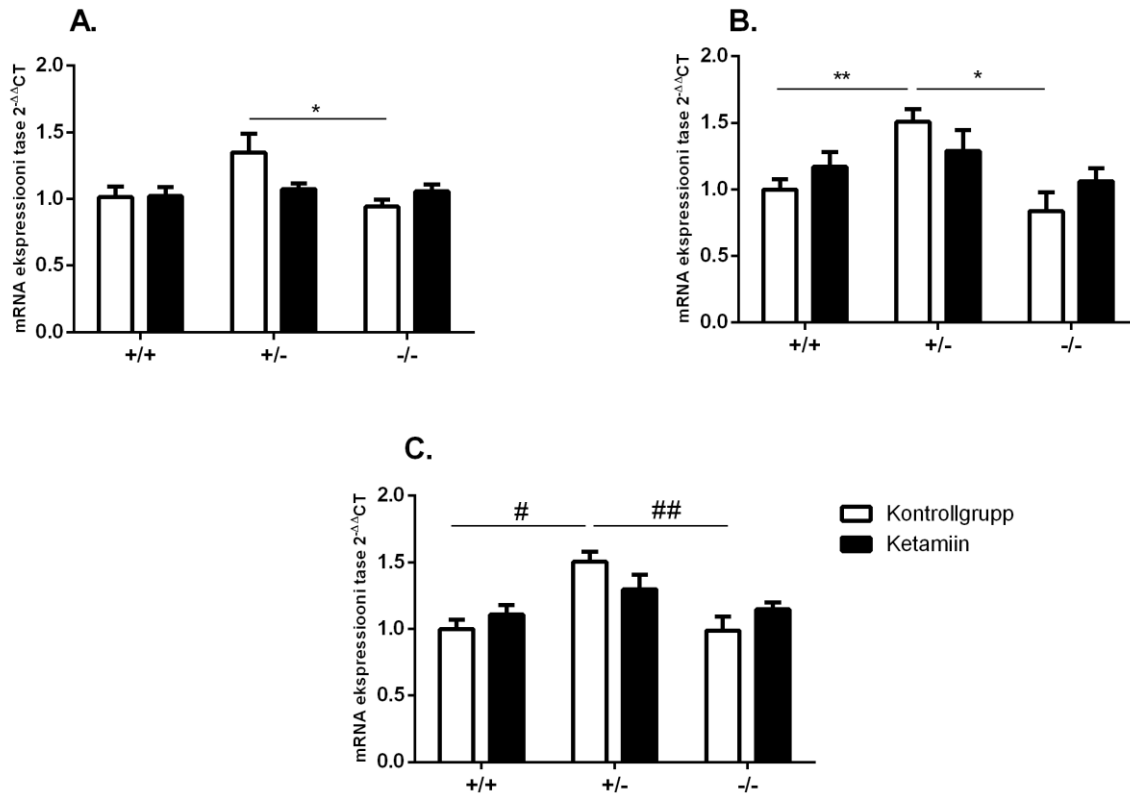
*- $p < 0,05$ võrreldes sama grupi homosügootsete Wfs1-puudulikkusega hiirtega (Tukey HSD test peale kahesuunalist ANOVAt).

2.3.2 NMDA geenide ekspressioon hipokampuses

Grin1, *Grin2a* ja *Grin2b* geenide ekspressioonis esines statistiliselt olulisi erinevusi hipokampuses ainult kontrollgrupi (füsioloogilist lahust saanud) loomadel. Kontrollgrupi Wfs1-puudulikkusega homosügootsetel hiirtel oli *Grin1* ekspressioonitase sarnane sama grupi metsiktüüpi hiirtega ($F(2,40)=4,282$, $p=0,992$), kuid heterosügootsetel Wfs1-puudulikkusega hiirtel oli *Grin1* geeni ekspressioon tõusnud võrreldes metsiktüüpi hiirtega ($F(2,40)=4,282$, $p=0,084$) ja statistiliselt oluliselt tõusnud võrreldes homosügootsete Wfs1-puudulikkusega pesakaaslastega ($F(2,40)=4,282$, $p=0,013$). Lisaks sellele oli heterosügootsetel Wfs1-puudulikkusega hiirtel *Grin1* ekspressioon natukene langenud peale ketamiini manustamist ($F(1,40)=0,6067$, $p=0,160$), kuid tulemus ei olnud statistiliselt oluline. Seega ketamiini manustamine ei mõjutanud oluliselt *Grin1* geeni ekspressiooni: ketamiini manustamine ($F(1,40)=0,607$, $p=0,441$), genotüüp \times ketamiin ($F(2,40)=3,147$, $p=0,054$) (Joonis 5. A).

Grin2a ekspressioon oli statistiliselt oluliselt tõusnud kontrollgrupi heterosügootsetel Wfs1-puudulikkusega hiirtel võrreldes sama grupi homosügootsete Wfs1-puudulikkusega ($F(2,42)=6,948$, $p=0,011$) ja metsiktüüpi hiirtega ($F(2,42)=6,948$, $p=0,039$) (Joonis 5. B). Lisaks sellele oli oluliselt tõusnud ka *Grin2b* ekspressioon kontrollgrupi Wfs1-puudulikkusega heterosügootsetel hiirtel võrreldes homosügootsete Wfs1-puudulikkusega ($F(2,41)=10,77$, $p=0,0015$) ja metsiktüüpi hiirtega ($F(2,41)=10,77$, $p=0,003$) (Joonis 5. C).

Ketamiin ei mõjutanud oluliselt peale *Grin1* ka *Grin2a* ja *Grin2b* geenide ekspressiooni mistahes genotüübil võrreldes vastavate kontrollgruppidega. *Grin2a* ekspressioon: ketamiini manustamine ($F(1,42)=0,063$, $p=0,803$), genotüüp \times ketamiin ($F(2,42)=1,768$, $p=0,183$). *Grin2b* ekspressioon: ketamiini manustamine ($F(1,41)=0,09$, $p=0,772$), genotüüp \times ketamiin ($F(2,41)=2,75$, $p=0,075$) (Joonis 5. A, B, C).



Joonis 5. *Grin1* (A), *Grin2a* (B) ja *Gria2b* (C) geenide ekspressiooni muutused hipokampuses peale füsioloogilise lahuse ja ketamiini manustamist metsiktüüpi (+/+), Wfs1-puudulikkusega heterosügootsetel (+/-) ja Wfs1-puudulikkusega homosügootsetel (-/-) hiirtel. Igas grupis 6-9 looma.

*- $p < 0,05$ võrreldes sama grupi homosügootsete Wfs1-puudulikkusega hiirtega (Tukey HSD test peale kahesuunalist ANOVAt).

** - $p < 0,05$ võrreldes sama grupi metsiktüüpi hiirtega (Tukey HSD test peale kahesuunalist ANOVAt).

- $p < 0,01$ võrreldes sama grupi metsiktüüpi hiirtega (Tukey HSD test peale kahesuunalist ANOVAt).

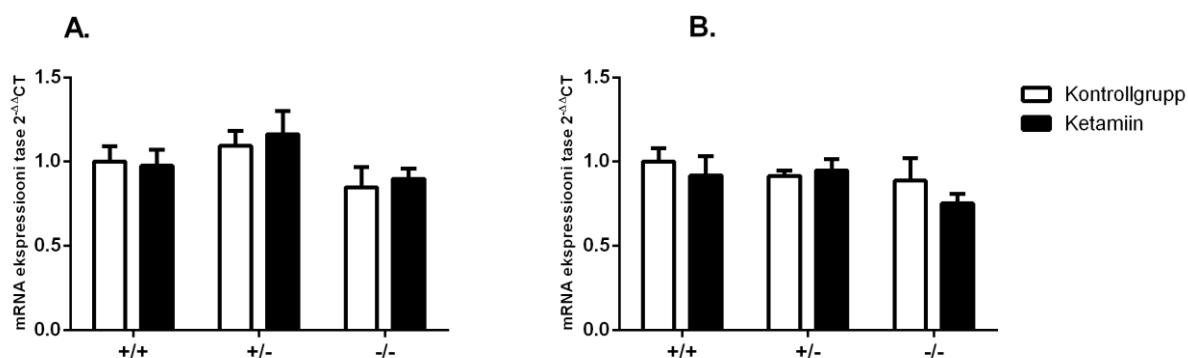
- $p < 0,01$ võrreldes sama grupi homosügootsete Wfs1-puudulikkusega hiirtega (Tukey HSD test peale kahesuunalist ANOVAt).

