

KUDOKSEN PLASMINOGEENIAKTIVAATTORI MAHDOLLISENA
MASENNUSLÄÄKKEIDEN HERMOKASVUTEKIJÄVAIKUTUSTEN
VÄLITTÄJÄNÄ

Hanna Antila
Helsingin yliopisto
Farmasian tiedekunta
Farmakologian ja toksikologian osasto

Toukokuu 2012

Tiedekunta – Fakultet – Faculty Farmasian tiedekunta		Osasto – Sektion – Department Farmakologian ja toksikologian osasto	
Tekijä – Författare – Author Hanna Antila			
Työn nimi – Arbetets titel – Title Kudoksen plasminogeeniaktivaattori mahdollisena masennuslääkkeiden hermokasvutekijävaikutusten välittäjänä			
Oppiaine – Läroämne – Subject Farmakologia			
Työn laji – Arbetets art – Level Pro Gradu		Aika – Datum – Month and year Toukokuu 2012	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages 60
Tiivistelmä – Referat – Abstract Kudoksen plasminogeeniaktivaattori (tPA) on seriiniproteaasi, jonka merkittävin substraatti on plasminogeeni. tPA muuttaa plasminogeenin aktiiviseksi plasmiiniksi. Plasmiini pilkkoo verihyytymää koossa pitävää fibriniä, ja tPA onkin parhaiten tunnettu roolistaan fibrinolyttisessä järjestelmässä. tPA:n vaikutukset eivät kuitenkaan ole rajoittuneet fibrinolyttiseen järjestelmään, vaan se osallistuu esimerkiksi keskushermoston toimintaan. tPA:ta esiintyy useilla aivoalueilla ja sen toimintaa säätelee hermoston aktiivisuus. tPA ja plasmiini osallistuvat hermoston muovautuvuuteen vaikuttamalla aivoperäisen hermokasvutekijän (BDNF) prosessointiin sekä soluväliaineen proteiinien pilkkomiseen. Plasmiini muodostaa BDNF:n esiasteesta kypsää BDNF:ä, joka toimii TrkB-hermokasvutekijäreseptorin ligandina. TrkB-reseptori osallistuu mm. hermosolujen selviytymisen ja hermosoluyhteyksien voimakkuuden säätelyyn. Aivojen muovautuvuuden voimistuminen on liitetty masennuslääkkeiden terapeuttisten vaikutusten ilmenemiseen. Masennuslääkkeet aktivoivat TrkB-reseptoria ja lisäävät BDNF:n määrää jyräjän aivoissa ja niiden aikaansaamat muovautuvuuden muutokset tapahtuvat ainakin osittain BDNF:n vaikutuksesta. Tarkalleen ei kuitenkaan tiedetä, miten masennuslääkkeiden hermokasvutekijävaikutukset välittyvät. Koska tPA:lla on merkittävä rooli BDNF:n prosessoinnissa, se voi mahdollisesti osallistua masennuslääkkeiden hermokasvutekijävaikutusten välittämiseen. Masennuslääkkeiden vaikutuksia tPA:in on aiemmin tutkittu lähinnä verenkierrossa. Tämän pro gradu –tutkielman kokeellisen osuuden tarkoituksena oli selvittää masennuslääke fluoksetiinin vaikutuksia tPA:n aktiivisuuteen ja proteiinimäärään hiiren hippokampuksessa. Lisäksi tutkittiin fluoksetiinin vaikutuksia BDNF-TrkB-signaalointiin. Kokeessa fluoksetiinia annosteltiin hiirille akuutisti (30 mg/kg, i.p., 1 h) tai kolmen viikon ajan (0,08 mg/ml juomavedessä). Hippokampuksen tPA-aktiivisuutta tutkittiin SDS-PAGE- ja <i>in situ</i> -tsymografialla. Western blot -menetelmää käytettiin TrkB-reseptorin aktivaation sekä tPA- ja BDNF-proteiinitasojen määrittämiseen. BDNF-proteiinitasot määritettiin myös ELISA-menetelmällä. Akuutti fluoksetiinikäsittely ei aiheuttanut muutoksia tPA:n aktiivisuudessa eikä BDNF:n proteiinimäärässä. TrkB-reseptorin aktiivisuus oli kuitenkin lisääntynyt fluoksetiiniryhmän hiirillä. Tämän tutkimuksen tulokset tukevatkin äskettäin julkaistua havaintoa, jonka mukaan masennuslääkkeiden aikaansaama nopea TrkB-reseptorin aktivoituminen tapahtuu BDNF:stä riippumattomasti. Krooninen fluoksetiinikäsittely lisäsi hippokampuksen BDNF-proteiinin määrää merkitsevästi kontrollikäsittelyyn verrattuna. Tämä muutos ei kuitenkaan johtanut lisääntyneeseen TrkB-reseptorin aktiivisuuteen. tPA:n aktiivisuudessa ei havaittu muutoksia kroonisen fluoksetiinikäsittelyn vaikutuksesta, mikä viittaisi siihen, että BDNF-proteiinimäärän lisääntyminen ei tapahdu tPA:n välityksellä. tPA-vasta-aine tunnisti kolme molekyyliä painoltaan hieman erilaista proteiinia western blot -menetelmässä. Akuutti fluoksetiinikäsittely vaikutti kyseisten proteiinien määrään, mutta jatkotutkimuksia tarvitaan proteiinien tunnistamiseksi sekä ilmiön merkityksen selvittämiseksi. Tämän tutkimuksen tulosten perusteella akuutti tai krooninen fluoksetiinikäsittely ei vaikuta tPA:n aktiivisuuteen hiiren hippokampuksessa. tPA:n aktiivisuuden on kuitenkin havaittu lisääntyvän hippokampuksessa virikkeellisessä ympäristössä, jolla on samankaltaisia hermokasvutekijävaikutuksia kuin kroonisella fluoksetiinikäsittelyllä. Tämän vuoksi etenkin kroonisen fluoksetiinikäsittelyn vaikutus tPA:n aktiivisuuteen olisi syytä varmistaa.			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords tPA, BDNF, TrkB, muovautuvuus, fluoksetiini			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Farmakologian ja toksikologian osasto			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information Tomi Rantamäki, FaT, Neurotieteen tutkimuskeskus, Helsingin yliopisto Raimo Tuominen, Prof., Farmasian tiedekunta, Helsingin yliopisto			

Tiedekunta – Fakultet – Faculty Faculty of Pharmacy		Osasto – Sektion – Department Division of Pharmacology and Toxicology	
Tekijä – Författare – Author Hanna Antila			
Työn nimi – Arbetets titel – Title Tissue plasminogen activator (tPA) as a potential mediator of neurotrophic effects of antidepressant drugs			
Oppiaine – Läroämne – Subject Pharmacology			
Työn laji – Arbetets art – Level Master's thesis		Aika – Datum – Month and year May 2012	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages 60
Tiivistelmä – Referat – Abstract <p>Tissue plasminogen activator (tPA) is a serine protease that cleaves the inactive plasminogen to a broad-spectrum protease plasmin. Plasmin is involved in the degradation of blood clots by breaking down the fibrin network. In addition to its role in the fibrinolytic system, tPA participates in the functions of the central nervous system. tPA is expressed in several brain areas and has been shown to be involved in neuronal plasticity. tPA's effects on brain plasticity are mediated in part via degradation of extracellular matrix proteins, but mainly via processing of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). Plasmin cleaves pro-BDNF into BDNF that serves as primary endogenous ligand for TrkB neurotrophin receptor. TrkB signalling is strongly associated with the regulation of neuronal plasticity such as neurogenesis, synaptogenesis and long-term potentiation (LTP). On the contrary, pro-BDNF binds and activates p75 neurotrophin receptor that regulates many distinct, even opposite, effects on neuronal plasticity such as long-term depression and synapse retraction.</p> <p>Enhancement of brain plasticity is considered to be important for the therapeutic effects of antidepressant drugs and this is at least partially mediated via BDNF. Antidepressants activate TrkB receptors and increase BDNF protein levels in the rodent brain but the mechanism behind this remains obscure. Given that tPA is an important factor in the processing of BDNF, it is a possible mediator for antidepressants' neurotrophic effects. The effects of antidepressants on tPA activity have been previously studied only in the blood circulatory system. The aim of the experimental part of this Master's thesis was to examine the effects of antidepressant fluoxetine on tPA activity and protein levels in mouse hippocampus. Also the effects of fluoxetine on BDNF-TrkB signalling were studied. Fluoxetine was administered to mice acutely (30 mg/kg, i.p., 1 h) and chronically (0,08 mg/ml in drinking water, 3 weeks). tPA activity was studied using SDS-PAGE – and <i>in situ</i>-zymographies. TrkB activation, tPA and BDNF protein levels were measured using western blot. BDNF protein levels were also examined with ELISA method. No changes in tPA activity were found after acute fluoxetine treatment. In line with this result is the observation that also the BDNF levels remained unchanged. However, TrkB receptor activity was increased in fluoxetine treated mice. It seems possible that BDNF is not involved in the TrkB activation caused by acute fluoxetine treatment. Chronic fluoxetine treatment caused a significant increase in the BDNF protein levels compared to water-drinking control mice. This was not, however, associated with significant changes in TrkB activity. No changes in tPA activity were observed, which suggests that tPA is not involved in the increase of BDNF levels after chronic fluoxetine treatment. Interestingly, tPA antibody detected three distinct proteins in western blot of whose levels acute fluoxetine treatment regulated. However, more studies are needed to identify these proteins and to reveal the significance of such an effect of fluoxetine. According to this study, neither acute nor chronic fluoxetine treatment affects tPA activity in mouse hippocampus. However, environmental enrichment has been shown to enhance tPA activity and produce similar neurotrophic effects as chronic fluoxetine treatment. Therefore the result of this study concerning effect of chronic antidepressant treatment on tPA activity should be verified.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords tPA, BDNF, TrkB, Plasticity, Fluoxetine			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Division of Pharmacology and Toxicology			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information Tomi Rantamäki, PhD (Pharm.), Neuroscience Center, University of Helsinki Raimo Tuominen, Prof, Faculty of Pharmacy, University of Helsinki			

SISÄLLYSLUETTELO

1	JOHDANTO	1
2	KUDOKSEN PLASMINOGEENIAKTIVAATTORI	2
2.1	Rakenne.....	2
2.2	Fibrinolyttiset ominaisuudet.....	4
2.3	Kudoksen plasminogeeniaktivaattori hermostossa	5
2.3.1	Esiintyvyys.....	5
2.3.2	Toiminnan säätely	6
3	AIVOJEN MUOVAUTUVUUS.....	7
3.1	Yleistä	7
3.2	Muovautuvuuden mekanismeja	9
3.2.1	Kestotehostuminen.....	9
3.2.2	Neurogeneesi.....	9
3.3	Neurotrofiinit	10
3.4	Kudoksen plasminogeeniaktivaattori ja hermoston muovautuvuus	13
4	MASENNUSLÄÄKKEET AIVOJEN MUOVAUTUVUUDEN SÄÄTELIJÖINÄ	16
4.1	Yleistä masennuslääkkeistä.....	16
4.2	Masennuslääkkeiden vaikutukset hermokasvutekijöihin	17
4.3	Masennuslääkkeet ja aivojen muovautuvuus	18
4.4	Masennuslääkkeet, kudoksen plasminogeeniaktivaattori ja hermokasvutekijät	19
5	YHTEENVETO KIRJALLISUUDESTA.....	20
6	KOKEELLINEN OSA: FLUOKSETIININ VAIKUTUS KUDOKSEN PLASMINOGEENIAKTIVAATTORIN TOIMINTAAN JA BDNF-SIGNALOINTIIN HIIREN HIPPOKAMPUKSESSA	21
6.1	Tutkimuksen tarkoitus.....	21
6.2	Materiaalit ja menetelmät.....	22
6.2.1	Koe-eläimet.....	22
6.2.2	Lääkeainekäsittelyt.....	22
6.2.3	Näytteiden keräys.....	23
6.2.4	Proteiinimääritys	23
6.2.5	Proteiinien erottelu geelielektroforeesilla	24
6.2.6	Western blot	25
6.2.7	BDNF-ELISA	26

6.2.8	SDS-PAGE –tsymografia.....	27
6.2.9	<i>In situ</i> –tsymografia.....	28
6.2.10	Tilastolliset menetelmät	29
6.3	Tulokset.....	30
6.3.1	Akuutti fluoksetiinikäsittely.....	30
6.3.2	Krooninen fluoksetiinikäsittely	36
6.3.3	<i>In situ</i> –tsymografia.....	43
6.4	Tulosten pohdinta.....	44
6.4.1	Akuutti fluoksetiinikäsittely.....	44
6.4.2	Krooninen fluoksetiinikäsittely	47
6.4.3	<i>In situ</i> –tsymografia.....	52
6.5	Yhteenvedo tuloksista.....	52
7	KIRJALLISUUSLUETTELO.....	54

LIITTEET

LIITE 1 Liuosten koostumukset

LYHENTEET

Asn	asparagiini
BDNF	aivoperäinen hermokasvutekijä
cAMP	syklinen adenosiinimonofosfaatti
CREB	sykliselle AMP:lle herkkä transkriptiotekijä
EGF	epidermaalinen kasvutekijä
IEG	varhaisvaiheen geeni, immediate early gene
K1	kringle-domeeni 1
K2	kringle-domeeni 2
kDa	kilodalton
LRP1	low-density lipoprotein receptor-related protein 1
LTD	kestoheikkeneminen
LTP	kestotehostuminen
MAO	monoamiinioksidaasi
MAPK	mitogeenin aktivoima proteiinikinaasi
MD	monokulaarinen deprivatio
mRNA	lähetti-RNA
MMP	matriksin metalloproteinaasi
NFDM	rasvaton maitojauhe
NGF	hermokasvutekijä NGF, Nerve Growth Factor
NT	neurotrofiini
PAGE	polyakryyliamidigeelielektroforeesi
PAI	plasminogeeniaktivaattorin inhibiittori
PBS	fosfaattipuskuroitu saliini
PI3K	fosfatidyli-inositoli 3 -kinaasi
PKA	proteiinikinaasi A
PLCγ1	fosfolipaasi C γ 1
proBDNF	BDNF:n esiaste
RAP	LRP1- reseptorin inhibiittori, receptor associated protein
SDS	natriumdodekyylisulfaatti
Shc	Sh2-domeenin sisältävä proteiini
SSRI	selektiivinen serotoniinin takaisinoton estäjä

TBS	tris-puskuroitu saliini
tPA	kudoksen plasminogeeniaktivaattori
Trk	tropomyosiinin kaltainen kinaasi
uPA	urokinaasi-tyypin plasminogeeniaktivaattori

1 JOHDANTO

Kudoksen plasminogeeniaktivaattori (tPA; engl. tissue plasminogen activator) kuuluu trypsiinin kaltaisiin seriiniproteaaseihin (Tsirka 2002). Seriiniproteaasien aktiivisessa kohdassa on reaktiivinen seriini-tähde, ja ne pilkkovat tiettyjen proteiinien peptidisidoksia. tPA:n merkittävin substraatti on plasminogeeni, josta se muodostaa aktiivista plasmiinia. Plasmiini osallistuu keskeisellä tavalla verihyytymän hajottamiseen pilkkomalla sitä koossa pitävää fibriiniä, ja tPA onkin parhaiten tunnettu roolistaan fibrinolyttisessä järjestelmässä (Gebbink 2011).

Plasmiini on laajakirjoinen proteaasi, joka osallistuu proteiinien prosessointiin myös verenkierron ulkopuolella. tPA:n vaikutukset eivät siis ole rajoittuneet fibrinolyttiseen järjestelmään. Erityisen mielenkiintoisia ovat havainnot, joiden mukaan tPA:n on havaittu osallistuvan hermoston toiminnan säätelyyn. tPA:a esiintyy hermosoluissa useilla eri aivoalueilla ja sen syntetisointi, varastointi sekä vapautuminen tapahtuvat hermoston aktiivisuudesta riippuvaisesti (Krystosek ja Seeds 1981; Qian ym. 1993; Sappino ym. 1993). tPA osallistuu useisiin hermoston muovautuvuuteen liittyviin tapahtumiin, esimerkiksi soluväliaineen muokkaukseen. tPA:n ja plasmiinin on osoitettu myös osallistuvan aivoperäisen hermokasvutekijän eli BDNF:n prosessointiin ja sitä kautta edelleen ohjaavan BDNF:n vaikutuksia hermosoluissa (Pang ym. 2004). BDNF kuuluu NGF-hermokasvutekijäperheeseen (jäljempänä neurotrofiinit), jonka jäsenillä on merkittävä rooli muun muassa hermosolujen selviytymisessä ja hermosolujen välisten yhteyksien muodostumisessa (Huang ja Reichardt 2001).