2.3.3 AMPA geenide ekspressioon prefrontaalses koos

Kahesuunaline ANOVA leidis prefrontaalses koos *Gria1* ekspressioonis statistiliselt olulise erinevuse genotüüpide vahel ($F(2,48)=3,330$, $p=0,044$), kuid Post hoc Tukey HSD test ei tuvastanud statistiliselt olulist erinevust. Homosügootsetel kontrollgrupi Wfs1-puudulikkusega hiirtel oli *Gria1* mRNA ekspressioon natukene langenud võrreldes sama grupi heterosügootsete Wfs1-puudulikkusega hiirtega ($F(2,48)=3,330$, $p=0,519$), kuid tulemus ei olnud statistiliselt oluline. Lisaks sellele ei olnud geeni ekspressioonis erilisi erinevusi metsiktüüpi kontrollgrupi

hiirtel võrreldes sama grupi Wfs1-puudulikkusega homosügootsete ($F(2,48)=3,330$, $p=0,910$) ja heterosügootsete ($F(2,48)=3,330$, $p=0,985$) hiirtega. Ketamiiniga süstitud heterosügootsetel Wfs1-puudulikkusega hiirtel oli märgata väikest *Gria1* ekspressioonitaseme tõusu võrreldes sama grupi metsiktüüpi ($F(2,48)=3,330$, $p=0,772$) ja Wfs1-puudulikkusega homosügootsete pesakaaslastega ($F(2,48)=3,330$, $p=0,408$), kuid tulemused ei olnud statistiliselt olulised. Ketamiini manustamine ei mõjutanud *Gria1* ekspressiooni mistahes genotüübil: ketamiini manustamine ($F(1,48)=0,153$, $p=0,698$), genotüüp \times ketamiin ($F(2,48)=0,119$, $p=0,888$) (Joonis 6. A).

Prefrontaalses koores ei olnud statistiliselt olulist erinevust *Gria2* ekspressioonis genotüüpide vahel. Samuti ei mõjutanud ketamiini manustamine geeni ekspressiooni: genotüüp ($F(2,39)=1,516$, $p=0,232$), ketamiini manustamine ($F(1,39)=0,804$, $p=0,375$), genotüüp \times ketamiin ($F(2,39)=0,524$, $p=0,597$) (Joonis 6. B).



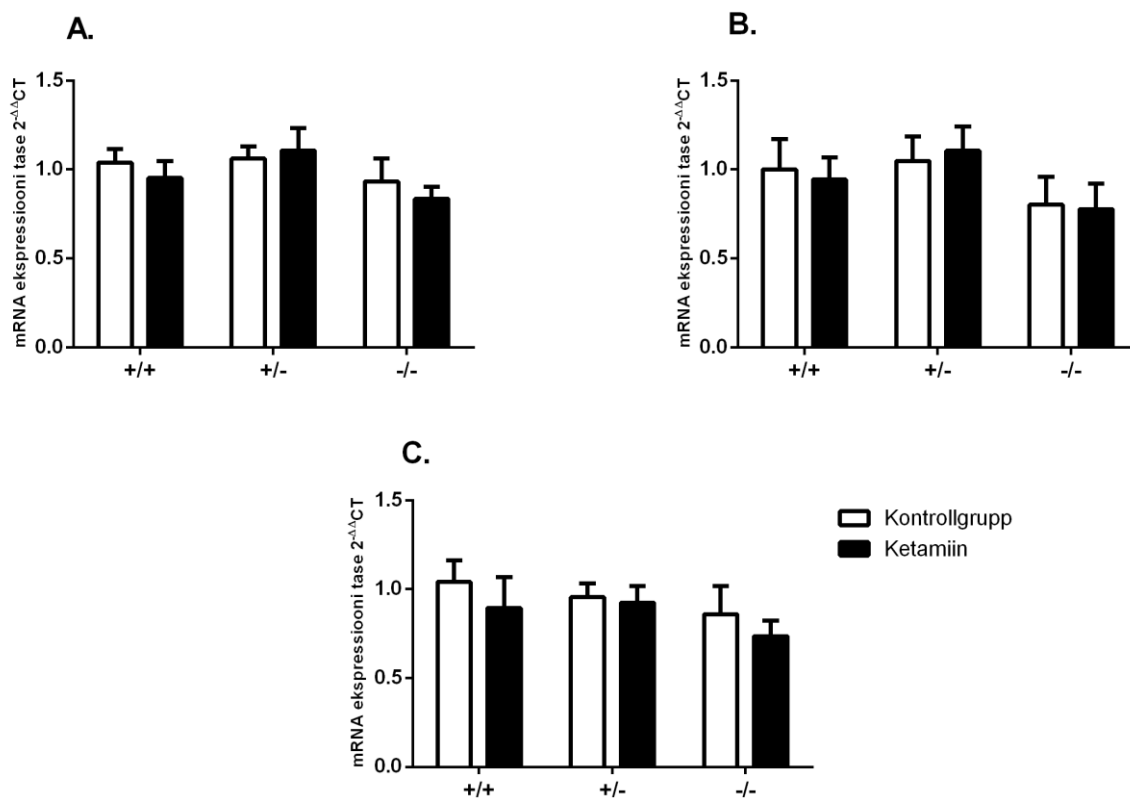
Joonis 6. *Gria1* (A) ja *Gria2* (B) geenide ekspressiooni muutused prefrontaalses koores peale füsioloogilise lahuse ja ketamiini manustamist metsiktüüpi (+/+), Wfs1-puudulikkusega heterosügootsetel (+/-) ja Wfs1-puudulikkusega homosügootsetel (-/-) hiirtel. Igas grupis 7-10 looma.

2.3.4 NMDA geenide ekspressioon prefrontaalses koores

Prefrontaalses koores ei esinenud statistiliselt olulisi erinevusi *Grin1*, *Grin2a* ja *Grin2b* ekspressioonis genotüüpide vahel. *Grin1* ekspressioon oli natuke madalam homosügootsetel ketamiiniga süstitud Wfs1-puudulikkusega hiirtel võrreldes sama grupi heterosügootsete hiirtega ($F(2,39)=2,214$, $p=0,333$), kuid tulemus polnud statistiliselt oluline. Ketamiini manustamine ei mõjutanud *Grin1* geeni ekspressiooni võrreldes genotüüpide vastavate kontrollgruppidega:

ketamiini manustamine ($F(1,39)=0,344$, $p=0,561$), genotüüp \times ketamiin ($F(2,39)=0,351$, $p=0,706$) (Joonis 7. A).

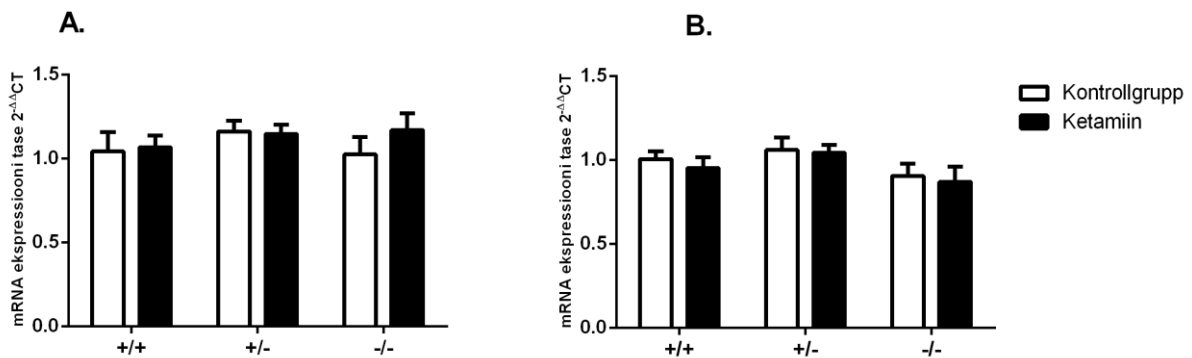
Grin2a ekspressioonis ei olnud olulisi erinevusi kontrollgrupi homosügootsetel *Wfs1*-puudulikkusega hiirtel võrreldes sama grupi metsiktüüpi ($F(2,38)=2,029$, $p=0,933$) ja heterosügootsete ($F(2,38)=2,029$, $p=0,830$) pesakaaslastega. Ketamiin ei mõjutanud oluliselt ka *Grin2a* ekspressiooni: ketamiini manustamine ($F(1,38)=0,004$, $p=0,948$), genotüüp \times ketamiin ($F(2,38)=0,08$, $p=0,923$) (Joonis 7. B). Lisaks sellele ei tuvastatud statistiliselt olulisi erinevusi *Grin2b* mRNA ekspressioonis: genotüüp ($F(2,38)=1,143$, $p=0,329$), ketamiini manustamine ($F(1,38)=1,031$, $p=0,316$), genotüüp \times ketamiin ($F(2,38)=0,129$, $p=0,879$) (Joonis 7. C).