BDNF ja sen TrkB-reseptori liittyvät myös masennuslääkkeiden toimintaan, sillä masennuslääkkeet lisäävät BDNF:n synteesiä ja voimistavat TrkB -reseptorin signalointia (Nibuya ym. 1995; Saarelainen ym. 2003; Rantamäki ym. 2007). BDNF-TrkB -signaaloinnilla on merkittävä rooli aivojen muovautuvuuden säätelyssä, ja muovautuvuuden voimistumista pidetäänkin tärkeänä tekijänä masennuslääkkeiden terapeuttisten vaikutusten ilmenemisessä. Tämän vuoksi masennuslääkkeiden vaikutukset hermokasvutekijöihin ja hermoston muovautuvuuteen ovat olleet viime

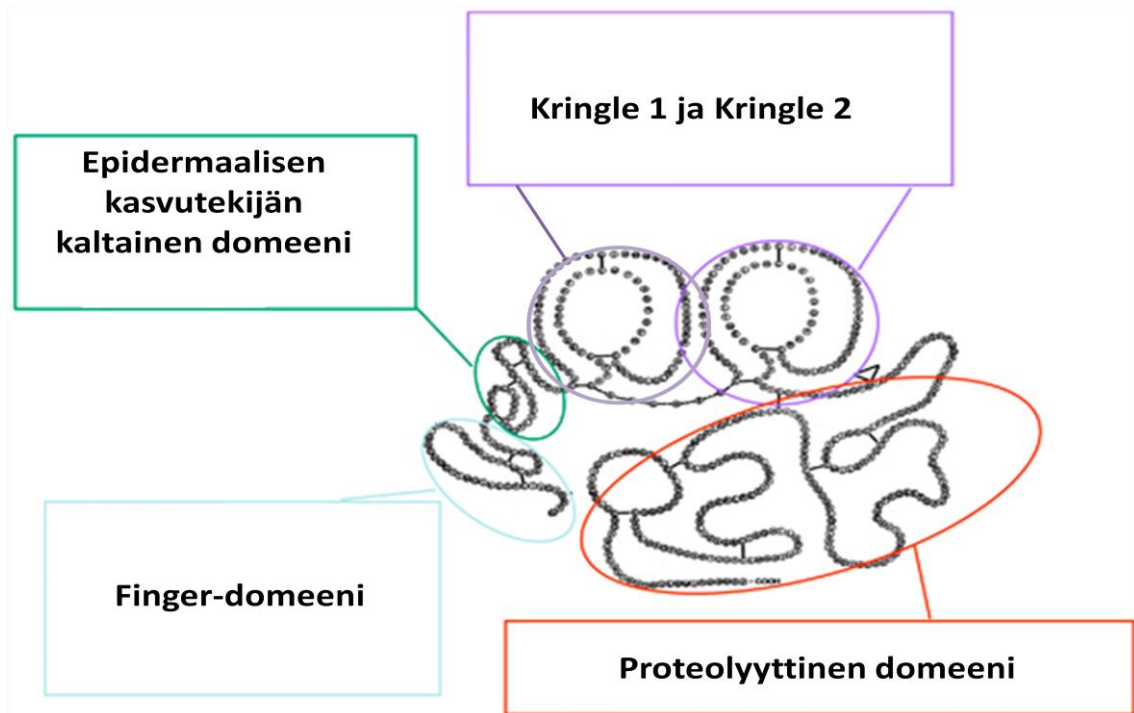
vuosina erityisen mielenkiinnon kohteena. Tarkalleen ei kuitenkaan tiedetä, miten masennuslääkkeiden hermokasvutekijävaikutukset välittyvät.

Koska tPA osallistuu aivojen muovautuvuuden säätelyyn ja BDNF:n prosessointiin, se voi toimia mahdollisena masennuslääkkeiden hermokasvutekijävaikutusten välittäjänä. Tässä kirjallisuuskatsauksessa keskitytään tPA:n keskushermostovaikutuksiin, erityisesti sen rooliin hermoston muovautuvuudessa ja hermokasvutekijöiden prosessoinnissa.

2 KUDOKSEN PLASMINOGEENIAKTIVAATTORI

2.1 Rakenne

Kudoksen plasminogeeniaktivaattori on glykoproteiini, joka koostuu viidestä laskostumasta eli domeenista (Bode ja Renatus 1997) (Kuva 1). Domeenit ovat liittyneet toisiinsa lyhyiden peptidien avulla, jotka mahdollistavat molekyylin rajallisen liikkuvuuden. Kaksiketjuisen tPA:n raskaaseen amino (N) -päätteiseen A-ketjuun kuuluvat proteiinien sitoutumiseen erikoistuneet ”kringle”-domeenit (K1 ja K2), epidermaalisen kasvutekijän (EGF; engl. epidermal growth factor) kaltainen domeeni ja finger –domeeni, jolla on voimakas affiniteetti fibriiniin. tPA:n karboksi (C) -päätteinen proteolyttinen domeeni sijaitsee kevyessä B-ketjussa (Barlati ym. 1995; Bode ja Renatus 1997). A-ketjun domeenit toimivat interaktiokohtina useille tPA:n aktiivisuutta sääteleville molekyyille.



Kuva 1. Kudoksen plasminogeeniaktivaattorin (tPA) rakenne. tPA:n kaksiketjuisessa muodossa on raskas A-ketju, johon kuuluvat kringle-domeenit, epidermaalisen kasvutekijän kaltainen domeeni ja finger-domeeni, jotka toimivat interaktiokohtina tPA:n aktiivisuutta sääteleville molekyyleille. Proteolyttisestä aktiivisuudesta vastaava proteolyttinen domeeni muodostaa kevyen B-ketjun. (Kuva muokattu: Vivien ym. 2011).

Seriiniproteaasit tyypillisesti syntetisoidaan inaktiivisina, yksiketjuisina tsymogeenina, minkä tarkoituksena on suojata soluja ennenaikaiselta proteolyttiseltä aktiivisuudelta (Stubbs ym. 1998). tPA kuitenkin eroaa muista seriiniproteaaseista, sillä myös sen yksiketjuinen muoto on aktiivinen. tPA:n entsymaattinen aktiivisuus ilman sitä voimistavia kofaktoreita, kuten fibriniä, on kuitenkin hyvin heikko (Ellis 2003).

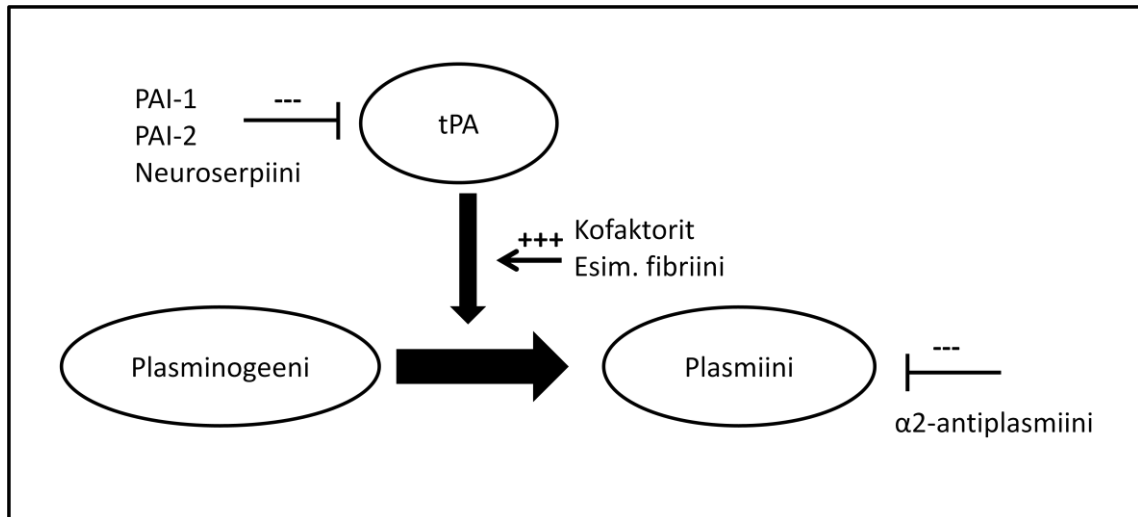
Plasmiini voi solun ulkopuolella muokata tPA:n yksiketjuisesta muodosta 5-10 kertaa aktiivisempaan kaksiketjuiseen muotoon pilkkomalla arginiini-275:n ja isoleusiini-276:n välisen sidoksen (Renatus ym. 1997). Myös monet proteiinin synteesin jälkeen tapahtuvat muokkaukset säätelevät tPA:n aktiivisuutta. tPA voi N-glykosyloitua ainakin kolmeen asparagiini-aminohappoon (Asn¹¹⁷, Asn¹⁸⁴, Asn⁴⁴⁸) ja se eritetään solusta yleensä kahden glykoformin seoksena (Allen ym. 1995). Tyypin I tPA on glykosyloitunut kaikkiin kolmeen asparagiiniin ja tyypin II tPA Asn¹¹⁷- ja Asn⁴⁴⁸-

asparagiineihin. Glykosyloitumisasteeseen vaikuttavat erot solunsisäisessä proteiinin laskostumisessa ja disulfididosten muodostumisessa. Tyypin II tPA muokkautuu yksiketjuisesta kaksiketjuiseksi noin kaksi kertaa nopeammin kuin tyypin I tPA, joten glykosyloitumisaste vaikuttaa tPA:n entsymaattiseen aktiivisuuteen (Wittwer ja Howard 1990). tPA voi lisäksi fosforyloitua tyrosiineihin tai seriineihin, joskin ilmiön biologista merkitystä ei tarkkaan tunneta (Barlati ym. 1995). Elimistössä esiintyvän toisen plasminogeeniaktivaattorin uPA:n (urokinaasi-tyypin plasminogeeniaktivaattori) fosforyloituminen vaikuttaa esimerkiksi uPA:n aktiivisuutta estävien inhibiittorien kiinnittymiseen (Takahashi ym. 1992), mikä saattaa olla mahdollista myös tPA:n tapauksessa.

2.2 Fibrinolyttiset ominaisuudet

tPA on parhaiten tunnettu roolistaan fibrinolyttisessä järjestelmässä. Verihyytymää pitää koossa liukenemattomasta fibriniinistä muodostunut tukiverkko, jonka pilkkoutumiseen plasmiini keskeisellä tavalla osallistuu (Gebbinck 2011). tPA muuttaa inaktiivisen, yksiketjuisen plasminogeenin aktiiviseksi kaksiketjuiseksi plasmiiniksi katalysoimalla tietyn arginiini-valiini –sidoksen hydrolysoitumista (Kuva 2).

tPA:ta vapautuu verisuonten endoteelisoluista, kun verihyytymän muodostuminen käynnistyy (Halperin ja Reber 2007). tPA:lla on erittäin voimakas affiniteetti fibriniin, ja sen läsnä ollessa tPA:n aktiivisuus myös lisääntyy voimakkaasti (Ellis 2003). tPA:n substraattia, plasminogeenia, on veressä ja solunulkoisessa nesteessä runsaasti, joten tPA:n määrä on tärkein plasminogeenin aktivaatiota rajoittava tekijä (Pawlak ja Strickland 2002). Tästä syystä tPA:a ja sen johdoksia käytetään verisuonitukosten liuotushoidossa (Tsirka 2002).



Kuva 2. tPA-plasminogeeni-plasmiini-järjestelmä. Kudoksen plasminogeeni-aktivaattori (tPA) katalysoi inaktiivisen plasminogeenin muuttumista aktiiviseksi seriiniproteaasi plasmiiniksi. tPA:n aktiivisuutta lisäävät voimakkaasti kofaktorit, esimerkiksi fibrini. tPA:n pääasiallinen inhibiittori keskushermostossa on neuroserpiini ja verenkierrassa PAI-1. Plasmiinin toimintaa estää α_2 -antiplasmiini.

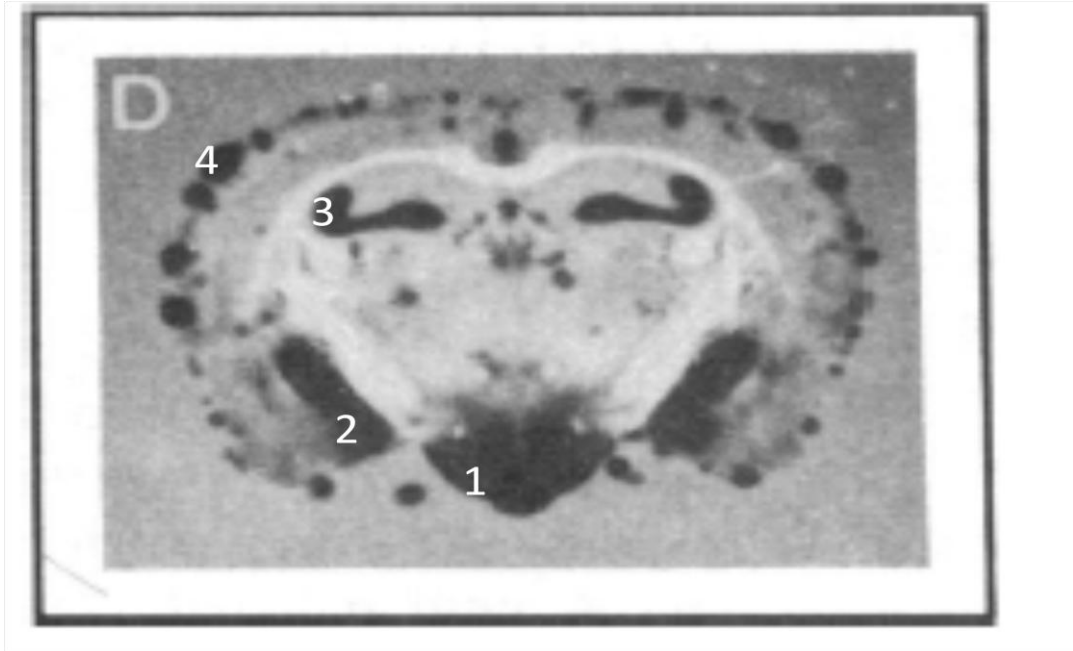
tPA:n aktiivisuutta säätelevät serpiinit eli seriiniproteaasi-inhibiittorit: PAI-1 (engl. plasminogen activator inhibitor 1), PAI-2 ja neuroserpiini (Gebbinck 2011) (Kuva 2). PAI-1 on tPA:n pääasiallinen inhibiittori verenkierrassa ja neuroserpiini keskushermostossa. Inhibiittorit toimivat substraattina tPA:lle ja niiden pilkkoutuminen johtaa kovalenttisen sidoksen muodostumiseen tPA:n aktiivisen kohdan ja inhibiittorimolekyylin välille. PAI-1 estää sekä tPA:n yksi- että kaksiketjuisen muodon aktiivisuutta estämällä esimerkiksi fibrinin kiinnittymisen tPA:in (Bode ja Renatus 1997).

2.3 Kudoksen plasminogeeniaktivaattori hermostossa

2.3.1 Esiintyvyys

Verenkierron lisäksi tPA:a esiintyy perifeerisessä hermostossa muun muassa motoneuroneissa ja sensorisissa ganglioissa (Teesalu ym. 2003). Keskushermostossa tPA:a on varhaiskehityksen aikana esimerkiksi migroituvissa neuroepiteelin soluissa, ja se osallistuu hermosolujen kulkeutumisen ja kasvun säätelyyn. Kehittyneissä aikuisissa aivoissa tPA:a esiintyy hermoston tukisoluuissa ja hermosoluissa useilla eri aivoalueilla,

mutta sen aktiivisuus on voimakkainta hippokampuksessa, mantelitumakkeessa, hypotalamuksessa, pikkuaivoissa ja aivokuorella (Kuva 3) (Sappino ym. 1993).



Kuva 3. Kudoksen plasminogeenin (tPA) aktiivisuus eri aivoalueilla aikuisen hiiren aivoleikkeessä. tPA:n aktiivisuutta voidaan havaita hypotalamuksessa (1), amygdalassa (2), hippokampuksessa (3) ja aivokuorella (4) (tummat alueet) (Sappino ym. 1993).

2.3.2 Toiminnan säätely

Hermosoluissa tPA:a on varastoituneena hermopäätteissä eli synapseissa, joista se vapautuu kalsium-riippuvaisesti esimerkiksi voimakkaan depolarisaation seurauksena (Baranes ym. 1998; Gualandris ym. 1996). Tämän nopeasti tapahtuvan vapautumisen lisäksi myös tPA:n lähetti-RNA:n (mRNA) määrä lisääntyy hermostollisen aktiivisuuden vaikutuksesta. mRNA:n lisääntyminen ei kuitenkaan välttämättä tarkoita tPA:n proteiinimäärän lisääntymistä, sillä translationaalinen kontrolli vaikuttaa proteiinin tuotantoon. *In vitro* -olosuhteissa on kuitenkin havaittu tPA:n vapautumisen solunulkoiseen tilaan lisääntyvän nopeasti mRNA:n määrän kasvaessa (Qian ym. 1993). *In vivo* -olosuhteissa esimerkiksi farmakologisesti aikaansaadut kohtaukset, vaativien motoristen tehtävien suorittaminen ja fyysinen harjoittelu lisäävät tPA:n mRNA:ta (Qian ym. 1993; Seeds ym. 1995; Sartori ym. 2011).

Solusta vapautumisen jälkeen tPA:n aktiivisuus ei ole kovin voimakasta ilman koentsyymien läsnäoloa. Esimerkiksi fibriini ja annexin II:n p11-alayksikkö lisäävät tPA:n aktiivisuutta jopa 300-kertaiseksi sitomalla tPA:ta, plasminogeenia ja plasmiinia ja helpottamalla niiden interaktiota (Kassam ym. 1998). p11-alayksikköön sitoutuminen estää myös tPA:n ja plasmiinin inaktivoitumista, sillä PAI-1 ja α_2 -antiplasmiini eivät pääse kiinnittymään kohdemolekyyleihinsä (Svenningsson ja Greengard 2007). Annexin II on fosfolipideihin sitoutuva proteiini, joka liittyy useisiin solujen toimintaa sääteleviin mekanismeihin ja sen alayksikkö p11 interaktoi useiden proteiinien kanssa ja osallistuu esimerkiksi serotoniinireseptorien toiminnan säätelyyn.

tPA:n aktiivisuus lisää myös sen inhibiittorien synteesiä ja vapautumista, mikä rajoittaa tPA:n vaikutuksia solun ulkopuolella (Pawlak ym. 2003). tPA:n hermostoperäistä inhibiittoria neuroserpiiniä esiintyy erityisesti niillä aivoalueilla, joilla tPA:ta on paljon ja tPA:n tavoin se vapautuu soluista nopeasti depolarisaation seurauksena (Gualandris ym. 1996).

tPA:n ekstrasellulaarista aktiivisuutta ja määrää säätelee inhibiittorien lisäksi LRP1 (low density lipoprotein receptor related protein) –reseptori. tPA:n sitoutuminen LRP1-reseptoriin saa aikaan reseptori-ligandi –kompleksin endosytoosin, jolloin tPA:n määrä synapsiraossa vähenee (Martin ym. 2008). tPA:n sitoutuminen johtaa myös LRP1-reseptorin fosforyloitumisen, minkä seurauksena aktivoituvat signaalintireitit voivat säädellä muun muassa geenien ilmenemistä (Hu ym. 2006).

3 AIVOJEN MUOVAUTUVUUS

3.1 Yleistä

Aivojen muovautuvuudella tarkoitetaan aivojen ja hermoverkkojen kykyä muuttaa rakennettaan ja toimintaansa ympäristön ärsykkeiden vaikutuksesta (May 2011). Aivot muovautuvat oppimisen, kokemusten tai esimerkiksi sairauksien vaikutuksesta ja muovautuvuus toimiikin perustana muun muassa oppimiselle ja muistille.

Muovautuvuuden mekanismeihin kuuluvat hermosoluyhteyksien voimistuminen tai heikkeneminen, uusien yhteyksien ja hermosolujen syntyminen sekä hermoyhteyksien karsiutuminen ja hermosolujen ohjelmoitu kuolema (apoptoosi). Muovautumista tapahtuu, kun (ympäristön) ärsyke aiheuttaa muutoksia proteiinien toiminnassa ja geenien luennassa.

Hermoston muovautuvuus ympäristön ohjaamana on huipussaan varhaiskehityksen aikana (Hensch 2005). Aivot ovat erityisen herkäät muovautumaan ympäristön ärsykkeiden vaikutuksesta niin sanottujen kriittisten jaksojen aikana. Kriittiset jaksot tunnetaan parhaiten aistijärjestelmien kehityksessä, joista eniten on tutkittu nisäkkäiden näköaistin kehittymistä. Toimivien hermoyhteyksien muodostuminen aivokuorelle ja normaalin näkökykyvyn kehittyminen vaativat oikeanlaisia ympäristön ärsykeitä kriittisen jakson aikana.

Pääasiassa hermoston rakenteelliset ja toiminnalliset muutokset tapahtuvat aktiivisuuden säateleinä (Lu 2003). Aktiivisuuden puute johtaa hermosolujen välisen yhteyden heikkenemiseen ja lopulta ”tarpeettoman” synapsin karsiutumiseen. Päinvastoin toiminnallisesti aktiivisissa synapseissa erittyy hermokasvutekijöitä ja muita proteiineja, joiden vaikutuksesta synapsi vahvistuu. Tällä tavalla aktiivisuus säätlee synapsien valikoitumista. Yksittäisten hermosolujen tasolla tapahtuvat muutokset johtavat suuremmissa mittakaavassa kokonaisten hermoverkkojen muodostumiseen ja muokkautumiseen.

Oletetaan että häiriöt hermoston muovautuvuudessa ja hermoverkkojen toiminnassa kuuluvat joidenkin neurologisten ja psykiatristen sairauksien patofysiologiaan. Masennus on esimerkki sairaudesta, johon uskotaan liittyvän häiriöitä hermosolujen aktiivisuudesta riippuvaisessa kommunikoinnissa (Castrén 2005). Kun informaatiokäsittely hermoverkoissa ei toimi normaalisti, aivojen kyky mukautua muuttuvan ympäristön vaatimuksiin häiriintyy, mikä saattaa johtaa tiettyjen hermoverkkojen rappeutumiseen ja toiminnallisiin häiriöihin (Castrén 2005; Calabrese ym. 2009). Muovautuvuuden säätely on kuitenkin yksilöllistä ja siihen vaikuttavat voimakkaasti esimerkiksi varhaiskehityksen aikaiset kokemukset.

3.2 Muovautuvuuden mekanismeja

3.2.1 Kestotehostuminen

Parhaiten hermoston muovautuvuuteen vaikuttavista mekanismeista tunnetaan kestotehostuminen (LTP, engl. long-term potentiation). Kestotehostumisella tarkoitetaan aktiivisuuden aikaansaamaa synapsin sähköisen toiminnan lisääntymistä eli synapsin pitkäaikaista vahvistumista (Minichiello 2009). Kestotehostuminen ilmiönä havaittiin ensimmäisenä hippokampuksessa, mutta sitä esiintyy myös muualla aivoissa, esimerkiksi aivokuorella, amygdalassa ja pikkuaivoissa. Kestotehostumisen uskotaan liittyvän merkittäväällä tavalla muun muassa muistin toimintaan.

Kestotehostuminen voidaan jakaa varhaiseen ja myöhäiseen vaiheeseen (E-LTP ja L-LTP) (Minichiello 2009). E-LTP:n aikana solunsisäiset signaalintireitit aktivoituvat, mikä johtaa tiettyjen proteiinien synteesiin ja L-LTP:n käynnistymiseen. L-LTP:n molekyyli-tason muutoksia ovat muun muassa reseptorien aktiivisuuden lisääntyminen, transkriptiotekijöiden aktivoituminen ja proteiinien synteesi sekä muutokset soluväliaineessa. L-LTP voi johtaa myös uusien synapsien ja dendriittinystyjen muodostumiseen.

LTP:n lisäksi synapsien voimakkuuden säätelyyn osallistuu LTD (engl. long-term depression), jonka seurauksena hermosoluyhteydet heikkenevät (Bear ja Abraham, 1996). LTP ja LTD säätelevät yhdessä aktiivisuuden aiheuttamia muutoksia hermosoluyhteyksien toiminnassa.

3.2.2 Neurogeneesi

Neurogeneesiä eli uusien hermosolujen syntymistä ei pitkään uskottu tapahtuvan aikuisen aivoissa. *Subventricular zone* ja hippokampuksen *dentate gyrus* ovat kuitenkin aivoalueita, joilla hermoston kantasoluista kehittyy uusia toimivia hermosoluja läpi elämän (Castrén 2005). Tarkalleen ei tiedetä, minkä vuoksi juuri näillä aivoalueilla syntyy uusia hermosoluja, vaikka suurimmassa osassa aivoja niitä ei enää kehity syntymän jälkeen.

Uusien hermosolujen täytyy integroitua jo olemassa oleviin hermoverkkoihin ja muodostaa toimivia yhteyksiä muiden hermosolujen kanssa. Uusien hermosolujen selviytymistä ja niiden muodostamia yhteyksiä säätelee hermoston aktiivisuus (Kelsch ym. 2010). Nuoret hermosolut aktivoituvat heikommasta ärsykkeestä kuin kypsät, joten niiden toiminta ja yhteydet muuttuvat voimakkaammin hermoston aktiivisuuden seurauksena. Tämä vaikuttaa koko hermoverkon muovautumiskykyyn.

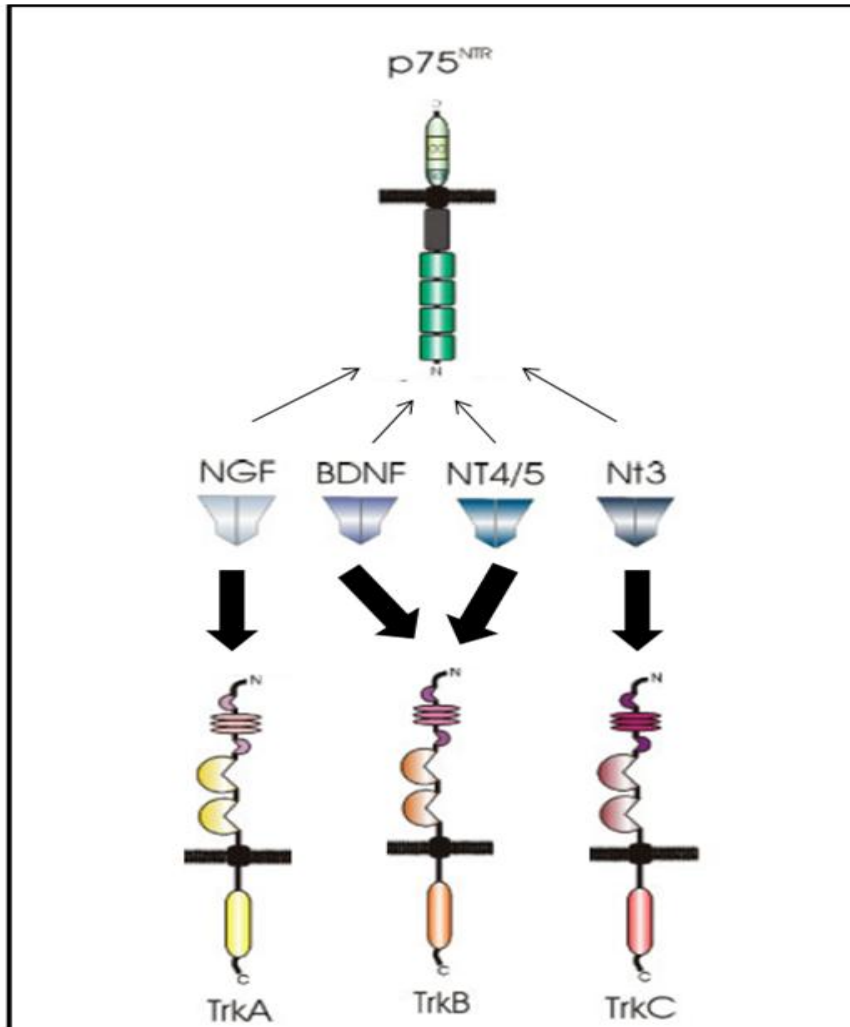
Neurogeneesiä tapahtuu hippokampuksessa jatkuvasti, mutta sitä voidaan voimistaa erilaisilla ärsykkeillä, esimerkiksi fyysisellä harjoittelulla ja oppimista vaativien tehtävien suorittamisella (Mongiat ja Schinder 2011). Hippokampuksen neurogeneesin estäminen aikuisissa aivoissa jyrksijöillä estää tietäntyyppistä oppimista ja esimerkiksi masennuslääkkeiden käyttäytymisvaikutuksia, mikä viittaa siihen että neurogeneesiä tarvitaan hippokampuksen normaaliin toimintaan sekä informaation käsittelyyn ja varastointiin.

3.3 Neurotrofiinit

Neurotrofiinit osallistuvat hermoston toimintaan vaikuttamalla muun muassa hermosolujen selviytymiseen ja erilaistumiseen sekä hermoyhteyksien syntymiseen ja hermoston muovautuvuuteen (Huang ja Reichardt 2001). Neurotrofiinien perheeseen kuuluu neljä rakenteeltaan samankaltaista hermokasvutekijää: hermokasvutekijä NGF (engl. nerve growth factor), BDNF (engl. brain-derived neurotrophic factor), NT-3 (neurotrophin-3) ja NT-4 (neurotrophin-4).

Neurotrofiinien vaikutukset välittyvät Trk-tyrosiinikinaasireseptoreiden ja p75-hermokasvutekijäreseptorin kautta. Kaikki neurotrofiinit sitoutuvat heikolla affiniteetilla p75-reseptoriin, joka kuuluu tuumorinekroositekijäreseptoreiden perheeseen ja osallistuu soluissa muun muassa apoptoottiseen signalointiin (Huang ja Reichardt 2001) (Kuva 4). Voimakkaammin neurotrofiinit sitoutuvat Trk-tyrosiinikinaasireseptoreihin: NGF sitoutuu TrkA-reseptoriin, BDNF ja NT-4/5 TrkB-reseptoriin ja NT-3 TrkC-reseptoriin. Neurotrofiinien sitoutuminen johtaa Trk-reseptorien dimerisoitumiseen, minkä seurauksena reseptorin solunsisäiset tyrosiinikinaasialueet aktivoituvat. Trk-reseptorien aktivoituminen johtaa useiden solunsisäisten signalointireittien kuten

fosfolipaasi C- γ 1 (PLC γ 1), MAPK (mitogen activated protein kinase) ja fosfatidyliinositoli 3-kinaasireitin (PI3K) aktivoitumiseen, jotka tärkeällä tavalla osallistuvat hermosolun erilaistumisen ja muovautuvuuden säätelyyn.



Kuva 4. Neurotrofiinit ja niiden reseptorit. Neurotrofiineilla on korkea affiniteetti Trk-reseptoreihin mutta ne sitoutuvat heikolla affiniteetilla myös p75-neurotrofiinireseptoriin. NGF sitoutuu TrkA-reseptoriin, BDNF ja NT-4/5 TrkB-reseptoriin ja NT-3 TrkC-reseptoriin. (Kuva muokattu: Schweigreiter 2006.)

Neurotrofiineilla on merkittävä rooli kehityksen aikaisessa hermoyhteyksien muodostumisessa ja niiden ylläpidossa myöhemmin (Huang ja Reichardt 2001). Kohdesolut vapauttavat pieniä määriä neurotrofiineja, minkä seurauksena ainoastaan kohdesoluihin toiminnalliset yhteydet muodostaneet hermosolut saavat

hermokasvutekijöiden tukea. Hermokasvutekijöiden tuki johtaa hermosoluyhteyden voimistumiseen ja aktiivisten hermosolujen säilymiseen elinkelpoisina.

Neurotrofiinit syntetisoidaan esiasteina, jotka pilkkotaan solun sisä- tai ulkopuolella kypsään muotoon (Mowla ym. 2001). Neurotrofiinien esiasteiden ajateltiin ensin olevan inaktiivisia, kunnes niiden havaittiin erittyvän solusta ja sitoutuvan korkealla affiniteetilla p75-neurotrofiinireseptoriin (Lee ym. 2001). p75-reseptorin aktivoituminen voimistaa apoptoosia, heikentää hermosolujen tiedonvälitystä ja aiheuttaa esimerkiksi hermosolujen haarakkeiden vetäytymistä (Lee ym. 2001; Yang ym. 2009a). proBDNF:n pilkkoutuessa syntyvä BDNF sitä vastoin sitoutuu voimakkaasti TrkB-reseptoriin, joka säätelee solun selviytymiseen, erilaistumiseen ja hermoston muovautuvuuteen liittyviä signaalireittejä. Koska proBDNF ja BDNF sitoutuvat eri reseptoreihin, proBDNF:n muokkauksella BDNF:ksi voidaan vaikuttaa hermosolussa aktivoituviin signalointireitteihin ja siten solun toiminnassa tapahtuviin muutoksiin.

Neurotrofiineista erityisesti BDNF:llä on merkittävä rooli hermoston aktiivisuudesta riippuvaisessa muovautuvuudessa (Lu 2003). BDNF:ä ja TrkB-reseptoreja esiintyy useilla aivoalueilla, eniten kuitenkin hippokampuksessa, aivokuorella ja pikkuaivoissa (McAllister ym. 1999). Aktiivisuudesta riippuvainen hermoston muovautuvuus on tarkkaan säädeltyä ja BDNF:n vaikutukset ovatkin rajoittuneet aktiivisiin synapseihin. BDNF:n erittyminen soluista ja sen mRNA:n määrä lisääntyvät hermoston aktiivisuuden seurauksena. Aktiivisuus lisää myös TrkB-reseptorien määrää solukalvolla ja TrkB-geenin luentaa (Huang ja Reichardt 2001; Kingsbury ym. 2003).