Joonis 7. *Grin1* (A), *Grin2a* (B) ja *Grin2b* (C) geenide ekspressiooni muutused prefrontaalses koores peale füsioloogilise lahuse ja ketamiini manustamist metsiktüüpi (+/+), *Wfs1*-puudulikkusega heterosügootsetel (+/-) ja *Wfs1*-puudulikkusega homosügootsetel (-/-) hiirtel. Igas grupis 7-8 looma.

2.3.5 AMPA geenide ekspressioon oimusagaras

Gria1 ja *Gria2* ekspressioonis statistiliselt olulisi erinevusi oimusagaras metsiktüüpi, heterosügootsete *Wfs1*-puudulikkusega ja homosügootsete *Wfs1*-puudulikkusega hiirte vahel ei tuvastatud. Samuti ei mõjutanud ketamiini manustamine oluliselt *Gria1* ja *Gria2* geenide ekspressiooni mistahes genotüübil võrreldes vastavate kontrollgruppidega. *Gria1* ekspressioon: genotüüp ($F(2,42)=0,663$, $p=0,521$), ketamiini manustamine ($F(1,42)=0,511$, $p=0,479$), genotüüp \times ketamiin ($F(2,42)=0,467$, $p=0,630$). *Gria2* ekspressioon: genotüüp ($F(2,37)=2,802$, $p=0,074$), ketamiini manustamine ($F(1,37)=0,357$, $p=0,554$), genotüüp \times ketamiin ($F(2,37)=0,031$, $p=0,970$) (Joonis 8. A, B).



Joonis 8. *Gria1* (A) ja *Gria2* (B) geenide ekspressiooni muutused oimusagaras peale füsioloogilise lahuse ja ketamiini manustamist metsiktüüpi (+/+), *Wfs1*-puudulikkusega heterosügootsetel (+/-) ja *Wfs1*-puudulikkusega homosügootsetel (-/-) hiirtel. Igas grupis 6-9 looma.

2.3.6 NMDA geenide ekspressioon oimusagaras

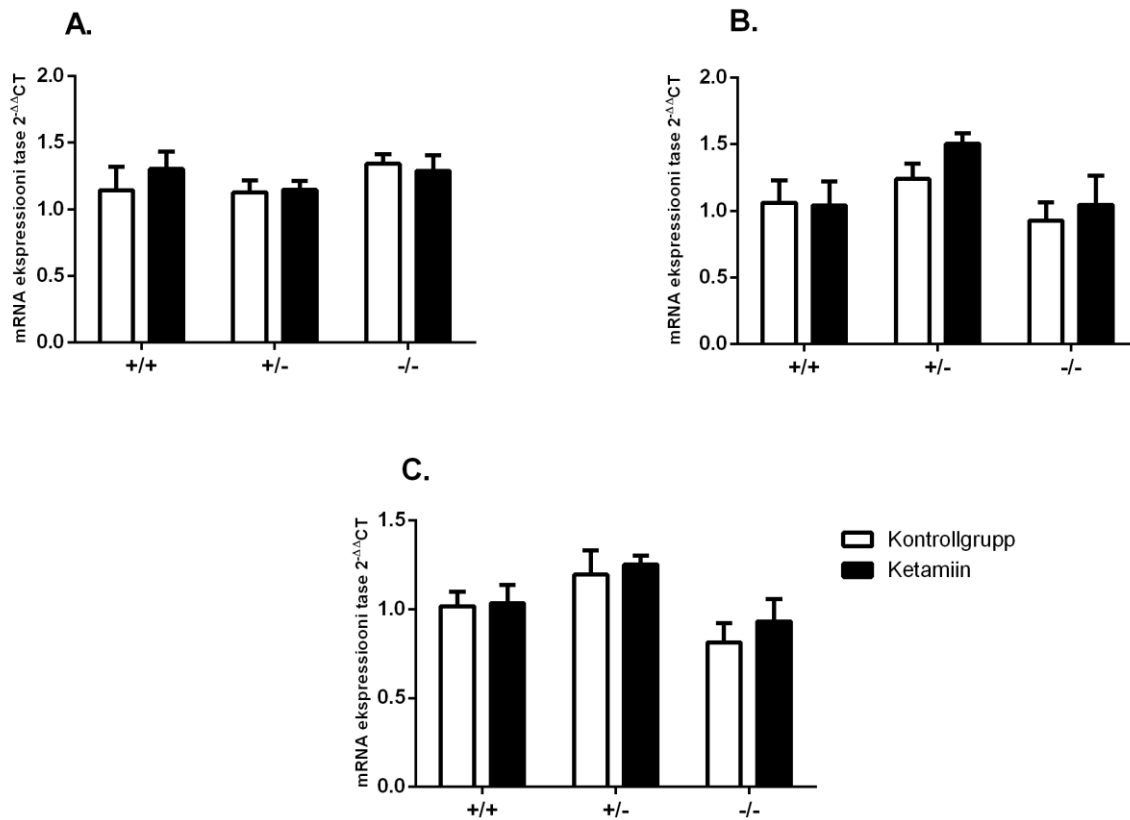
Oimusagaras ei olnud *Grin1* ekspressioonis statistiliselt olulisi erinevusi genotüüpide vahel, samuti ei mõjutanud ketamiini manustamine geeni ekspressiooni: genotüüp ($F(2,39)=1,286$, $p=0,288$), ketamiini manustamine ($F(1,39)=0,215$, $p=0,645$), genotüüp \times ketamiin ($F(2,39)=0,452$, $p=0,640$) (Joonis 9. A).

Kahesuunaline ANOVA tuvastas *Grin2a* ja *Grin2b* geenide ekspressioonis statistiliselt olulise erinevuse genotüüpide vahel ($F(2,38)=3,748$, $p=0,033$ ja $F(2,37)=5,838$, $p=0,006$), kuid Post hoc Tukey HSD test ei tuvastanud statistiliselt olulisi erinevusi. Oimusagaras oli märgata väga väikest

Grin2a ekspressioonitaseme tõusu heterosügootsetel Wfs1-puudulikkusega kontrollgrupi ($F(2,38)=3,748$, $p=0,702$) ja ketamiiniga ($F(2,38)=3,748$, $p=0,268$) süstitud hiirtel võrreldes vastavate gruppide homosügootsete Wfs1-puudulikkusega hiirtega, kuid tulemused polnud statistiliselt olulised. Kontrollgrupi metsiktüüpi hiirtel ei esinenud *Grin2a* ekspressioonis olulisi erinevusi võrreldes sama grupi homosügootsete Wfs1-puudulikkusega ($F(2,38)=3,748$, $p=0,992$) ja heterosügootsete hiirtega ($F(2,38)=3,748$, $p=0,967$). Ketamiiniga süstitud heterosügootsetel Wfs1-puudulikkusega hiirtel oli *Grin2a* ekspressioon natukene tõusnud võrreldes sama grupi metsiktüüpi ($F(2,38)=3,748$, $p=0,286$) ja homosügootsete Wfs1-puudulikkusega pesakaaslastega ($F(2,38)=3,748$, $p=0,268$), kuid tulemused polnud statistiliselt olulised (Joonis 9. B).

Grin2b mRNA ekspressioon oli madalam homosügootsetel kontrollgrupi ($F(2,37)=5,838$, $p=0,130$) ja ketamiiniga ($F(2,37)=5,838$, $p=0,246$) süstitud Wfs1-puudulikkusega hiirtel võrreldes heterosügootsete hiirtega, kuid tulemused ei olnud statistiliselt olulised. Kontrollgrupi ja ketamiiniga süstitud metsiktüüpi hiirte ekspressioonis ei olnud statistiliselt olulisi erinevusi võrreldes vastavate gruppide heterosügootsete ($F(2,37)=5,838$, $p=0,856$ ja $F(2,37)=5,838$, $p=0,717$) ja homosügootsete ($F(2,37)=5,838$, $p=0,796$, ja $F(2,37)=5,838$, $p=0,986$) Wfs1-puudulikkusega pesakaaslastega (Joonis 9. C).

Ketamiin ei mõjutanud oluliselt *Grin2a* ja *Grin2b* geenide ekspressiooni mistahes genotüübil võrreldes vastavate kontrollgruppidega. *Grin2a* ekspressioon: ketamiini manustamine ($F(1,38)=0,905$, $p=0,347$), genotüüp \times ketamiin ($F(2,38)=0,420$, $p=0,660$). *Grin2b* ekspressioon: ketamiini manustamine ($F(1,37)=0,539$, $p=0,468$), genotüüp \times ketamiin ($F(2,37)=0,110$, $p=0,896$) (Joonis 9. A, B, C).



Joonis 9. *Grin1* (A), *Grin2a* (B) ja *Grin2b* (C) geenide ekspressiooni muutused oimusagaras peale füsioloogilise lahuse ja ketamiini manustamist metsiktüüpi (+/+), Wfs1-puudulikkusega heterosügootsetel (+/-) ja Wfs1-puudulikkusega homosügootsetel (-/-) hiirtel. Igas grupis 6-8 looma.

2.4 Arutelu

Käesoleva magistritöö eesmärkideks oli uurida ketamiini mõju Wfs1-puudulikkusega homosügootsetel ja heterosügootsetel hiirtel ning kirjeldada glutamaadi (AMPA ja NMDA) retseptorite geeniekspressiooni 30 minutit peale ketamiini manustamist.

Hiljutises uuringus näidati, et peale ketamiini süstimist (10 mg/kg) vähenes homosügootsetel Wfs1-puudulikkusega hiirtel immobiilsus sabast riputamise katses võrreldes metsiktüüpi ja heterosügootsete pesakaaslastega. Wfs1-puudulikkusega homosügootsed hiired on ketamiini suhtes tundlikumad (Reimets *et al.*, 2016). Kuna ketamiin toimib läbi NMDA retseptori, püüdsime antud magistritöös välja selgitada, kuidas mõjutab ketamiin NMDA ja AMPA retseptorite alaühikute geenide ekspressiooni.

Kliinilised uuringud on näidanud, et märkimisväärselt suur osa Wolframi sündroomiga patsientidest kannatab depressiooni all (Swift *et al.*, 1990). Samuti on näidatud Wfs1-puudulikkusega hiirtel tugevamat toimet antidepressantide (paroksetiin ja imipramiin) manustamisel (Visnapuu *et al.*, 2013b), mistõttu on nad heaks mudeliks depressiooni uurimisel. Ketamiin toimib peamiselt NMDA ja AMPA retseptorite kaudu (Moghaddam *et al.*, 1997). Ühekordne ketamiini annus (0,5 mg/kg) vähendab inimestel kiirelt depressiooni sümptomeid (Berman *et al.*, 2000), mille toime kestab keskmiselt nädala (Zarate *et al.*, 2006). Uuringud on näidanud, et depressiooni põdevatel isikutel on vähenenud NR2A ja NR2B alaühikute tase prefrontaalses koos (Feyissa *et al.*, 2009), samas *locus coeruleus*'es on tõusnud *GRIN1*, *GRIN2A*, *GRIN2B* ja *GRIA2* geenide ekspressioon (Chandley *et al.*, 2014).

Selleks, et välja selgitada, kas ketamiini toime erinevused genotüüpide vahel on seotud AMPA ja NMDA retseptorite alaühikute geenide ekspressiooni muutustega aju erinevates struktuurides teostasime kvantitatiivse reaalaja PCRi uurimaks *Gria1*, *Gria2*, *Grin1*, *Grin2a* ja *Grin2b* geenide ekspressiooni hipokampuses, prefrontaalses koos ja oimusagaras. Võimalikke muutusi geenide ekspressioonis vaatasime homosügootsetel ja heterosügootsetel Wfs1-puudulikkusega hiirtel ning metsiktüüpi hiirtel 30 minutit peale ketamiini manustamist ja kontrollgrupi hiirtel. Aju osadest valisime välja need, kus Wfs1 ekspressiooni tase on kõrgeim ja mis on seotud ka depressiooniga (Luuk *et al.*, 2008; Pandya *et al.*, 2012).

Varasemalt on näidatud, et manustades rottidele ketamiini (10 mg/kg), vähenes immobiilsus sundujumise katses (Burgdorf *et al.*, 2013). Lisaks sellele on näidatud, et ketamiini süstimine vähendas kroonilise stressi mudeli hiirtel immobiilsust sabast riputamise katses. Neil hiirtel oli

märkimisväärselt tõusnud NMDA retseptori NR1 alaühiku ekspressioon ja vähenenud AMPA retseptori GluR1 alaühiku tase prefrontaalses koorest (Tang *et al.*, 2015). Käesolevas töös ei tuvastanud me muutusi *Gria1*, *Grin1*, *Grin2a* ja *Grin2b* geenide ekspressioonis hipokampuses, prefrontaalses kooses ega oimusagaras peale ketamiini manustamist. Erinevusi NMDA retseptorite alaühikute geenide ekspressioonis leidsime hipokampuses füsioloogilist lahust saanud (kontrollgrupi) genotüüpide vahel ning AMPA retseptori *Gria2* geeni ekspressioonis ka peale ketamiini manustamist. Nimelt, tuvastasime hipokampuses interaktsiooni genotüübi ja ketamiini manustamise vahel, kus ketamiin vähendas *Gria2* ekspressiooni metsiktüüpi ja heterosügootsetel Wfs1-puudulikkusega hiirtel, kuid tõstis geeni ekspressiooni Wfs1-puudulikkusega homosügootsetel hiirtel. Baastasemel madalam *Gria2* ekspressiooni tase võib seletada homosügootse Wfs1-puudulikkusega hiire molekulaarset tausta depressiooni mudelina. See tulemus võib osaliselt seletada Wfs1-puudulikkusega homosügootsete hiirte suurenenud tundlikkust ketamiini suhtes, näidates ära, et homosügootsetel Wfs1-puudulikkusega hiirtel võib ketamiini antidepressiivne toime olla vahendatud AMPA retseptori kaudu hipokampuses. Hiljutised uuringud depressiooni mudelina kasutatavatel GABA_A retseptor γ heterosügootsetel hiirtel näitasid GluR2 (*Gria2*) valgu madalamat ekspressiooni taset hipokampuses võrreldes metsiktüüpi hiirtega ja valgu hulk tõusis peale ketamiini (10 mg/kg) manustamist. Sundujumise katsega näidati, et GABA_A γ retseptori puudulikkusega hiirtel on samuti baastasemel immobiilsus võrreldav metsiktüüpi hiirtega, samas ketamiini ühekordne annus vähendab oluliselt immobiilsust (Ren *et al.*, 2016), sarnaselt Wfs1-puudulikkusega hiirte sabast riputamise katsega (Reimets *et al.*, 2016). Hipokampuses NMDA retseptori geenidest oli *Grin1* ekspressioon kontrollgrupi heterosügootsetel Wfs1-puudulikkusega hiirtel kõrgem võrreldes sama grupi homosügootsete hiirtega. Lisaks tõusis kontrollgrupi Wfs1-puudulikkusega heterosügootsetel hiirtel ka *Grin2a* ja *Grin2b* mRNA ekspressioon võrreldes Wfs1-puudulikkusega homosügootsete ja metsiktüüpi hiirtega. Saadud tulemused näitavad baastasemel erinevusi eelkõige hipokampuses, kus on märgatavalt kõrgem NMDA retseptorite alaühikute ekspressioon heterosügootsetel Wfs1-puudulikkusega hiirtel võrreldes metsiktüüpi ja homosügootsete Wfs1-puudulikkusega hiirtega. Prefrontaalses kooses ja oimusagaras ei tuvastatud NMDA ja AMPA retseptori geenide ekspressioonis erinevusi. Prefrontaalne koor on seotud depressiooniga, samuti on näidatud prefrontaalses kooses NMDA ja AMPA retseptorite alaühikute muutusi vastuseks ketamiinile (Burgdorf *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2015). Kuna peamiselt on leitud muutusi valgu tasemel, siis

võib see selgitada miks mRNA tasemel ketamiini toime NMDA ja AMPA retseptorite ekspressioonile prefrontaalses kooses käesolevas katses mõju ei avaldanud.