Kestotehostumisella on tärkeä rooli hermoston muovautuvuudessa ja BDNF osallistuu merkittävällä tavalla sen säätelyyn. BDNF-poistogeenisillä hiirillä hippokampuksen alueen LTP on heikentynyt ja se voidaan palauttaa normaaliksi lisäämällä BDNF:ä (Korte ym. 1996). BDNF:n ylimäärä puolestaan aiheuttaa LTP:n voimistumista (Cowansage ym. 2010). LTP:tä ja hippokampuksesta riippuvaista oppimista voidaan heikentää myös estämällä BDNF:n TrkB-reseptorin signalointia. Erityisesti TrkB-reseptorin PLC γ 1 –signalointireitin aktivoituminen on liitetty LTP:hen (Minichiello ym. 2002). LTP:n lisäksi BDNF vaikuttaa hermoston muovautuvuuteen osallistumalla synapsien rakenteellisiin ja toiminnallisiin muutoksiin esimerkiksi lisäämällä

dendriittien ja solukalvon lähelle ankkuroituneiden synapsirakkuloiden määrää (Lu ja Chow 1999).

3.4 Kudoksen plasminogeeniaktivaattori ja hermoston muovautuvuus

BDNF:n tavoin tPA osallistuu erityisesti aktiivisuudesta riippuvaiseen hermoston muovautuvuuteen (Baranes ym. 1998). Qian ym. (1993) havaitsivat, että tPA oli yksi hippokampuksessa kestotehostumisen induktion seurauksena aktivoituva varhaisvaiheen geeni (IEG; engl. immediate early gene). IEG:n aktivoituminen voi tapahtua nopeasti, sillä se ei vaadi proteiinisynteesiä. tPA:n mRNA:n määrää voidaan lisätä myös muilla hermoston aktiivisuuteen vaikuttavilla menetelmillä, esimerkiksi farmakologisesti aikaansaaduilla epileptisillä kohtauksilla, korkeataajuuksisella sähköisellä stimulaatiolla tai fyysisellä toiminnalla (Qian ym. 1993; Seeds ym. 1995).

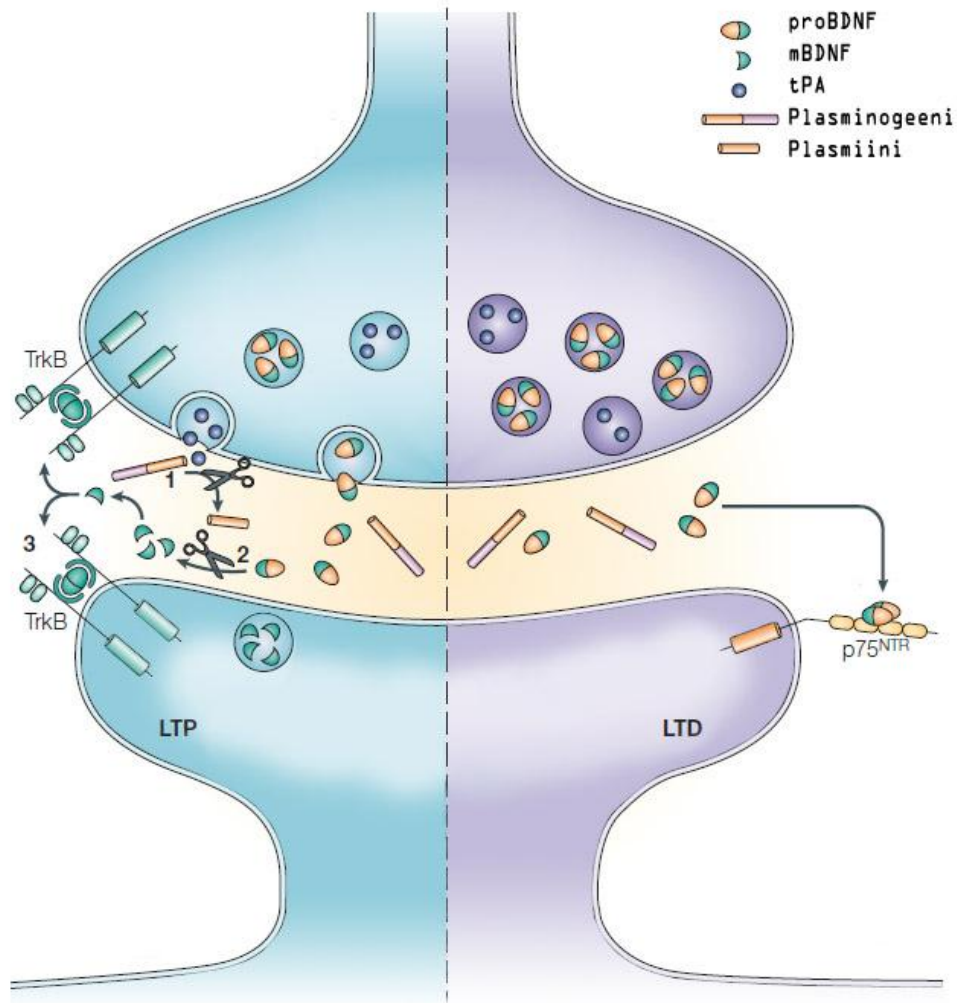
tPA:a vapautuu kasvavien hermosoluhaarakkeiden kärjistä, mikä johtaa plasmiinin välityksellä soluväliaineen proteolyyttiseen muokkaukseen (Krystosek ja Seeds 1981; Pawlak ym. 2003). Soluväliaineen proteiinien pilkkoutuminen mahdollistaa hermosolujen haarakkeiden kasvun. Soluväliaineen muokkauksen lisäksi erittäin merkittävä mekanismi, jolla tPA osallistuu hermoston muovautuvuuden säätelyyn, on plasmiinin välityksellä tapahtuva BDNF:n prosessointi (Pang ym. 2004). tPA:n vaikutuksesta tapahtuvaa plasminogeenin aktivoitumista plasmiiniksi tarvitaan, jotta proBDNF pilkkoutuisi tehokkaasti kypsään muotoon solun ulkopuolella. tPA – poistogeenisten hiirten hippokampuksessa proBDNF-pitoisuudet ovatkin noin kaksi kertaa suurempia kuin villityypin hiirillä.

Kestotehostumisessa tPA:n rooli on tarkentunut erityisesti LTP:n myöhäisen vaiheen (L-LTP) säätelyyn. tPA:ta yli-ilmentävillä hiirillä LTP hippokampuksessa on voimistunut ja ne suoriutuvat villityypin hiiriä paremmin muistia ja oppimista mittaavissa käyttäytymiskokeissa (Madani ym. 1999). Myös hermosoluviljelmissä tPA voimistaa L-LTP:tä ja aksonien kasvua sekä uusien synapsiyhteyksien muodostumista (Baranes ym. 1998).

L-LTP pystytään estämään hiiren hippokampusleikkeissä tPA:n inhibiittoreilla ja tPA-poistogeenisten hiirten hippokampusleikkeillä L-LTP on häiriintynyt (Huang ym. 1996; Baranes ym. 1998). Heikentynyt LTP tPA-poistogeenisten hiirten hippokampusleikkeillä voidaan palauttaa normaaliksi lisäämällä leikkeille rekombinanttitekniikalla tuotettua tPA:ta (Zhuo ym. 2000). tPA:n lisäksi L-LTP pystytään palauttamaan normaaliksi BDNF:llä tai plasmiinilla (Pang ym. 2004). BDNF-heterotsygootti (+/-) -hiirillä plasmiini tai tPA eivät kuitenkaan pysty voimistamaan heikentynyttä L-LTP:a. Plasminogeeni-poistogeenisten hiirten leikkeissä tPA:lla ei ollut vaikutusta kestotehostumiseen, vaikka plasmiini ja BDNF normalisoivat heikentyneen L-LTP:n. Tämä osoittaa tPA:n osallistuvan kestotehostumiseen erityisesti plasmiinin välittämän BDNF:n prosessoinnin kautta.

Jotta solun ulkopuolella toimiva plasmiini voisi osallistua BDNF:n prosessointiin, täytyy BDNF:n erittyä solusta esiasteena. Estämällä plasmiinin toiminta soluviljelmässä α_2 -antiplasmiinilla Yang ym. (2009b) havaitsivat proBDNF:n kerääntyvän soluviljelymediumiin, mikä osoittaa BDNF:n erittyvän solusta myös esiasteena. proBDNF:ä on havaittu vapautuvan ainakin endoteelisoluista ja viljellyistä neuroneista (Lu ym. 2005).

Sekä BDNF:n että tPA:n toiminta on aktiivisuudesta riippuvaista ja tPA:n roolia BDNF:n toiminnan säätelijänä on tutkittu koeasetelmissa, joissa hermostolliseen aktiivisuuteen vaikutetaan keinotekoisesti. Viljellyissä hippokampuksen neuroneissa voidaan korkeataajuuksisella sähköisellä stimulaatiolla saada aikaan LTP ja matalataajuuksisella LTD (Nagappan ym. 2009). Korkeataajuuksinen stimulaatio lisää tPA:n vapautumista hermosoluista ja voimistaa sen aktiivisuutta sekä lisää BDNF:n määrää (Kuva 5). LTD:en johtava matalataajuuksinen stimulaatio taas lisää erityisesti proBDNF:n määrää, mutta ei vaikuta tPA:n aktiivisuuteen. Korkeataajuusstimulaation seurauksena syntyvän BDNF:n määrä myös vähenee merkittävästi, jos tPA:n toiminta solun ulkopuolella estetään. Hermostollisen aktiivisuuden säätelyä tPA:n aktiivisuus vaikuttaa siis proBDNF:n prosessointiin solun ulkopuolella ja ohjaa sitä kautta valintaa LTD:n ja LTP:n välillä.



Kuva 5. Kudoksen plasminogeeniaktivaattori (tPA) osallistuu BDNF:n prosessointiin solun ulkopuolella. Vasen puoli: korkeataajuuksisen stimulaation seurauksena tPA:n vapautuminen solusta lisääntyy yhdessä proBDNF:n kanssa. 1. Solun ulkopuolella tPA proteolyttisesti pilkkoo inaktiivisen plasminogeenin plasmiiniksi. 2. Plasmiini pilkkoo proBDNF:n mBDNF:ksi, 3. joka sitoutuu TrkB-reseptoriin. Oikea puoli: matalataajuuksinen stimulaatio ei lisää tPA:n vapautumista solusta, jolloin pilkkoutumaton proBDNF voi sitoutua p75-neurotrofiinireseptoriin. BDNF:n ja proBDNF:n sitoutuminen eri reseptoreihin solukalvolla käynnistää signalointireitit, jotka johtavat LTP:hen tai LTD:hen. (Kuva muokattu: Lu ym. 2005.)

Useat hermoston muovautuvuuteen, erityisesti kestotehostumiseen, liittyvät tutkimukset tehdään aivoleikkeillä. Esimerkkinä tPA:n vaikutuksesta hermoston aktiivisuudesta riippuvaiseen muovautuvuuteen *in vivo*, on sen osallistuminen näköaivokuoren hermosoluyhteyksien toiminnan säätelyyn. Normaalin näkökyvyn kehittyminen vaatii näköaistimusten aiheuttamia ärsykyitä kriittisen jakson aikana (Hensch 2005). Jos

kriittisen jakson aikana rotan toinen silmä suljetaan, sen yhteydet näköaivokuorelle surkastuvat puuttuvien aistiärsykkeiden vuoksi. tPA:n tai plasmiinin toiminnan estämisellä ei ollut vaikutusta yhteyksien heikkenemiseen (Müller ja Griesinger 1998). Kun näöltään heikentynyt silmä avattiin ja dominoiva silmä suljettiin, heikon silmän yhteyksien voimistuminen pystyttiin kokonaan estämään tPA- tai plasmiini-inhibiittoreilla. Näkökyvyn palautuminen heikompaan silmään vaatii siis aistiärsykkeiden aiheuttamaa hermostollista aktiivisuutta, jonka molekyyli-tason vaikutusten välittämiseen tPA osallistuu.

4 MASENNUSLÄÄKKEET AIVOJEN MUOVAUTUVUUDEN SÄÄTELIJÖINÄ

4.1 Yleistä masennuslääkkeistä

Ensimmäinen masennuslääke iproniatsidi löydettiin sattumalta 1950-luvulla, kun sen havaittiin tuberkuloosin hoidon yhteydessä vaikuttavan potilaiden mielialaan (Pletscher 1991). Iproniatsidi estää monoamiinien (serotoniini, noradrenaliini, dopamiini) metaboloitumista katalysoivan MAO-entsyymin toimintaa. Seuraavaksi markkinoille tuli iproniatsidia vähemmän haittavaikutuksia aiheuttava trisyklinen masennuslääke imipramiini, jonka havaittiin myös lisäävän hermoston välittäjäaineiden, erityisesti noradrenaliinin ja serotoniinin, määrää synapsiraissa. Imipramiini on kliinisessä käytössä edelleen. Uudemmat masennuslääkkeet, esimerkiksi fluoksetiini, estävät selektiivisesti serotoniinin tai/ja noradrenaliinin takaisinottoa. Aivan viime vuosiin saakka uusia masennuslääkkeitä on tullut markkinoille, mutta niiden kaikkien farmakologinen vaikutusmekanismi perustuu monoamiinien solunulkoisten pitoisuuksien lisäämiseen.

Koska masennuslääkkeet kohottavat aivojen monoamiinipitoisuuksia, on pitkään ajateltu että masennuksessa on kyse näiden välittäjäaineiden vähäisyydestä. Monoamiinipitoisuudet kohoavat kuitenkin nopeasti lääkehoidon aloittamisen jälkeen, mutta masennuslääkkeiden kliiniset vaikutukset ilmenevät viiveellä (Berton ja Nestler

2006). Pelkästään monoamiinipitoisuuksien kasvu aivoissa ei siis riitä selittämään masennuslääkkeiden vaikutusmekanismia. Masennuslääkityksen onkin havaittu käynnistävän aivoissa sellaisia prosesseja, jotka johtavat hermoston muovautuvuuden lisääntymiseen (Castrén ja Rantamäki 2010). Tämä vaatii muutoksia esimerkiksi geenien luennassa ja pitkäaikaisen masennuslääkekäsittelyn onkin havaittu vaikuttavan esimerkiksi BDNF:n synteisiin.

4.2 Masennuslääkkeiden vaikutukset hermokasvutekijöihin

Ensimmäiset havainnot masennuslääkkeiden vaikutuksista hermokasvutekijöihin tehtiin 1990-luvun puolivälissä, kun BDNF:n mRNA:n määrän havaittiin lisääntyvän kroonisen masennuslääkekäsittelyn ja sähköshokkihoidon seurauksena jyräjän hippokampuksessa (Nibuya ym. 1995). Myös stressin aiheuttama BDNF:n mRNA:n pitoisuuden lasku pystyttiin estämään kroonisella masennuslääkekäsittelyllä. Tämän havainnon jälkeen alettiin tarkemmin tutkia masennuslääkkeiden vaikutuksia hermokasvutekijöihin.

BDNF:n mRNA:n lisäksi BDNF-proteiinin määrän on havaittu lisääntyvän rotilla kroonisen masennuslääkekäsittelyn seurauksena (Wyneken ym. 2006). Myös masennuslääkkeitä käyttäneillä ihmisillä BDNF:n määrä hippokampuksessa on normalisoitunut (Chen ym. 2001). Masennuslääkkeet lisäävät myös BDNF:n TrkB-reseptorin aktivoitumista jyräjän etuaivokuorella ja hippokampuksessa (Saarelainen ym. 2003; Rantamäki ym. 2007). Vaikutukset BDNF:n mRNA:n ja proteiinin määriin vaativat pidemmän masennuslääkekäsittelyn, mutta TrkB-reseptori aktivoituu nopeasti jo yhden masennuslääkeinjektion vaikutuksesta. Etuaivokuori- ja hippokampus-spesifisillä BDNF-poistogeenisillä –hiirillä tai hiirillä joiden normaali TrkB-signaali on estetty, masennuslääkkeet eivät aiheuta niille tyypillisiä käyttäytymisvaikutuksia (Saarelainen ym. 2003). Päinvastoin infusoimalla BDNF:ä jyräjän keskiaivoihin tai hippokampukseen ja yliekspressoimalla TrkB-reseptoria aivoissa saadaan aikaan samanlainen käyttäytymisvaste kuin masennuslääkkeillä (Siuciak ym. 1997; Shirayama ym. 2002; Koponen ym. 2005).

4.3 Masennuslääkkeet ja aivojen muovautuvuus

Masentuneilla ihmisillä on havaittu hermosolujen surkastumista ja vähenemistä hippokampuksessa ja etuaivokuorella (Castrén 2004). Pääasiassa kyse on atrofiasta, joka ilmenee hermosoluyhteyksien ja dendriittinystyjen vähenemisenä. Hermosolujen aktiivisuuden heikkeneminen ja häiriöt niiden välisessä kommunikoinnissa saattavat johtaa koko hermoverkon toiminnan häiriintymiseen, mutta aivoalueiden atrofian kliinisiä vaikutuksia masennuksessa ei kuitenkaan tarkalleen tunneta.