Antud magistritöös leidsime, et ketamiini manustamine ei avaldanud mõju NMDA retseptorite alaühikute geenide ekspressioonile ja AMPA retseptori alaühiku *Grial* geeni ekspressioonile uuritud ajuosades. Kuigi immobiilsus Wfs1-puudulikkusega homosügootsetel hiirtel vähenes juba 30 minutit peale ketamiini manustamist, võib see olla geeniekspressiooni muutusteks liiga lühike aeg. Samuti võib AMPA ja NMDA retseptorite regulatsioon Wfs1-puudulikkusega hiirtel tuleneda translatsiooni, mitte transkriptsiooni tasemest. On näidatud, et peale ketamiini manustamist on rottidel suurenenud NR2B ja GluR1 valkude ekspressioon hipokampuses ja prefrontaalses kooses, samas mRNA tasemel muutusi ei täheldatud (Burgdorf *et al.*, 2013). Kroonilise stressi mudeli hiirtel tõusis prefrontaalses kooses oluliselt AMPA retseptori GluR1 valgu tase peale ketamiini manustamist (Tang *et al.*, 2015). Seetõttu on edaspidi vajalik uurida muutusi valgu tasemel, sest varasemalt on näidatud muutusi eelkõige NMDA ja AMPA retseptorite alaühikute valgu, mitte mRNA tasemel.

Hipokampuses leidsime kõige suuremaid erinevusi baastasemel, mistõttu võib oletada, et hipokampus mängib olulist rolli depressiooni vahendamisel Wfs1-puudulikkusega hiirtel. Wfs1-puudulikkusega hiirtel tasuks uurida ka BDNF (tserebraalne neurotroofne faktor) ekspressiooni taset. BDNF reguleerib sünaptilist plastilisust ja närviülekanne ning mõjutab närvirakkude proliferatsiooni, kasvu ja diferentseerumist (Bath ja Lee, 2006) ning BDNF vähenemine on seotud depressiooniga (Chen *et al.*, 2001; Karege *et al.*, 2002). Katsed on näidanud, et ketamiiniga süstitud rottidel tõusis hipokampuses BDNF valgu ekspressiooni tase (Garcia *et al.*, 2008). Samuti on näidatud, et depressiooni põdevatel patsientidel tõusis plasma BDNF tase peale ketamiini manustamist (Haile *et al.*, 2014). Seega peale NMDA retseptori blokeerimise ja AMPA retseptori aktivatsiooni võib ketamiini antidepressiivne toime olla seotud BDNF taseme muutustega ajus.

KOKKUVÕTE

Käesolevas töös uurisime ketamiini mõju AMPA ja NMDA retseptorite alaühikute geenide ekspressiooni tasemele hipokampuses, prefrontaalses kooses ja oimusagaras homosügootsetel Wfs1-puudulikkusega, heterosügootsetel Wfs1-puudulikkusega ja metsiktüüpi hiirtel.

Antud töös leidsime erinevusi NMDA retseptorite alaühikute geenide ekspressioonis hipokampuses füsioloogilist lahust saanud (kontrollgrupi) genotüüpide vahel ning AMPA retseptori *Gria2* geeni ekspressioonis ka peale ketamiini manustamist. Peale ketamiini süstimist ei tuvastatud muutusi *Gria1*, *Grin1*, *Grin2a* ja *Grin2b* geenide ekspressioonis hipokampuses, prefrontaalses kooses ja oimusagaras. Hipokampuses esines *Gria2* ekspressioonis interaktsioon genotüübi ja ketamiini manustamise vahel, kus homosügootsetel Wfs1-puudulikkusega hiirtel oli *Gria2* mRNA ekspressioon tõusnud peale ketamiini manustamist, kuid metsiktüüpi ja heterosügootsetel Wfs1-puudulikkusega hiirtel langenud. See tulemus võib olla osaliselt põhjuseks, miks Wfs1-puudulikkusega homosügootsed hiired on ketamiini suhtes tundlikumad võrreldes metsiktüüpi ja heterosügootsete pesakaaslastega. Peale selle oli hipokampuses *Gria2* mRNA ekspressioon kontrollgrupi Wfs1-puudulikkusega homosügootsetel hiirtel madalam võrreldes sama grupi metsiktüüpi hiirtega ja statistiliselt oluliselt madalam võrreldes heterosügootsete pesakaaslastega. Tõusnud oli *Grin1*, *Grin2a* ja *Grin2b* ekspressioon kontrollgrupi Wfs1-puudulikkusega heterosügootsetel hiirtel võrreldes metsiktüüpi ja Wfs1-puudulikkusega homosügootsete hiirtega. *Gria1* geeni ekspressioonis statistiliselt olulisi erinevusi ei olnud. Prefrontaalses kooses ja oimusagaras ei tuvastatud AMPA ja NMDA retseptorite alaühikute geenide ekspressioonis erinevusi.

Kõige suuremaid erinevusi baastasemel leidsime hipokampuses, kus NMDA retseptorite alaühikute ekspressioon oli märgatavalt kõrgem kontrollgrupi heterosügootsetel Wfs1-puudulikkusega hiirtel võrreldes metsiktüüpi ja homosügootsete Wfs1-puudulikkusega hiirtega. Ketamiini manustamine ei mõjutanud NMDA retseptorite alaühikute geenide ja AMPA retseptori alaühiku *Gria1* geeni ekspressiooni uuritud ajuosades. AMPA ja NMDA retseptorite regulatsioon peale ketamiini manustamist Wfs1-puudulikkusega hiirtel võib toimuda translatsiooni tasemel.

Edaspidi tasuks uurida NMDA ja AMPA retseptorite alaühikute muutusi valgu tasemel. Lisaks sellele võiks uurida Wfs1-puudulikkusega hiirtel ka BDNF taset.

Antidepressant effect of ketamine in Wfs1-deficient mice and relation between NMDA and AMPA receptor expression

Agnes Rikk

SUMMARY

Wolfram syndrome is an autosomal recessive disorder caused by mutations in the *WFS1* gene (Strom *et al.*, 1998). Approximately 60% of Wolfram syndrome patients suffer from psychiatric disorders like depression, psychosis, impulsivity and aggression (Swift *et al.*, 1990). Evidence from clinical trials shows that the NMDA antagonist ketamine is a novel antidepressant because it acts rapidly and single infusion of ketamine relieves depressive symptoms in treatment-resistant depressed patients (Berman *et al.*, 2000). Homozygous *Wfs1*-deficient mice are more sensitive to ketamine than heterozygous and wild type littermates (Reimets *et al.*, 2016). It is believed that ketamine action is due to inhibition of NMDA and stimulation of AMPA receptors (Moghaddam *et al.*, 1997).

The goal of the present work was to determine the levels of gene expression of AMPA and NMDA receptor subunits in homozygous *Wfs1*-deficient mice, heterozygous *Wfs1*-deficient mice and wild type littermates. We analyzed the expression levels of *Gria1*, *Gria2*, *Grin1*, *Grin2a* and *Grin2b* in the hippocampus, prefrontal cortex and temporal lobe.

Differences in the gene expression of NMDA receptor subunits in the hippocampus were found in saline treated (control group) genotype and in the AMPA receptor subunit *Gria2* gene after administration of ketamine. After ketamine treatment no changes were found in mRNA expression of *Gria1*, *Grin1*, *Grin2a* and *Grin2b* in hippocampus, prefrontal cortex and temporal lobe. An interaction between genotype and ketamine treatment was found in hippocampus in the expression of *Gria2* gene where in homozygous *Wfs1*-deficient mice the *Gria2* mRNA expression increased after ketamine treatment but in wild type and heterozygous *Wfs1*-deficient mice the expression decreased. This result may be one of the reasons why homozygous *Wfs1*-deficient mice display a greater response towards the antidepressant-like effect of ketamine. Furthermore, mRNA expression of *Gria2* in the hippocampus of the control group of homozygous *Wfs1*-deficient mice was lower compared to wild type mice and statistically significantly lower compared to heterozygous littermates. The expression of *Grin1*, *Grin2a* and *Grin2b* genes increased in control group of heterozygous *Wfs1*-deficient mice compared to control group of wild type and

homozygous *Wfs1*-deficient mice. There were no statistically significant changes in *Grial* gene expression. In prefrontal cortex and temporal lobe there were no statistically significant differences in AMPA and NMDA receptor subunit gene expression.

The biggest differences in the basal level were found in the hippocampus where the NMDA receptor subunit expression was significantly higher in heterozygous *Wfs1*-deficient mice. Ketamine had no effect on the expressions of NMDA receptor subunit genes and AMPA receptor subunit *Grial* gene. The regulation of AMPA and NMDA receptors after the ketamine treatment may occur on translational level.

In the future the changes in protein levels of NDMA and AMPA receptor subunits and BDNF in *Wfs1*-deficient mice could be investigated.

TÄNUAVALDUSED

Sooviksin tänada oma juhendajat Silva Sütti, kes oli antud magistritöö valmimisel igati abivalmis ja andis asjakohaseid nõuandeid. Tänaksin ka oma juhendajat Lilian Kadaja-Saarepuud, kes oli nõus antud tööd juhendama. Eelkõige tahaksin tänada oma juhendajat Alina Altpere, kes oli igati toetav ja suureks abiks andmete analüüsimisel ning kes andis antud magistritööle viimase lihvi.

Lisaks sellele suur tänu füsioloogia osakonna personalile abivalmiduse eest.

Tahaksin tänada ka oma elukaaslast ja perekonda, kes on minu õpinguid igati toetanud.

KASUTATUD KIRJANDUS

aan het Rot, M., Collins, K. A., Murrrough, J. W., Perez, A. M., Reich, D. L., Charney, D. S. ja Mathew, S. J. (2010). Safety and efficacy of repeated-dose intravenous ketamine for treatment-resistant depression. *Biol Psychiatry* 67(2): 139-145.

Al-Hallaq, R. A., Jarabek, B. R., Fu, Z., Vicini, S., Wolfe, B. B. ja Yasuda, R. P. (2002). Association of NR3A with the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 and NR2 subunits. *Mol Pharmacol* 62(5): 1119-1127.

Andersson, O., Stenqvist, A., Attersand, A. ja von Euler, G. (2001). Nucleotide sequence, genomic organization, and chromosomal localization of genes encoding the human NMDA receptor subunits NR3A and NR3B. *Genomics* 78(3): 178-184.

Anson, L. C., Chen, P. E., Wyllie, D. J., Colquhoun, D. ja Schoepfer, R. (1998). Identification of amino acid residues of the NR2A subunit that control glutamate potency in recombinant NR1/NR2A NMDA receptors. *J Neurosci* 18(2): 581-589.

Barrett, T. G. ja Bunday, S. E. (1997). Wolfram (DIDMOAD) syndrome. *J Med Genet* 34(10): 838-841.

Barrett, T. G., Bunday, S. E. ja Macleod, A. F. (1995). Neurodegeneration and diabetes: UK nationwide study of Wolfram (DIDMOAD) syndrome. *Lancet* 346(8988): 1458-1463.

Bath, K. G. ja Lee, F. S. (2006). Variant BDNF (Val66Met) impact on brain structure and function. *Cogn Affect Behav Neurosci* 6(1): 79-85.

Bendel, O., Meijer, B., Hurd, Y. ja von Euler, G. (2005). Cloning and expression of the human NMDA receptor subunit NR3B in the adult human hippocampus. *Neurosci Lett* 377(1): 31-36.

Bennett, M. V., Pellegrini-Giampietro, D. E., Gorter, J. A., Aronica, E., Connor, J. A. ja Zukin, R. S. (1996). The GluR2 hypothesis: Ca(++)-permeable AMPA receptors in delayed neurodegeneration. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 61: 373-384.

Berman, R. M., Cappiello, A., Anand, A., Oren, D. A., Heninger, G. R., Charney, D. S. ja Krystal, J. H. (2000). Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biol Psychiatry* 47(4): 351-354.

Burgdorf, J., Zhang, X. L., Nicholson, K. L., Balster, R. L., Leander, J. D., Stanton, P. K., Gross, A. L., Kroes, R. A. ja Moskal, J. R. (2013). GLYX-13, a NMDA receptor glycine-site functional partial agonist, induces antidepressant-like effects without ketamine-like side effects. *Neuropsychopharmacology* 38(5): 729-742.

Chandley, M. J., Szebeni, A., Szebeni, K., Crawford, J. D., Stockmeier, C. A., Turecki, G., Kostrzewa, R. M. ja Ordway, G. A. (2014). Elevated gene expression of glutamate receptors in noradrenergic neurons from the locus coeruleus in major depression. *Int J Neuropsychopharmacol* 17(10): 1569-1578.

Chen, B., Dowlathshahi, D., MacQueen, G. M., Wang, J. F. ja Young, L. T. (2001). Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. *Biol Psychiatry* 50(4): 260-265.

Ciabarra, A. M., Sullivan, J. M., Gahn, L. G., Pecht, G., Heinemann, S. ja Sevarino, K. A. (1995). Cloning and characterization of chi-1: a developmentally regulated member of a novel class of the ionotropic glutamate receptor family. *J Neurosci* 15(10): 6498-6508.

Clements, J. D. ja Westbrook, G. L. (1991). Activation kinetics reveal the number of glutamate and glycine binding sites on the N-methyl-D-aspartate receptor. *Neuron* 7(4): 605-613.

Collier, D. A., Barrett, T. G., Curtis, D., Macleod, A., Arranz, M. J., Maassen, J. A. ja Bunde, S. (1996). Linkage of Wolfram syndrome to chromosome 4p16.1 and evidence for heterogeneity. *Am J Hum Genet* 59(4): 855-863.

Fagg, G. E. (1987). Phencyclidine and related drugs bind to the activated N-methyl-D-aspartate receptor-channel complex in rat brain membranes. *Neurosci Lett* 76(2): 221-227.

Feyissa, A. M., Chandran, A., Stockmeier, C. A. ja Karolewicz, B. (2009). Reduced levels of NR2A and NR2B subunits of NMDA receptor and PSD-95 in the prefrontal cortex in major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 33(1): 70-75.

Garcia, L. S., Comim, C. M., Valvassori, S. S., Reus, G. Z., Barbosa, L. M., Andreazza, A. C., Stertz, L., Fries, G. R., Gavioli, E. C., Kapczinski, F. ja Quevedo, J. (2008). Acute administration of ketamine induces antidepressant-like effects in the forced swimming test and increases BDNF levels in the rat hippocampus. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32(1): 140-144.

Grigorenko, E., Glazier, S., Bell, W., Tytell, M., Nosel, E., Pons, T. ja Deadwyler, S. A. (1997). Changes in glutamate receptor subunit composition in hippocampus and cortex in patients with refractory epilepsy. *J Neurol Sci* 153(1): 35-45.

Haile, C. N., Murrugh, J. W., Iosifescu, D. V., Chang, L. C., Al Jurdi, R. K., Foulkes, A., Iqbal, S., Mahoney, J. J., 3rd, De La Garza, R., 2nd, Charney, D. S., Newton, T. F. ja Mathew, S. J. (2014). Plasma brain derived neurotrophic factor (BDNF) and response to ketamine in treatment-resistant depression. *Int J Neuropsychopharmacol* 17(2): 331-336.

Hofmann, S., Philbrook, C., Gerbitz, K. D. ja Bauer, M. F. (2003). Wolfram syndrome: structural and functional analyses of mutant and wild-type wolframin, the WFS1 gene product. *Hum Mol Genet* 12(16): 2003-2012.

Hollmann, M., Hartley, M. ja Heinemann, S. (1991). Ca²⁺ permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science* 252(5007): 851-853.

Hollmann, M., O'Shea-Greenfield, A., Rogers, S. W. ja Heinemann, S. (1989). Cloning by functional expression of a member of the glutamate receptor family. *Nature* 342(6250): 643-648.

Inoue, H., Tanizawa, Y., Wasson, J., Behn, P., Kalidas, K., Bernal-Mizrachi, E., Mueckler, M., Marshall, H., Donis-Keller, H., Crock, P., Rogers, D., Mikuni, M., Kumashiro, H., Higashi, K.,

Sobue, G., Oka, Y. ja Permutt, M. A. (1998). A gene encoding a transmembrane protein is mutated in patients with diabetes mellitus and optic atrophy (Wolfram syndrome). *Nat Genet* 20(2): 143-148.

Ishihara, H., Takeda, S., Tamura, A., Takahashi, R., Yamaguchi, S., Takei, D., Yamada, T., Inoue, H., Soga, H., Katagiri, H., Tanizawa, Y. ja Oka, Y. (2004). Disruption of the WFS1 gene in mice causes progressive beta-cell loss and impaired stimulus-secretion coupling in insulin secretion. *Hum Mol Genet* 13(11): 1159-1170.

Ishii, T., Moriyoshi, K., Sugihara, H., Sakurada, K., Kadotani, H., Yokoi, M., Akazawa, C., Shigemoto, R., Mizuno, N. ja Masu, M. (1993). Molecular characterization of the family of the N-methyl-D-aspartate receptor subunits. *Journal of Biological Chemistry* 268(4): 2836-2843.

Karasik, A., O'Hara, C., Srikanta, S., Swift, M., Soeldner, J. S., Kahn, C. R. ja Herskowitz, R. D. (1989). Genetically programmed selective islet beta-cell loss in diabetic subjects with Wolfram's syndrome. *Diabetes Care* 12(2): 135-138.

Karege, F., Perret, G., Bondolfi, G., Schwald, M., Bertschy, G. ja Aubry, J. M. (2002). Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients. *Psychiatry Res* 109(2): 143-148.