Kroonisella masennuslääkehoidolla voidaan lisätä uusien hermosolujen muodostumista hippokampuksessa (Malberg ym. 2000). Vaikuttamalla neurogeneesiin ja hermokasvutekijöihin masennuslääkkeet voivat osallistua masentuneiden ihmisten aivoissa havaittujen atrofisten muutosten korjautumisen. Uusien hermosolujen syntyminen ja niiden liittyminen toimivien hermoverkkojen osaksi saattaa olla yksi mekanismi, jonka kautta masennuslääkkeiden terapeuttiset vaikutukset ilmenevät (Malberg ym. 2000; Santarelli ym. 2003). Pelkästään uusien hermosolujen syntyminen ei kuitenkaan riitä hermoverkkojen häiriintyneen toiminnan tai atrofisten muutosten korjautumiseen, vaan hermosolujen on selviydyttävä ja liityttävä osaksi jo olemassa olevia aktiivisia hermoverkkoja (Castrén 2004). Tässä merkittävä rooli on BDNF:llä ja TrkB-reseptorilla, sillä BDNF:n neurotrofinen tuki ja TrkB-reseptorin normaali signaali ovat tarpeellisia hermosolujen selviytymiselle (Sairanen ym. 2005).

Samanaikaisesti neurogeneesin kanssa masennuslääkkeet lisäävät myös apoptoosia (Sairanen ym. 2005). Tämän ilmiön merkitys on vielä epäselvä, mutta se saattaa toimia mekanismina, jonka välityksellä karsitaan sellaisia hermosoluja, jotka eivät aktiivisuuden ja hermokasvutekijöiden tuen puutteen vuoksi selviydy. Koska masennuslääkekäsittelyllä voidaan lisätä BDNF:n ja muodostuvien hermosolujen määrää, on mahdollista, että normaalia suurempi osa syntyvistä hermosoluista pystyy muodostamaan yhteyksiä ja selviytyy, mikä mahdollistaa tehokkaamman sopeutumisen ympäristön muutoksiin (Castrén 2004). Koska uusien hermosolujen tai hermosoluyhteyksien syntyminen sinänsä ei takaa niiden hyödyllisyyttä, tarvitaan ympäristön ohjaavaa vaikutusta tarpeellisten yhteyksien valitsemiseksi.

Koska masennuslääkkeet vaikuttavat useisiin hermoston muovautuvuuteen liittyviin prosesseihin, on tutkittu voidaanko pitkäaikaisella masennuslääkekäsittelyllä voimistaa aivojen muovautuvuutta. Käyttämällä mallina rotan näköaivokuorta Maya Vetencourt ym. (2008) selvittivät masennuslääke fluoksetiin vaikutuksia aivojen muovautuvuuteen. Krooninen fluoksetiinikäsittely aikuisille rotille lisäsi näköaivokuoren muovautuvuutta, jolloin näkökyvyn manipulointi monokulaarisen deprivaaation avulla onnistui samalla tavalla kuin aivojen kehityksen varhaisessa vaiheessa kriittisen jakson aikana. Krooninen fluoksetiinikäsittely lisää BDNF:n määrää aivoissa ja infusoimalla BDNF:ä suoraan aivokuorelle saatiin aikaan samanlainen vaikutus näköaivokuoren muovautuvuuteen kuin fluoksetiinilla. Fluoksetiinin hermoston muovautuvuutta voimistava vaikutus perustuu siis ainakin osittain hermokasvutekijäsignaaloinnin voimistumiseen.

4.4 Masennuslääkkeet, kudoksen plasminogeeniaktivaattori ja hermokasvutekijät

Masennuslääkkeiden vaikutuksia tPA:han on tutkittu lähinnä verenkierrossa, sillä masennus, masennuslääkkeet ja tPA voivat kaikki vaikuttaa veren hyytymisjärjestelmään. Masentuneilla ja ahdistuneilla ihmisillä veren hyytymisjärjestelmässä on häiriöitä ja heillä on lisääntynyt riski sairastua sydän- ja verisuonisairauksiin (Geiser ym. 2011). Esimerkiksi tPA:n inhibiittori PAI-1:n määrä on lisääntynyt, mikä voi johtaa fibrinolyysin vähenemiseen (Tsai ym. 2008). Päinvastoin masennuslääkkeet, etenkin SSRI-lääkkeet, saattavat lisätä verenvuotoriskiä, sillä ne estävät hyytymisprosessissa tärkeiden verihutaleiden aktivoitumista.

Veren tPA-aktiivisuuden ja serotoniini-pitoisuuden välillä on havaittu negatiivinen yhteys (Urano ym. 1995). Masennuslääkkeet kohottavat veren serotoniinipitoisuuksia, mikä saattaisi johtaa veren tPA-aktiivisuuden vähenemiseen. Serotonergisilla masennuslääkkeillä hoidettujen ihmisten veressä onkin havaittu vähemmän tPA:ta kuin masennuslääkkeillä hoitamattomilla (Geiser ym. 2011). Toisaalta Shi ym. (2010) havaitsivat tPA:n määrän olevan pienempi masennusta sairastavilla vanhuksilla kuin terveillä kontrolleilla, eikä masennuslääkitys merkitsevästi vaikuttanut tPA:n pitoisuuteen. On myös viitteitä siitä, että masennuslääkitys saattaisi vähentää PAI-1:n

määrää (Geiser ym. 2011). Vaikka veren tPA-pitoisuus olisi masennuslääkehoidon yhteydessä vähentynyt, inhibiittoreihin vaikuttamalla voidaan voimistaa tPA:n aktiivisuutta. Masennuslääkkeitä käyttävillä ihmisillä on havaittu veren plasmiini- α_2 -antiplasmiini –kompleksien määrän lisääntyneen. Tämä saattaa olla seurausta tPA:n aktiivisuuden lisääntymisestä, mikä on johtanut plasmiinin, ja kompensatorisesti myös sen inhibiittorin, synteisiin. tPA:n aktiivisuuden mittaaminen kertookin enemmän sen toiminnasta kuin pelkän proteiinitason määrittäminen.

5 YHTEENVETO KIRJALLISUUDESTA

Kudoksen plasminogeeniaktivaattori osallistuu hermoston muovautuvuuteen muun muassa muokkaamalla soluväliaineen proteiineja, mikä mahdollistaa hermosolujen haarakkeiden kasvun ja uusien hermosoluyhteyksien muodostumisen (Pawlak ym. 2003). Tämän uskottiin pitkään olevan tärkein mekanismi, jonka kautta tPA vaikuttaa keskushermostossa. Uusimpien tutkimusten perusteella tPA:n vaikutukset aivojen muovautuvuuteen välittyvät kuitenkin pääasiassa BDNF:n prosessoinnin kautta (Pang ym. 2004; Nagappan ym. 2009).

proBDNF ja BDNF sitoutuvat eri reseptoreihin, minkä vuoksi ne saavat aikaan erilaiset ja toiminnallisesti päinvastaiset vasteet hermosoluissa (Lee ym. 2001). proBDNF voi heikentää hermosoluyhteyksiä ja sen aktivoimat signaalintireitit saattavat johtaa apoptoosiin. Sitoutumalla TrkB-reseptoriin BDNF päinvastoin aktivoi hermosoluyhteyksien voimistumiseen ja solujen selviytymiseen liittyviä signaalintireittejä. BDNF-TrkB -signaalointiin vaikuttamalla voidaankin voimistaa hermoston muovautuvuutta (Maya Vetencourt ym. 2008; Castrén ja Rantamäki 2010).

BDNF:n määrän ja TrkB-reseptorin signaloinnin on havaittu lisääntyvän aivoissa muun muassa masennuslääkkeiden vaikutuksesta (Nibuya ym. 1995; Wyneken ym. 2006; Rantamäki ym. 2007). Koska BDNF-TrkB –signaalinnilla on merkittävä rooli hermoston muovautuvuudessa, on tutkittu voidaanko pitkäaikaisella masennuslääkekäsittelyllä voimistaa aivojen muovautuvuutta. Näköaivokuorella tehtyjen tutkimusten perusteella masennuslääke fluoksetiini vaikuttaisi toimivan juuri

tällä tavalla (Maya Vetencourt ym. 2008). BDNF osallistuu merkittävällä tavalla fluoksetiinin muovautuvuusvaikutusten välittämiseen, mutta tarkalleen ei tiedetä, miten fluoksetiini lisää BDNF-TrkB –signalointia.

Koska tPA:lla on merkittävä rooli BDNF:n prosessoinnissa (Pang ym. 2004; Nagappan ym. 2009), masennuslääkkeet voisivat lisätä BDNF:n määrää ja BDNF-TrkB –signalointia voimistamalla tPA:n aktiivisuutta. Masennuslääkkeiden vaikutuksia tPA:in on tutkittu lähinnä verenkierrossa (Urano ym. 1995; Shi ym. 2010; Geiser ym. 2011), eikä tehtyjen tutkimusten perusteella ole havaittu selkeää yhteyttä masennuslääkkeiden ja tPA:n aktiivisuuden välillä. Koska masennuslääkkeiden terapeuttiset vaikutukset kuitenkin välittyvät keskushermoston kautta, tarvitaan lisätutkimuksia masennuslääkkeiden vaikutuksista tPA:in aktiivisuuteen erityisesti keskushermostossa.

6 KOKEELLINEN OSA: FLUOKSETIININ VAIKUTUS KUDOKSEN PLASMINOGEENIAKTIVAATTORIN TOIMINTAAN JA BDNF-SIGNALOINTIIN HIIREN HIPPOKAMPUKSESSA

6.1 Tutkimuksen tarkoitus

Masennuslääkkeiden on osoitettu lisäävän BDNF:n synteesiä ja TrkB -reseptorin aktiivisuutta jyrksijän hippokampuksessa (Nibuya ym. 1995; Rantamäki ym. 2007). Tarkalleen ei kuitenkaan tiedetä, miten masennuslääkkeiden aiheuttamat muutokset BDNF-TrkB –signaloinnissa tapahtuvat. BDNF-TrkB -signaloinnilla oletetaan olevan merkittävä rooli masennuslääkkeiden aikaansaaman muovautuvuuden voimistumisen ja siten terapeuttisten vaikutusten välittämisessä (Castrén ja Rantamäki 2010).

Vaikuttamalla BDNF:n prosessointiin tPA voi mahdollisesti osallistua masennuslääkkeiden hermokasvutekijävaikutusten säätelyyn. Tämän pro gradu –työn kokeellisen osan tarkoituksena oli tutkia akuutin ja kroonisen fluoksetiinikäsittelyn vaikutuksia BDNF-TrkB –signalointiin hiiren hippokampuksessa ja selvittää, kuinka BDNF-TrkB -signaloinnin muutokset korreloivat mahdollisten tPA:n toiminnan (aktiivisuus, proteiinimäärä) muutosten kanssa.

6.2 Materiaalit ja menetelmät

6.2.1 Koe-eläimet

Kaikissa kokeissa käytettiin aikuisia C57BL/6 -uroshiiriä (Harlan Laboratories, Hollanti). Eläimet pidettiin lämpötilan, ilmankosteuden ja valo-pimeä -rytmin kannalta standardoiduissa olosuhteissa (21-22 °C, 40 %, valot päällä 12 h/vrk) ja ruokaa ja vettä tai fluoksetiini-vesiliuosta oli saatavilla *ad libitum*. Eläinkokeet suoritettiin Yhdysvaltain Neurotieteen yhdistyksen (Society for Neuroscience) suositusten mukaan ja niille oli myönnetty lupa Etelä-Suomen lääninhallitukselta.

6.2.2 Lääkeainekäsittelyt

Akuutissa kokeessa koe-eläimet satunnaistettiin fluoksetiini- ja kontrolliryhmään (n=9/ryhmä). Fluoksetiiniryhmälle annosteltiin vatsaonteloon (i.p.) fysiologiseen keittosuolaliuokseen (0.9% NaCl) liuotettua fluoksetiinihydrokloridia 30 mg/kg (Orion Pharma, Turku, Suomi) ja kontrolliryhmälle samassa tilavuudessa (0.1ml/10g) keittosuolaliuosta. Tunnin kuluttua injektioista hiiret lopetettiin hiilidioksiditainnutuksessa niskamurrolla. Käytetyn fluoksetiiniannoksen on aiemmin havaittu aktivoivan TrkB-reseptoria hiiren etuivokuorella ja hippokampusessa tässä aikapisteessä (Rantamäki ym. 2007).

Kolmen viikon fluoksetiinikäsittely toteutettiin juottamalla yksittäishäkeissä oleville hiirille (n=12/ryhmä) fluoksetiinihydrokloridi-vesiliuosta (0,08 mg/ml; Orion Pharma) tai vesijohtovettä ruskeista 15 ml Falcon-putkista. Liuoksen kulutus määritettiin joka toinen päivä, jolloin liuokset myös vaihdettiin. Annosteltaessa fluoksetiinia tällä tavoin, pysyvä ja kliinisesti terapeuttinen plasmapitoisuus saavutetaan noin viiden päivän kuluttua (Santarelli ym. 2003). Fluoksetiinin annos oli lopulta noin 15 mg/kg/pv laskettuna juodun määrän ja hiiren painon perusteella.

6.2.3 Näytteiden keräys

Aivot poistettiin nopeasti (<1 min) eläimen lopetuksen jälkeen. Jääleikkeitä varten aivot jäädytettiin kokonaisina kastamalla ne Falcon-putkessa nestetyypeen, käärittiin folioon ja syväpakatettiin (-80 °C) ennen jatkokäsittelyä.

Aivopalojen leikkausta eli dissekointia varten aivot kastettiin aluksi jääkylmään fosfaattipuskuroituun saliiniin (PBS). Aivoista leikattiin molemmat hippokampuset jäällä täytetyn maljan päällä. Hippokampusista toinen homogenisoitiin 500 µl Tris-Triton –puskuriin ja toinen 400 µl NP++ -puskuriin (Liite 1). Homogenisoidut kudokset pidettiin jäällä vähintään 15 minuuttia, jonka jälkeen ne sentrifugoitiin (+4 °C, 16100 g, 15 min). Supernatanteista (liukoiset proteiinit) määritettiin proteiinipitoisuudet ja valmistettiin näytteet jatkokäsittelyä varten.

6.2.4 Proteiinimääritys

Aivopalanäytteiden proteiinipitoisuudet määritettiin käyttämällä kaupallista kittiä (DC Protein Assay; Bio-Rad, Yhdysvallat). Näytteistä valmistettiin ionivaihdettuun veteen 1:5 laimennokset. Laimennoksista pipetoitiin kolme rinnakkaista näytettä (à 5 µl) kirkkaalle 96-kuoppalevyille (Microtest plate, Sarstedt). Kontrollina käytettiin ionivaihdettua vettä. Standardisuoraa varten valmistettiin 0,1-2,0 µg/µl laimennokset naudan seerumin albumiinista (BSA) (Protein assay standard II, Bio-Rad, Yhdysvallat).

Proteiinimääritys perustuu värireaktioon, joka tapahtuu kun emäksisissä olosuhteissa näytteiden proteiineihin liitetty kupari (reagenssi AS, 25 µl/kaivo) pelkistää substraattiliuoksen (reagenssi B, 200µl/kaivo) foliinin. Kuoppalevyä inkuboitiin reagenssi AS:n ja B:n lisäämisen jälkeen huoneenlämmössä ravistelijalla noin 15 minuuttia. Absorbanssi mitattiin Victor-levynlukijalla 750 nm aallonpituudella. MultiCalc –ohjelma laski näytteiden proteiinipitoisuudet standardisuoran perusteella.

6.2.5 Proteiinien erottelu geielektroforeesilla

Geielektroforeesia varten valmistettiin 20-50 µg proteiinia sisältävät näytteet Laemmlin näytepuskuriin. Laemmlin näytepuskuri sisältää natriumdodekyylisulfaattia (SDS), joka muodostaa proteiinien pinnalle negatiivisen varauksen. Puskuri sisältää myös pelkistävää β-merkaptoetanolia, joka saa proteiineja stabiloivat rikkisidokset katkeamaan. Laemmlin puskurin lisäämisen jälkeen näytteitä keitettiin 3 minuuttia (100 °C) lämpölevyllä (VWR Analog Heatblock, Yhdysvallat).

TrkB -reseptorin tyrosiinifosforylaation tutkimista varten näytteille tehtiin lektiinisaostus. Vehnänalkiosta eristetyin *Triticum Vulcare* -lektiinin avulla voidaan rikastaa näytteistä voimakkaasti *N*-glykosyloituneita proteiineja, kuten TrkB-reseptoreja. Näytteitä (400 µg proteiinia) pyöritettiin 2 tuntia +4 °C lektiiniliuoksessa (100 µl NP++ ja 30 µl 50% lektiini-NP++ -suspensio), jolloin TrkB-reseptorit sitoutuvat lektiiniin. Näytteitä pestiin lektiinipyörytyksen jälkeen 1-2 kertaa 500µl NP++ -puskurilla epäspesifisesti sitoutuneiden proteiinien irrottamiseksi. Pesujen jälkeen lektiinipelletille pipetoitiin 20,5 µl kaksinkertaista Laemmlin näytepuskuria ja näytteitä keitettiin 5 minuuttia, jotta lektiinin sitomat proteiinit vapautuisivat pelletistä näytepuskuriin.

Keittämisen jälkeen näytteiden proteiinit eroteltiin SDS-polyakryyliamidigeielektroforeesin (PAGE) avulla. Proteiinien päällystäminen negatiivisella varauksella saa ne ajautumaan geelillä massansa mukaiseen järjestykseen. Geelin sisältämä akryyliamidi muodostaa polymerisoituessaan verkkomaisen rakenteen, jonka läpi proteiinit kulkeutuvat. Molekyylipainoltaan isommat proteiinit jäävät siivilöintivaikutuksen seurauksena geelin yläosaan ja pienemmät proteiinit ajautuvat pidemmälle. Erottelugeelin akryyliamidi-pitoisuutta muuttamalla voidaan säädellä, minkä kokoisia proteiineja se parhaiten erottelee.

Erottelugeelin päälle valmistettiin kasaageeli, jonka akryyliamidipitoisuus ja pH ovat erilaisia kuin erottelugeelissä. Näytteet ja esivärjätty proteiinistandardi (P7708S, New England Biolabs, Yhdysvallat) pipetoitiin kasaageelin kaivoihin. Näytteitä ajettiin 100 V jännitteellä noin 30 minuuttia ajopuskurissa, minkä jälkeen jännitettä nostettiin 160 V:n ja ajettiin vielä noin tunnin ajan.

6.2.6 Western blot

Western blot eli immunoblottaus tarkoittaa vasta-aineen avulla tapahtuvaa proteiinin tunnistamista kalvolta. Geelielektroforeesin jälkeen proteiinit siirrettiin sähkövirran avulla PVDF-kalvolle iBlot-kuivasiirtäjällä (Invitrogen). Siirron jälkeen kalvoa stabiloitiin TBS:ssä (Tris-puskuroitu saliini) 5 minuuttia. Vasta-aineen epäspesifisen sitoutumisen estämiseksi kalvoa inkuboitiin huoneenlämmössä tunnin ajan keinuttajalla blokkauksliuoksessa (5 % rasvaton maitojauhe (NFDM)/TBS-T- tai 3 % BSA/TBS-T). Blokkauksen jälkeen kalvoa keinutettiin primäärivasta-aineliuoksessa yön yli +4 °C (Taulukko 1), minkä jälkeen kalvoa pestiin TBS-T –liuoksella (1x15 min + 3x10 min). Pesujen jälkeen kalvoa inkuboitiin tunnin ajan huoneenlämmössä piparjuuriperoksidaasi-konjugoidussa sekundäärivasta-aine –liuoksessa. Pesut toistettiin kuten edellä ja kalvolle pipetoitiin kemiluminesenssi-reagenssi (ECL plus, Amersham, GE Lifesciences, Yhdysvallat). 5 minuutin kuluttua valoreaktio visualisoitiin Fuji LAS3000-kameralla. Tulokset analysoitiin ImageJ –ohjelmalla (National Institute of Health, Yhdysvallat) valottuneiden kohtien intensiteetin perusteella.

Taulukko 1. Western blotissa käytetyt vasta-aineet.

	Vasta-aine	Epitooppi	Laimennos	Tuottajaeläin	Valmistaja
<i>Primäärivasta-aineet</i>	anti-pTrkB	Katalyyttisen domeenin pY705/6	1:1000, 3% BSA/TBS-T	Kani	Cell Signalling
	anti-TrkB	TrkB N-terminus	1:1000, 3% BSA/TBS-T	Hiiri	BD Biosciences
	anti-BDNF		1:500, 5% NFDM/TBS-T	Kani	Santa Cruz
	anti-tPA	Proteaasi-domeeni	1:1000, 5% NFDM/TBS-T	Hiiri	Abcam
<i>Sekundäärivasta-aineet</i>	HRP-konjugoitu anti-hiiri	Hiiren IgG	1:10000, 5% NFDM/TBS-T	Kani	Biorad
	HRP-konjugoitu anti-kani	Kanin IgG	1:10000, 5% NFDM/TBS-T	Vuohi	Biorad
<i>Immunosaostus</i>	anti-TrkB	TrkB N-terminus	5 µl/600 µg proteiinia	Hiiri	R & D Systems

6.2.7 BDNF-ELISA

BDNF-proteiinien määrittämiseen käytetty ELISA (engl. enzyme-linked immunosorbent assay) -menetelmä on värireaktioon perustuva ns. sandwich-ELISA, jossa käytetään kahta eri epitopin tunnistavaa BDNF-vasta-ainetta (vasta-aineet saatu lahjana Hoffmann-La Roche lääke- ja diagnostiikkayhtiöltä). Maxisorb 96-kuoppalevyn (Nunc) kaivoja inkuboitii BDNF-vasta-aineessa (\acute{a} =200 μ l, 1:4000 karbonaattipuskurissa) +4 °C yön yli. Seuraavana päivänä kaivot käsiteltiin proteiinien epäspesifisen sitoutumisen estämiseksi blokkauksella (2% BSA, 0.1% Triton X-100 Hanks-puskurissa; 2 h, huoneenlämmössä ravistelijalla). Aivonäytteille (15 μ l näyte + 180 μ l Hanks-puskuri) suoritettiin happokäsittely, joka tehostaa vasta-aineen sitoutumista BDNF-proteiiniin. Näytteisiin lisättiin 6 μ l 1M HCl sekoittaen, jonka jälkeen näytteitä inkuboitii 15 minuuttia huoneenlämmössä. Tämän jälkeen näytteen pH palautettiin happamasta (pH ~2) neutraaliksi (pH ~7-8) lisäämällä 6 μ l 1M NaOH. pH-arvo ennen ja jälkeen emäsluoksen lisäämistä varmistettiin 2-3 kaivosta pH-paperin avulla. Näytteitä (\acute{a} =170 μ l) ja BDNF-standardeja (\acute{a} =170 μ l, 15,6-1000 pg/ml, Hanks-puskurissa) pipetoitiin duplikaatteina blokatulle ELISA-kuoppalevylle yhdessä peroksidaasikonjugoidun BDNF-vasta-aineen (\acute{a} =30 μ l, 1:1800 Hanks-puskurissa, jossa 6.66 % BSA ja 0.66 % Triton X-100) kanssa ja inkuboitii yön yli +4 °C. Seuraavana aamuna kaivot pestiin PBS-T:llä (4x300 μ l) levypesurilla (Thermo Wellwash AC), jonka jälkeen niihin lisättiin 200 μ l huoneenlämpöistä BM Blue peroksidaasi-substraattia (Roche). Substraatin lisääminen saa aikaan peroksidaasin katalysoiman reaktion, jonka seurauksena syntyy sininen lopputuote. Kuoppalevyä inkuboitii pimeässä 20 minuuttia huoneenlämmössä. Reaktio pysäytettiin lisäämällä 50 μ l:aa 1M H₂SO₄:a sekoittaen, jolloin väri muuttuu happamuuden kasvaessa sinisestä keltaiseksi. Absorbanssi mitattiin 490 nm allonpituudella Victor-levynlukijalla. BDNF-standardien absorbanssien perusteella määritettiin standardisuora, jonka avulla laskettiin kunkin näytteen BDNF-pitoisuus. BDNF-pitoisuus normalisoitiin näytteen proteiinimäärään.

6.2.8 SDS-PAGE –tsymografia

SDS-PAGE –tsymografiassa näytteiden proteiinit erotellaan ei-pelkistävässä olosuhteissa polyakryyliamidigeelelektroforeesin avulla. Geeliin on lisätty substraatiksi plasminogeeni, joka muuttuu aktiivisen tPA:n vaikutuksesta plasmiiniksi. Plasmiini pilkkoo geeliin lisätyn rasvattoman maitojauheen kaseiineja, mikä voidaan nähdä värjätystä geelistä vaaleina alueina.

Tris-triton –puskuriin homogenisoiduista hippokampuksista valmistettiin näytteet (40 µg proteiinia) ei-pelkistäväan Laemmlin puskuriin, joka ei sisällä entsyymiä denaturoivaa merkaptoetanolia tai DTT:tä. Näytteitä ei myöskään keitetty, vaan niitä inkuboitiin näytepuskurin lisäämisen jälkeen huoneenlämmössä noin 15 min. Kontrolleina käytettiin rekombinantitekniikalla tuotettua ihmisen tPA:ta ja hiiren munuaislysaattia, jossa tiedetään olevan voimakas tPA ja uPA (urokinaasi-tyypin plasminogeeniaktivaattori) -aktiivisuus. Munuaiset kerättiin kontrolliryhmän hiiriltä, homogenisoitiin NP++ -puskuriin ja sentrifugoitiin (16100 g, 15 min +4 °C). Supernatanttiin lisättiin sama tilavuus ei –pelkistävää Laemmlin näytepuskuria.

Näytteiden proteiinit eroteltiin SDS-PAGE:n avulla käyttäen 10 % akryyliamidigeelejä, joihin oli lisätty maitojauhe (500 µl 8 % NFDM) ja plasminogeeni (0.4 IU, Sigma Aldrich, Yhdysvallat). Ajokammio täytettiin ajopuskurilla ja kammio laitettiin geelin kuumenemisen estämiseksi jäätä sisältävään styroksilaatikkoon ajautumaan alhaisella virralla (15 mA) yön yli.

Kun näytteiden proteiinit olivat erottuneet, geelit pestiin 2.5%:lla Triton X-100 –liuoksella 4x15 min keinuttajalla. Triton X-100 on pinta-aktiivinen aine, joka irrottaa proteiineista niihin kiinnittyneen SDS:n, jolloin proteiinien kolmiulotteinen rakenne voi palautua normaaliksi. Triton X-100:n poistamiseksi geelejä esihuuhdeltiin 3x10 min reaktioliuoksessa (10mM CaCl₂, 50mM Tris-Hcl, pH 7.5). Tämän jälkeen geelejä inkuboitiin 16-48h ajan lämpöhuoneessa (+37 °C) keinuttajalla samassa liuoksessa. Inkubaation jälkeen geelejä huuhdeltiin ionivaihdetussa vedessä 3x10min ja geeleillä oleva maitoproteiini värjättiin Coomassie Brilliant blue –väriliuoksella 30min - 1h. Proteiineihin kiinnittymätön väriaine huuhdeltiin pois etikkahappo-metanoli –liuoksella.

Geelit kuvattiin Canon Powershot S3 IS –kameralla ja geelin vaaleiden kohtien intensiteetti määritettiin ImageJ –ohjelmalla.

6.2.9 *In situ* –tsymografia

In situ -tsymografiassa jääleikkeiden päälle pipetoidaan substraattiliuos, jonka avulla voidaan paikallistaa aktiivinen entsyymi kudoksessa. tPA:n aktiivisuutta voidaan tutkia käyttämällä substraattina plasminogeenia. Plasminogeeni muuttuu tPA:n aktiivisuuden seurauksena plasmiiniksi, joka pystyy hydrolysoimaan substraattiliuokseen lisätyn rasvattoman maitojauheen kaseiineja. Koska plasmiinin määrä on riippuvainen tPA:n aktiivisuudesta, voidaan maidon kaseiinien pilkkoutumisen avulla määrittää tPA:n aktiivisuutta. Aivokudoksessa plasminogeenin aktivoituminen voi tapahtua tPA:n lisäksi myös uPA:n vaikutuksesta. Näiden erottamiseksi substraattiliuokseen voidaan lisätä amiloridia, joka on spesifinen uPA:n inhibiittori. Muiden proteaasien kuin plasmiinin vaikutuksesta tapahtuvaa kaseiinien pilkkoutumista voidaan tutkia jättämällä substraattiliuoksesta pois plasminogeeni.

Aivot oli pakastettu kokonaisina ja ennen leikkeiden tekoa ne tuotiin kryostaatin kammioon (-20 °C), jossa ne kiinnitettiin mikrotomin istukkaan Tissue-Tek O.C.T. Compoundin avulla. Aivoista leikattiin koronaarisia 10 µm leikkeitä SuperFrost – laseille. Erityisesti leikkeitä kerättiin hippokampuksesta, mutta myös sitä edeltäviltä aivoalueilta. Leikkeitä säilytettiin -20 °C korkeintaan viikon ajan ennen tsymografian suorittamista.

In situ –tsymografiaa varten valmistettiin 8 % maitojauheliuos (PBS + 0.9 mM CaCl₂ ja MgCl₂) keittämällä 30 minuuttia, jonka jälkeen liuosta sentrifugoitiin (10 min, 1500g) ja supernatantti kerättiin talteen. Maitojauheliuos (à 40 µl) jaettiin 1.5 ml Eppendorf-putkiin ja siihen lisättiin 60 µl PBS (0.9 mM CaCl₂ ja MgCl₂) sekä 4 µl (0.02 IU) plasminogeenia ja joihinkin putkiin uPA-aktiivisuuden estämiseksi 2 µl 200 µM amiloridia (Sigma Aldrich, Yhdysvallat). Negatiivisista kontroleista plasminogeeni jätettiin pois.

Agaroosi (1 %) liuotettiin PBS:n keittämällä 30 minuuttia. Tämän jälkeen agaroosi-liuos laitettiin eppendorf-putkissa lämpölevylle (+50 °C) jähmettymisen estämiseksi. Maitojauhe-plasminogeeni –liuokset laitettiin lämpölevylle juuri ennen käyttöä ja niihin pipetoitiin esilämmitetyillä ja leikatuilla kärjillä 60 µl 1% agaroosi-liuosta. 60µl valmista substraatti-liuosta pipetoitiin välittömästi kahdelle leikkeelle ja niiden päälle pudotettiin peitinlasi. Agaroosi jähmettyy viiletessään, mikä pitää peitinlasin ja substraattiliuoksen paikallaan (Kuva 5). Leikkeiden annettiin sulaa huoneenlämmössä hetken ennen substraattiliuoksen pipetointia.



Kuva 6. Substraattiliuos jähmettyy nopeasti pipetoinnin jälkeen. Vasemmalla mahdollisimman nopeasti pipetoinnin jälkeen asetettu peitinlasi ja oikealla noin 10 sekuntia pipetoinnin jälkeen asetettu peitinlasi. Jäähtyminen saa agaroosin jähmettymään, eikä liuos leviä tasaisesti peitinlasin alle, vaan tekee leikkeet käyttökelvottomiksi. Esimerkissä ei ole leikkeitä.

Leikkeet kuvattiin Epson Scan –skannerilla pipetoinnin jälkeen. Kuvaamisen jälkeen leikkeitä inkuboitiin kostealla paperilla vuoratussa metalliastiassa +37 °C:ssa 6 tuntia, jonka jälkeen leikkeet kuvattiin uudelleen. Joistain leikkeistä otettiin kuvia myös 1, 2, 3, 8, 12 tai 24 tunnin kuluttua, jotta löydettäisiin aikapiste, jossa entsyymireaktion voitaisiin olettaa saavuttaneen maksiminsa. Kuuden tunnin inkubaatio havaittiin optimaaliseksi leikkeiden ulkonäön ja entsyymireaktion etenemisen kannalta.

6.2.10 Tilastolliset menetelmät

Tilastolliset analyysit tehtiin PASW Statistics 18 –ohjelmalla. Koska vertailtavia ryhmiä oli kaksi, käytettiin joko parametrista Studentin t-testiä tai ei-parametrista Mann-

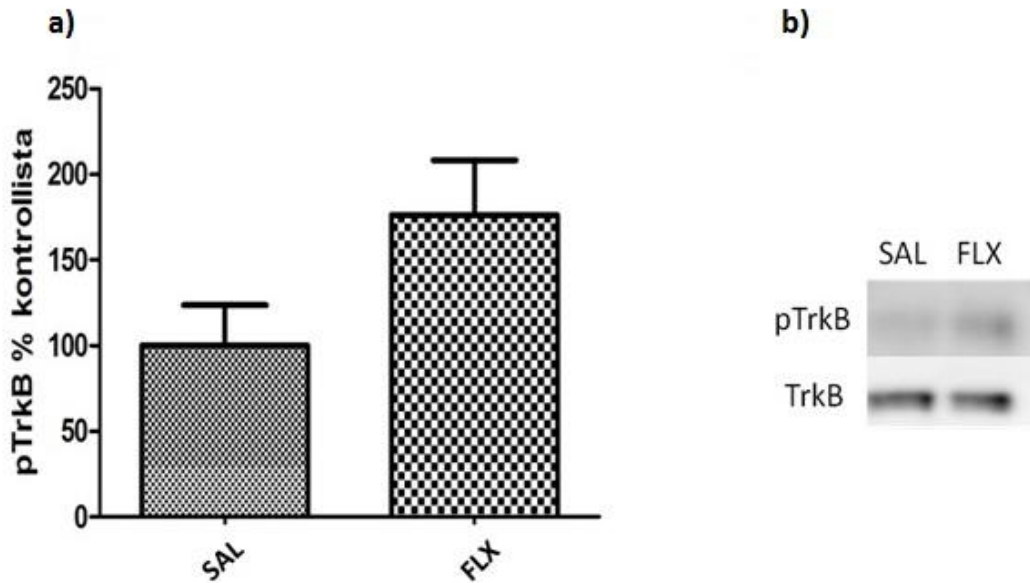
Whitney U –testiä, jos ryhmien varianssit erosivat toisistaan eikä aineisto noudattanut normaalijakaumaa. Tulosta pidettiin tilastollisesti merkitseväenä, jos p-arvo oli $< 0,05$. Kuvaajat piirrettiin GraphPad Prism 5 –ohjelmalla.