Keinanen, K., Wisden, W., Sommer, B., Werner, P., Herb, A., Verdoorn, T. A., Sakmann, B. ja Seeburg, P. H. (1990). A family of AMPA-selective glutamate receptors. *Science* 249(4968): 556-560.

Kew, J. N. ja Kemp, J. A. (2005). Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology (Berl)* 179(1): 4-29.

Kinsley, B. T., Swift, M., Dumont, R. H. ja Swift, R. G. (1995). Morbidity and mortality in the Wolfram syndrome. *Diabetes Care* 18(12): 1566-1570.

Koido, K., Koks, S., Nikopensius, T., Maron, E., Altmae, S., Heinaste, E., Vabrit, K., Tammekivi, V., Hallast, P., Kurg, A., Shlik, J., Vasar, V., Metspalu, A. ja Vasar, E. (2005). Polymorphisms in

wolframin (WFS1) gene are possibly related to increased risk for mood disorders. *Int J Neuropsychopharmacol* 8(2): 235-244.

Koike, H., Iijima, M. ja Chaki, S. (2011). Involvement of AMPA receptor in both the rapid and sustained antidepressant-like effects of ketamine in animal models of depression. *Behav Brain Res* 224(1): 107-111.

Kuryatov, A., Laube, B., Betz, H. ja Kuhse, J. (1994). Mutational analysis of the glycine-binding site of the NMDA receptor: structural similarity with bacterial amino acid-binding proteins. *Neuron* 12(6): 1291-1300.

Lakhan, S. E., Caro, M. ja Hadzimechalis, N. (2013). NMDA Receptor Activity in Neuropsychiatric Disorders. *Front Psychiatry* 4: 52.

Laube, B., Hirai, H., Sturgess, M., Betz, H. ja Kuhse, J. (1997). Molecular determinants of agonist discrimination by NMDA receptor subunits: analysis of the glutamate binding site on the NR2B subunit. *Neuron* 18(3): 493-503.

Livak, K. J. ja Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. *Methods* 25(4): 402-408.

Loftis, J. M. ja Janowsky, A. (2003). The N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2B: localization, functional properties, regulation, and clinical implications. *Pharmacol Ther* 97(1): 55-85.

Luuk, H., Koks, S., Plaas, M., Hannibal, J., Rehfeld, J. F. ja Vasar, E. (2008). Distribution of Wfs1 protein in the central nervous system of the mouse and its relation to clinical symptoms of the Wolfram syndrome. *J Comp Neurol* 509(6): 642-660.

Luuk, H., Plaas, M., Raud, S., Innos, J., Sutt, S., Lasner, H., Abramov, U., Kurrikoff, K., Koks, S. ja Vasar, E. (2009). Wfs1-deficient mice display impaired behavioural adaptation in stressful environment. *Behav Brain Res* 198(2): 334-345.

MacDermott, A. B., Mayer, M. L., Westbrook, G. L., Smith, S. J. ja Barker, J. L. (1986). NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones. *Nature* 321(6069): 519-522.

Maeng, S., Zarate, C. A., Jr., Du, J., Schloesser, R. J., McCammon, J., Chen, G. ja Manji, H. K. (2008). Cellular mechanisms underlying the antidepressant effects of ketamine: role of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptors. *Biol Psychiatry* 63(4): 349-352.

Matsuda, K., Fletcher, M., Kamiya, Y. ja Yuzaki, M. (2003). Specific assembly with the NMDA receptor 3B subunit controls surface expression and calcium permeability of NMDA receptors. *J Neurosci* 23(31): 10064-10073.

Matsuda, K., Kamiya, Y., Matsuda, S. ja Yuzaki, M. (2002). Cloning and characterization of a novel NMDA receptor subunit NR3B: a dominant subunit that reduces calcium permeability. *Brain Res Mol Brain Res* 100(1-2): 43-52.

Matto, V., Terasmaa, A., Vasar, E. ja Koks, S. (2011). Impaired striatal dopamine output of homozygous *Wfs1* mutant mice in response to [K⁺] challenge. *J Physiol Biochem* 67(1): 53-60.

Mayer, M. L. ja Armstrong, N. (2004). Structure and function of glutamate receptor ion channels. *Annu Rev Physiol* 66: 161-181.

McCullumsmith, R. E., Kristiansen, L. V., Beneyto, M., Scarr, E., Dean, B. ja Meador-Woodruff, J. H. (2007). Decreased NR1, NR2A, and SAP102 transcript expression in the hippocampus in bipolar disorder. *Brain Res* 1127(1): 108-118.

Messer, M., Haller, I. V., Larson, P., Pattison-Crisostomo, J. ja Gessert, C. E. (2010). The use of a series of ketamine infusions in two patients with treatment-resistant depression. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 22(4): 442-444.

Miller, O. H., Yang, L., Wang, C. C., Hargroder, E. A., Zhang, Y., Delpire, E. ja Hall, B. J. (2014). GluN2B-containing NMDA receptors regulate depression-like behavior and are critical for the rapid antidepressant actions of ketamine. *Elife* 3: e03581.

Moghaddam, B., Adams, B., Verma, A. ja Daly, D. (1997). Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: a novel step in the pathway from NMDA receptor blockade to dopaminergic and cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex. *J Neurosci* 17(8): 2921-2927.

Monyer, H., Seeburg, P. H. ja Wisden, W. (1991). Glutamate-operated channels: developmentally early and mature forms arise by alternative splicing. *Neuron* 6(5): 799-810.

Monyer, H., Sprengel, R., Schoepfer, R., Herb, A., Higuchi, M., Lomeli, H., Burnashev, N., Sakmann, B. ja Seeburg, P. H. (1992). Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science* 256(5060): 1217-1221.

Moriyoshi, K., Masu, M., Ishii, T., Shigemoto, R., Mizuno, N. ja Nakanishi, S. (1991). Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature* 354(6348): 31-37.

Murrough, J. W., Iosifescu, D. V., Chang, L. C., Al Jurdi, R. K., Green, C. E., Perez, A. M., Iqbal, S., Pillemer, S., Foulkes, A., Shah, A., Charney, D. S. ja Mathew, S. J. (2013). Antidepressant efficacy of ketamine in treatment-resistant major depression: a two-site randomized controlled trial. *Am J Psychiatry* 170(10): 1134-1142.

Nakanishi, N., Shneider, N. A. ja Axel, R. (1990). A family of glutamate receptor genes: evidence for the formation of heteromultimeric receptors with distinct channel properties. *Neuron* 5(5): 569-581.

Niciu, M. J., Ionescu, D. F., Richards, E. M. ja Zarate, C. A., Jr. (2014). Glutamate and its receptors in the pathophysiology and treatment of major depressive disorder. *J Neural Transm (Vienna)* 121(8): 907-924.

Niciu, M. J., Kelmendi, B. ja Sanacora, G. (2012). Overview of glutamatergic neurotransmission in the nervous system. *Pharmacol Biochem Behav* 100(4): 656-664.

Nishi, M., Hinds, H., Lu, H. P., Kawata, M. ja Hayashi, Y. (2001). Motoneuron-specific expression of NR3B, a novel NMDA-type glutamate receptor subunit that works in a dominant-negative manner. *J Neurosci* 21(23): RC185.

Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A. ja Prochiantz, A. (1984). Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 307(5950): 462-465.

Nowak, L. M. ja Wright, J. M. (1992). Slow voltage-dependent changes in channel open-state probability underlie hysteresis of NMDA responses in Mg(2+)-free solutions. *Neuron* 8(1): 181-187.

O'Shaughnessy, C. T. ja Lodge, D. (1988). N-methyl-D-aspartate receptor-mediated increase in intracellular calcium is reduced by ketamine and phencyclidine. *Eur J Pharmacol* 153(2-3): 201-209.

Palmer, C. L., Cotton, L. ja Henley, J. M. (2005). The molecular pharmacology and cell biology of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors. *Pharmacol Rev* 57(2): 253-277.

Pandya, M., Altinay, M., Malone, D. A., Jr. ja Anand, A. (2012). Where in the brain is depression? *Curr Psychiatry Rep* 14(6): 634-642.

Raud, S., Reimets, R., Loomets, M., Sütt, S., Altpere, A., Visnapuu, T., Innos, J., Luuk, H., Plaas, M. ja Volke, V. (2015). Deletion of the Wolfram syndrome-related gene *Wfs1* results in increased sensitivity to ethanol in female mice. *Neuropharmacology* 95: 59-67.