6.3 Tulokset

6.3.1 Akuutti fluoksetiinikäsittely

TrkB-reseptorin aktivoituminen

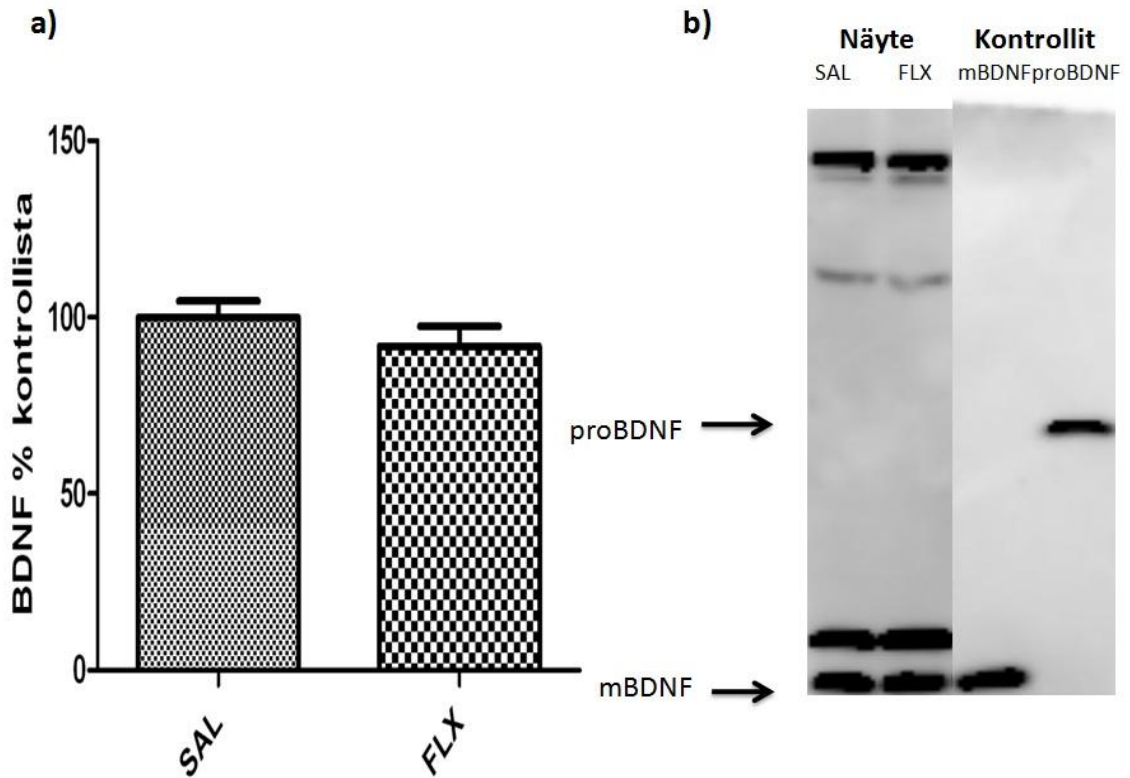
TrkB-reseptorin aktivoitumista tutkittiin western blot –menetelmällä lektiinisaostetuista hippokampusnäytteistä. Vasta-aine tunnisti TrkB-reseptorin katalyyttisen alueen tyrosiinitähteiden 705 ja 706 fosforylaation. Katalyyttisen alueen fosforyloituminen tapahtuu ensimmäisenä tyrosiinikinaasireseptorin aktivoituessa (Segal ym. 1996), joten sitä voidaan käyttää osoittamaan reseptorin aktivoituminen. TrkB-reseptorin fosforylaatio lisääntyi fluoksetiiniryhmän hiirillä, mutta ei tilastollisesti merkitsevästi ($p=0,089$) (Kuva 7). Tulokset normalisoitiin näytteiden TrkB-reseptorin kokonaismäärään, joka ei muuttunut fluoksetiinikäsittelyn vaikutuksesta.



Kuva 7. Akuutin fluoksetiinikäsittelyn vaikutusta TrkB-reseptorin aktivoitumiseen hiiren hippokampuksessa tutkittiin western blot –menetelmällä. a) Fluoksetiiniryhmässä (30 mg/kg, i.p., 1 h, n=5) TrkB-reseptorin fosforylaatio oli lisääntynyt verrattuna kontrolliryhmään (saliini, i.p., 1 h, n=5), mutta ei tilastollisesti merkitsevästi ($p=0,089$, Studentin t-testi). Vasta-aine tunnisti TrkB-reseptorin katalyyttisen alueen tyrosiini 705/6:n fosforyloitumisen lektiinisaostetuista näytteistä. Tulokset on esitetty kontrolliin suhteutettuna keskiarvona \pm keskiarvon keskivirhe (SEM). b) Kuva western blot – tuloksista. Tulokset normalisoitiin näytteiden TrkB-reseptorin kokonaismäärään, joka ei muutu fluoksetiinikäsittelyn vaikutuksesta.

BDNF-proteiinitasot

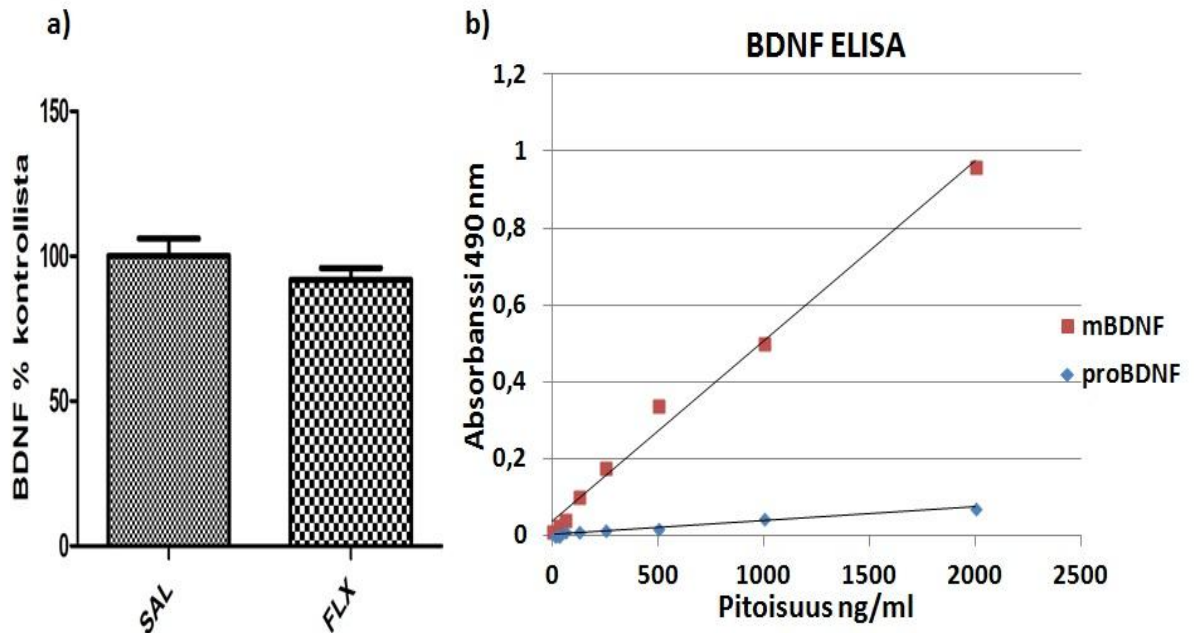
Fluoksetiinikäsittelyn vaikutusta hiirten hippokampuksen BDNF-proteiinitasoihin tutkittiin western blot- ja ELISA-menetelmillä. BDNF-proteiinin määrässä ei ollut eroa fluoksetiiniryhmän (30mg/kg, i.p., 1h, n=5.) ja kontrolliryhmän (saliini, i.p., 1h, n=5) hiirten välillä. Tulokset olivat samanlaiset molemmilla menetelmillä mitattuna (Kuva 8a ja Kuva 9a).



Kuva 8. Akuutin fluoksetiinikäsittelyn vaikutusta BDNF-proteiinin määrään hiiren hippokampus-näytteissä tutkittiin western blot-menetelmällä. Fluoksetiinikäsittely (30 mg/kg, i.p. 1 h, n=5) ei aiheuttanut muutoksia BDNF-proteiinin määrässä kontrolliryhmään (saliini, i.p., 1 h, n=5) verrattuna. Tulokset on esitetty kontrolliin suhteutettuna keskiarvona \pm keskiarvon keskivirhe (SEM). b) Kuva western blot – tuloksista. Western blot-menetelmällä hiiren hippokampus-näytteissä ei havaittu BDNF:n pro-muotoa lainkaan, vaikka vasta-aine pystyy tunnistamaan rekombinantititeknikalla tuotetun proBDNF:n. Kypsän BDNF:n vasta-aine kuitenkin tunnistaa näytteistä selkeästi.

Sekä western blot- että ELISA-menetelmässä käytetyt BDNF-vasta-aineet tunnistavat kypsän muodon lisäksi BDNF:n esiasteen, proBDNF:n. Western blot-menetelmässä proBDNF erottuu kypsästä BDNF:stä suuremman molekyylipainonsa vuoksi. Hippokampus-näytteissä proBDNF:a ei kuitenkaan voitu havaita, ilmeisesti sen vähäisen määrän vuoksi (Kuva 8b). Kontrollina käytetyn rekombinantititeknikalla valmistetun proBDNF:n vasta-aine kuitenkin tunnistaa. ELISA –menetelmässä proBDNF:ä ja BDNF:ä ei voida erottaa toisistaan, mutta se tunnistaa proBDNF:ä

huomattavasti heikommin kuin kypsää BDNF:ä, joten proBDNF:n ei pitäisi merkittävästi vaikuttaa BDNF-ELISA:lla saatuun tulokseen (Kuva 9b).



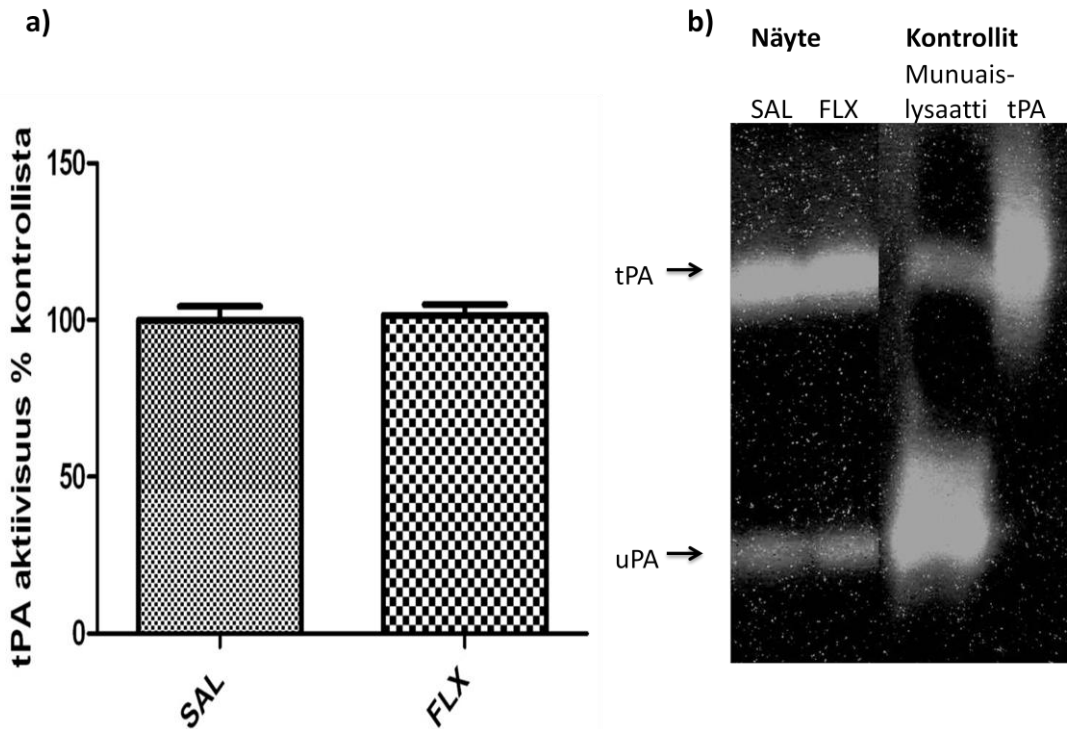
Kuva 9. Akuutin fluoksetiinikäsittelyn vaikutusta BDNF-proteiinin määrään hiiren hippokampuksessa tutkittiin ELISA-menetelmällä. a) Fluoksetiinikäsittely (30 mg/kg, i.p., 1 h, n=5) ei aiheuttanut muutoksia BDNF-proteiinin määrässä kontrolliryhmään (saliini, i.p., 1 h, n=5) verrattuna. Tulokset on esitetty kontrolliin suhteutettuna keskiarvona \pm keskiarvon keskivirhe (SEM). b) ELISA-menetelmässä näytteiden BDNF-pitoisuus määritetään standardisuoran perusteella. Menetelmä tunnistaa BDNF:n kypsän muodon huomattavasti paremmin kuin proBDNF:n, eli näytteiden mahdolliset proBDNF-pitoisuudet eivät merkittävästi vaikuta lopputulokseen.

tPA:n aktiivisuus ja proteiinitasot

tPA:n aktiivisuutta hiiren hippokampusnäytteissä tutkittiin SDS-PAGE –tsymografia -menetelmällä. SDS-PAGE –tsymografiassa näytteiden proteiinit erotellaan geielektroforeesin avulla ja niiden entsyymiaktiivisuutta tutkitaan geelissä olevien substraattien avulla. tPA:n aktiivisuutta tutkittaessa geeliin on lisätty plasminogeenia, jonka tPA muuttaa aktiiviseksi plasmiiniksi. Plasmiini pilkkoo geeliin lisätyn maitojauheen kaseiineja, mikä voidaan havaita värjätystä geelistä vaaleina alueina. SDS-PAGE –tsymografian avulla voidaan erottaa tPA:n aktiivisuus aivoissa esiintyvän toisen plasminogeeniaktivaattorin, uPA:n, aktiivisuudesta, sillä ne ajautuvat geelillä eri

tavoin erilaisten molekyylipainojensa vuoksi (Kuva 10b). Munuaisessa esiintyy runsaasti uPA:ta ja jonkin verran myös tPA:ta, joten sitä ja rekombinanttitekniikalla tuotettua tPA:ta käytettiin menetelmän toimivuuden kontrollina.

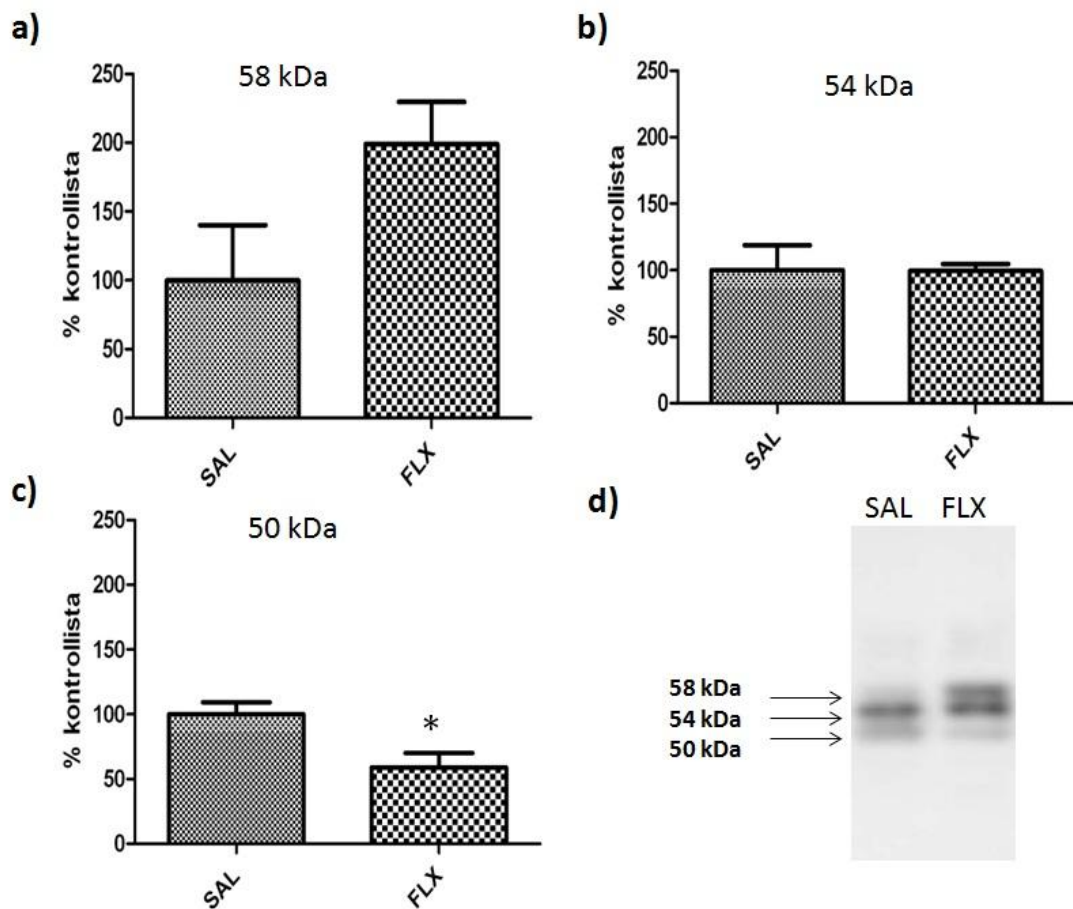
tPA:n aktiivisuudessa ei havaittu eroa fluoksetiini-ryhmän (30 mg/kg, i.p., 1 h, n=5) ja kontrolliryhmän (saliini, i.p., 1 h, n=5) välillä (Kuva 9a).