Raud, S., Sütt, S., Luuk, H., Plaas, M., Innos, J., Koks, S. ja Vasar, E. (2009). Relation between increased anxiety and reduced expression of $\alpha 1$ and $\alpha 2$ subunits of GABA(A) receptors in *Wfs1*-deficient mice. *Neurosci Lett* 460(2): 138-142.

Reimets, R., Raud, S., Loomets, M., Visnapuu, T., Volke, V., Reimets, A., Plaas, M. ja Vasar, E. (2016). Variability in the effect of antidepressants upon *Wfs1*-deficient mice is dependent on the drugs' mechanism of actions. *Behav Brain Res* 308: 53-63.

Ren, Z., Pribiag, H., Jefferson, S. J., Shorey, M., Fuchs, T., Stellwagen, D. ja Luscher, B. (2016). Bidirectional Homeostatic Regulation of a Depression-Related Brain State by Gamma-Aminobutyric Acidergic Deficits and Ketamine Treatment. *Biol Psychiatry*.

Riggs, A. C., Bernal-Mizrachi, E., Ohsugi, M., Wasson, J., Fatrai, S., Welling, C., Murray, J., Schmidt, R. E., Herrera, P. L. ja Permutt, M. A. (2005). Mice conditionally lacking the Wolfram gene in pancreatic islet beta cells exhibit diabetes as a result of enhanced endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Diabetologia* 48(11): 2313-2321.

Rosenmund, C., Stern-Bach, Y. ja Stevens, C. F. (1998). The tetrameric structure of a glutamate receptor channel. *Science* 280(5369): 1596-1599.

Sanacora, G., Gueorguieva, R., Epperson, C. N., Wu, Y. T., Appel, M., Rothman, D. L., Krystal, J. H. ja Mason, G. F. (2004). Subtype-specific alterations of gamma-aminobutyric acid and glutamate in patients with major depression. *Arch Gen Psychiatry* 61(7): 705-713.

Sato, K., Kiyama, H. ja Tohyama, M. (1993). The differential expression patterns of messenger RNAs encoding non-N-methyl-D-aspartate glutamate receptor subunits (GluR1-4) in the rat brain. *Neuroscience* 52(3): 515-539.

Schorge, S. ja Colquhoun, D. (2003). Studies of NMDA receptor function and stoichiometry with truncated and tandem subunits. *J Neurosci* 23(4): 1151-1158.

Song, I. ja Huganir, R. L. (2002). Regulation of AMPA receptors during synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 25(11): 578-588.

Stephenson, F. A. (2001). Subunit characterization of NMDA receptors. *Curr Drug Targets* 2(3): 233-239.

Strom, T. M., Hortnagel, K., Hofmann, S., Gekeler, F., Scharfe, C., Rabl, W., Gerbitz, K. D. ja Meitinger, T. (1998). Diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy and deafness (DIDMOAD) caused by mutations in a novel gene (wolframin) coding for a predicted transmembrane protein. *Hum Mol Genet* 7(13): 2021-2028.

Sucher, N. J., Akbarian, S., Chi, C. L., Leclerc, C. L., Awobuluyi, M., Deitcher, D. L., Wu, M. K., Yuan, J. P., Jones, E. G. ja Lipton, S. A. (1995). Developmental and regional expression pattern of a novel NMDA receptor-like subunit (NMDAR-L) in the rodent brain. *J Neurosci* 15(10): 6509-6520.

Swift, M. ja Swift, R. G. (2000). Psychiatric disorders and mutations at the Wolfram syndrome locus. *Biol Psychiatry* 47(9): 787-793.

Swift, M. ja Swift, R. G. (2005). Wolframin mutations and hospitalization for psychiatric illness. *Mol Psychiatry* 10(8): 799-803.

Swift, R. G., Sadler, D. B. ja Swift, M. (1990). Psychiatric findings in Wolfram syndrome homozygotes. *Lancet* 336(8716): 667-669.

Takai, H., Katayama, K., Uetsuka, K., Nakayama, H. ja Doi, K. (2003). Distribution of N-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs) in the developing rat brain. *Exp Mol Pathol* 75(1): 89-94.

Takeda, K., Inoue, H., Tanizawa, Y., Matsuzaki, Y., Oba, J., Watanabe, Y., Shinoda, K. ja Oka, Y. (2001). WFS1 (Wolfram syndrome 1) gene product: predominant subcellular localization to endoplasmic reticulum in cultured cells and neuronal expression in rat brain. *Hum Mol Genet* 10(5): 477-484.

Takei, D., Ishihara, H., Yamaguchi, S., Yamada, T., Tamura, A., Katagiri, H., Maruyama, Y. ja Oka, Y. (2006). WFS1 protein modulates the free Ca(2+) concentration in the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett* 580(24): 5635-5640.

Tang, J., Xue, W., Xia, B., Ren, L., Tao, W., Chen, C., Zhang, H., Wu, R., Wang, Q., Wu, H., Duan, J. ja Chen, G. (2015). Involvement of normalized NMDA receptor and mTOR-related signaling in rapid antidepressant effects of Yueju and ketamine on chronically stressed mice. *Sci Rep* 5: 13573.

Tang, Y. P., Wang, H., Feng, R., Kyin, M. ja Tsien, J. Z. (2001). Differential effects of enrichment on learning and memory function in NR2B transgenic mice. *Neuropharmacology* 41(6): 779-790.

Ulbrich, M. H. ja Isacoff, E. Y. (2008). Rules of engagement for NMDA receptor subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(37): 14163-14168.

Visnapuu, T., Plaas, M., Reimets, R., Raud, S., Terasmaa, A., Koks, S., Sutt, S., Luuk, H., Hundahl, C. A., Eskla, K. L., Altpere, A., Altoa, A., Harro, J. ja Vasar, E. (2013a). Evidence for impaired function of dopaminergic system in *Wfs1*-deficient mice. *Behav Brain Res* 244: 90-99.

Visnapuu, T., Raud, S., Loomets, M., Reimets, R., Sutt, S., Luuk, H., Plaas, M., Koks, S., Volke, V., Altoa, A., Harro, J. ja Vasar, E. (2013b). *Wfs1*-deficient mice display altered function of serotonergic system and increased behavioral response to antidepressants. *Front Neurosci* 7: 132.

Wenthold, R. J., Yokotani, N., Doi, K. ja Wada, K. (1992). Immunochemical characterization of the non-NMDA glutamate receptor using subunit-specific antibodies. Evidence for a hetero-oligomeric structure in rat brain. *J Biol Chem* 267(1): 501-507.

Wenzel, A., Fritschy, J. M., Mohler, H. ja Benke, D. (1997). NMDA receptor heterogeneity during postnatal development of the rat brain: differential expression of the NR2A, NR2B, and NR2C subunit proteins. *J Neurochem* 68(2): 469-478.

Wenzel, A., Villa, M., Mohler, H. ja Benke, D. (1996). Developmental and regional expression of NMDA receptor subtypes containing the NR2D subunit in rat brain. *J Neurochem* 66(3): 1240-1248.

Wolfram, D. J. ja Wagner, H. P. (1938). Diabetes mellitus and simple optic atrophy among siblings: report of four cases. *Mayo Clin Proc* 13: 715-718.

Yamada, T., Ishihara, H., Tamura, A., Takahashi, R., Yamaguchi, S., Takei, D., Tokita, A., Satake, C., Tashiro, F., Katagiri, H., Aburatani, H., Miyazaki, J. ja Oka, Y. (2006). *WFS1*-deficiency increases endoplasmic reticulum stress, impairs cell cycle progression and triggers the apoptotic pathway specifically in pancreatic beta-cells. *Hum Mol Genet* 15(10): 1600-1609.

Yao, Y. ja Mayer, M. L. (2006). Characterization of a soluble ligand binding domain of the NMDA receptor regulatory subunit NR3A. *J Neurosci* 26(17): 4559-4566.

Zarate, C. A., Jr., Singh, J. B., Carlson, P. J., Brutsche, N. E., Ameli, R., Luckenbaugh, D. A., Charney, D. S. ja Manji, H. K. (2006). A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. *Arch Gen Psychiatry* 63(8): 856-864.

Zito, K. ja Scheuss, V. (2009). NMDA receptor function and physiological modulation. *Encyclopedia of neuroscience* 6: 1157-1164.

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Agnes Rikk (sünnikuupäev: 24.05.1992)

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

Ketamiini antidepressiivne toime Wfs1-puudulikkusega hiirtel ja seos NMDA ja AMPA retseptorite ekspressiooniga,

mille juhendajad on Silva Sütt, Alina Altpere ja Lilian Kadaja-Saarepuu,

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
 3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 27.05.2016