Kuva 10. Akuutin fluoksetiinikäsittelyn vaikutusta kudoksen plasminogeeniaktivaattorin (tPA) aktiivisuuteen hiiren hippokampuksessa tutkittiin SDS-PAGE –tsymografia -menetelmällä. a) tPA:n aktiivisuudessa ei havaittu merkitsevää eroa fluoksetiini- (30 mg/kg, i.p., 1h, n=5) ja kontrolliryhmien (saliini, i.p., 1h, n=5) välillä. Tulokset on esitetty kontrolliin suhteutettuna keskiarvona \pm keskiarvon keskivirhe (SEM). b) Kuva SDS-PAGE –tsymografia –tuloksista, jossa entsymaattinen aktiivisuus havaitaan vaaleina alueina. Näytteiden kanssa samalle geelille ajettiin hiiren munuaislysaattia, jossa esiintyy voimakasta urokinaasiplasminogeeniaktivaattorin (uPA) aktiivisuutta ja jonkin verran tPA-aktiivisuutta. Näytteiden ja munuaislysaatin entsyymiaktiivisuus voidaan havaita samalla kohdalla geelissä kuin rekombinanttitekniikalla valmistetun tPA:n. Pienemmän molekyylipainonsa vuoksi uPA ajautuu geelillä alemmas kuin tPA. Näytteiden uPA-aktiivisuus on heikompaa kuin tPA-aktiivisuus.

tPA-proteiinitasojia tutkittiin western blot –menetelmällä. tPA-vasta-aine tunnisti useita fluoksetiinikäsittelyn seurauksena reguloituvia proteiineja. Ei kuitenkaan ole varmaa, ovatko proteiinit mahdollisesti tPA:n eri tavoin glykosyloituneita muotoja vai vasta-aineen epäspesifistä sitoutumista, sillä hiiren proteiinia vastaan valmistettu vasta-aine ei tunnistanut rekombinanttitekniikalla valmistettua ihmisen tPA-proteiinia eikä saatavilla ollut tPA-poistogeenisten hiirten kudosta. SDS-PAGE –tsymografiassa tPA:n aktiivisuus kuitenkin havaittiin geelillä samassa kohdassa kuin nämä proteiinit (50-58 kDa).

Molekyylipainoltaan suurimman proteiinin (n. 58 kDa) määrä lisääntyi fluoksetiini-ryhmän (30 mg/kg, i.p., 1 h, n=5) hiirillä kontrolliryhmään (saliini, i.p., 1 h, n=5) verrattuna, mutta ei tilastollisesti merkitsevästi ($p=0,085$) (Kuva 11). Fluoksetiinikäsittelyllä ei ollut vaikutusta keskimmäiseen proteiinin (n. 54 kDa) määrään, mutta pienimmän proteiinin (n. 50 kDa) määrä väheni fluoksetiinikäsittelyn seurauksena tilastollisesti merkitsevästi ($p=0,022$).



Kuva 11. Akuutin fluoksetiinikäsittelyn vaikutuksia kudoksen plasminogeeniaktivaattorin (tPA) proteiinipitoisuuksiin tutkittiin hiiren hippokampusnäytteistä Western blot –menetelmällä. a) Ylimmän proteiinin (n. 58 kDa) määrä lisääntyi fluoksetiinikäsittelyn (30 mg/kg, i.p., 1 h, n=5) seurauksena, mutta ei tilastollisesti merkitsevästi ($p=0,085$). b) Keskimmäisessä proteiinissa (n. 54 kDa) ei havaittu muutosta käsittelyryhmien välillä. c) Alimman proteiinin (n.50 kDa) määrä väheni fluoksetiinia saaneilla hiirillä tilastollisesti merkitsevästi ($p=0,022$, Studentin t-testi). Tulokset on esitetty kontrolliin (saliini, i.p., 1h, n=5) suhteutettuna keskiarvona \pm keskiarvon keskivirhe (SEM). d) Kuva western blot –tuloksesta, jossa tPA -vasta-aineen tunnistamat proteiinit ovat erottuneet toisistaan.

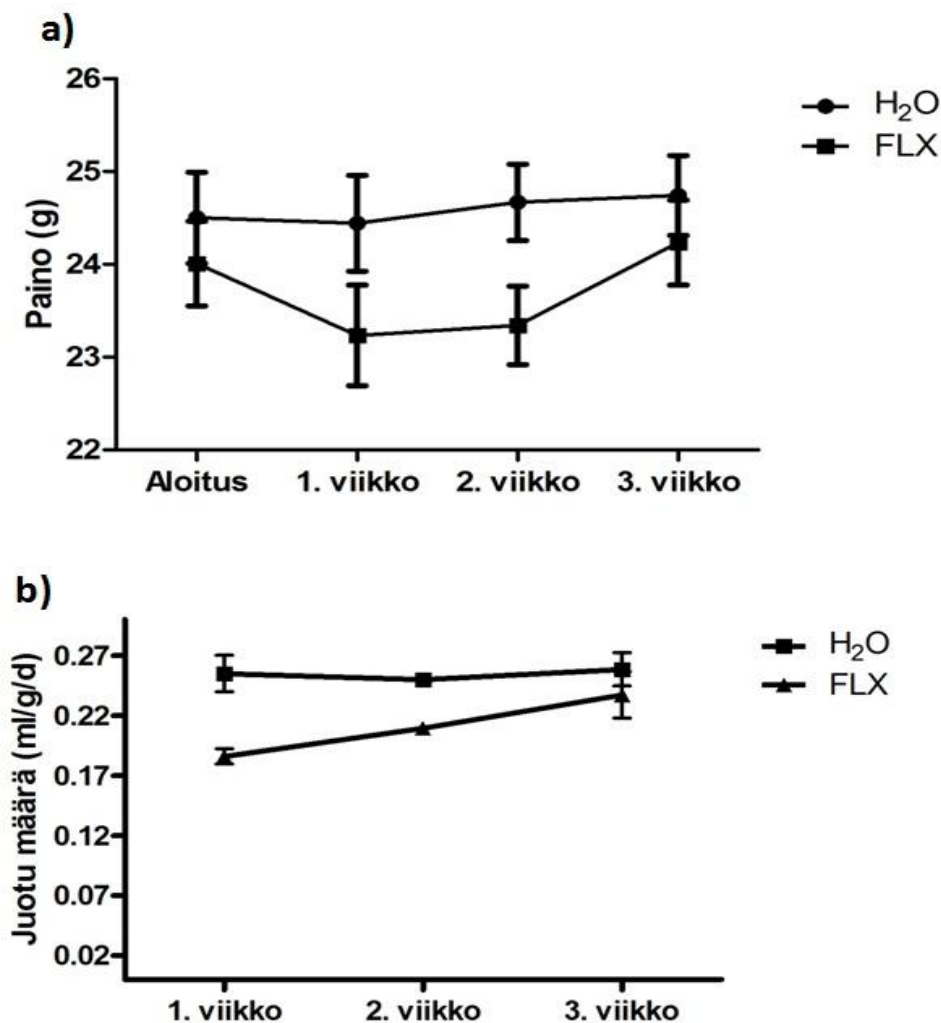
*: $p < 0,05$, Studentin t-testi.

6.3.2 Krooninen fluoksetiinikäsittely

Fluoksetiinin annostelu juomavedessä

Fluoksetiinista valmistettiin vesiliuos (0,08 mg/ml), jota juotettiin yksittäishäkeissä oleville hiirille falcon-putkista kolmen viikon ajan (21 pv). Kontrolliryhmän hiiret joivat

samanlaisista falcon-putkista vesijohtovettä. Hiirten painoa seurattiin punnitsemalla kerran viikossa ja juotu määrä mitattiin joka toinen päivä liuosten vaihdon yhteydessä. Fluoksetiiniiryhmän hiiret joivat kokeen ensimmäisen viikon aikana vähemmän kuin kontrolliryhmän hiiret ja niiden paino laski (Kuva 12). Kokeen lopussa kolmen viikon kuluttua fluoksetiiniiryhmän hiirten paino ja nesteenkulutus olivat kuitenkin palautuneet kontrolliryhmän tasolle. Nesteenkulutuksen ja painon perusteella laskettu hiirten keskimääräinen fluoksetiiniannos oli noin 15 mg/kg/pv.

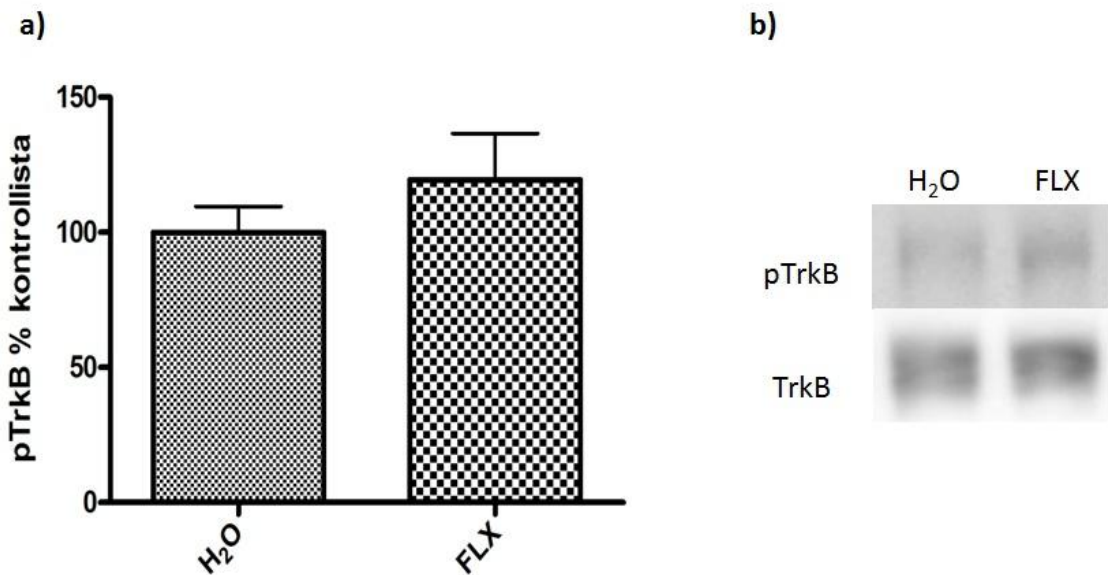


Kuva 12. Hiirille juotettiin fluoksetiini-vesiliuosta (0,08 mg/ml) tai vesijohtovettä kolmen viikon ajan. a) Fluoksetiinijuoton vaikutus hiirten painoon. Fluoksetiini-liuosta juoneiden hiirten paino laski ensimmäisen viikon aikana, mutta nousi kokeen lopussa samalle tasolle vesiryhmän kanssa (n=12/ryhmä). b) Nesteenkulutuksen keskiarvo hiiren painogrammaa kohden. Vesiryhmän juomaveden kulutus pysyi koko ajan

samana, fluoksetiini-vesiliuosta juoneilla hiirillä juotu määrä laski alussa, mutta nousi sitten samalle tasolle vesiryhmän kanssa.

TrkB-reseptorin aktivoituminen

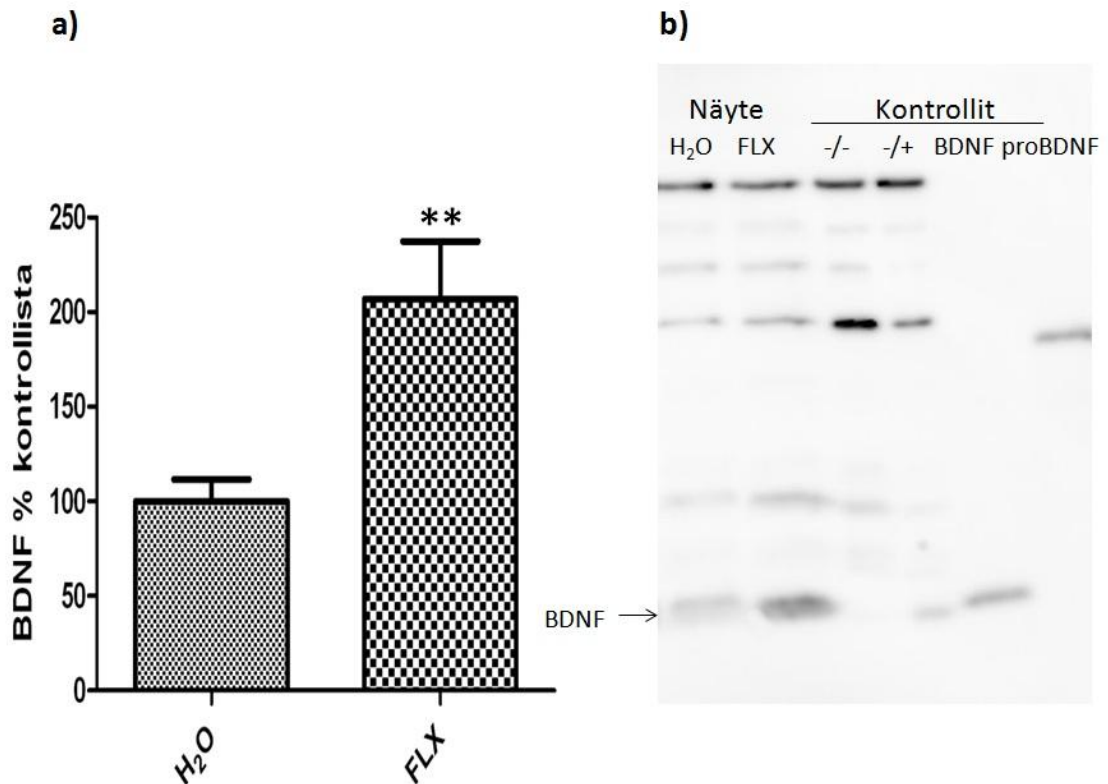
Kroonisen fluoksetiinikäsittelyn vaikutusta TrkB-reseptorin aktivoitumiseen tutkittiin lektiinisaostetuista hippokampusnäytteistä western blot –menetelmällä. Käytetty vasta-aine tunnisti TrkB-reseptorin katalyyttisen alueen tyrosiinien 705 ja 706 fosforylaation. Krooninen fluoksetiinikäsittely (3 vko, juomavedessä 0,08 mg/ml, n. 15 mg/kg/pv, n=8) ei aiheuttanut muutoksia TrkB-reseptorin fosforyloitumisessa vesiryhmään verrattuna (Kuva 13). Tulos normalisoitiin näytteiden TrkB-reseptorien kokonaismäärään.



Kuva 13. Krooninen fluoksetiinikäsittely (3 vko, juomavedessä 0,08mg/ml, n.15mg/kg/pv, n=8) ei aiheuttanut tilastollisesti merkitsevää TrkB-reseptorin aktivoitumista hiiren hippokampusessa western blot-menetelmällä tutkittuna vesiryhmään (3 vko, n=8) verrattuna. Näytteistä tehtiin lektiinisaostus ja TrkB-reseptorin katalyyttisen alueen fosforyloitumista käytettiin aktivoitumisen indikaattorina. Tulokset on esitetty kontrolliin suhteutettuna keskiarvona \pm keskiarvon keskivirhe (SEM). b) Kuva western blot –tuloksista. Tulokset normalisoitiin TrkB-reseptorin kokonaismäärään, joka ei muuttunut fluoksetiinikäsittelyn vaikutuksesta.

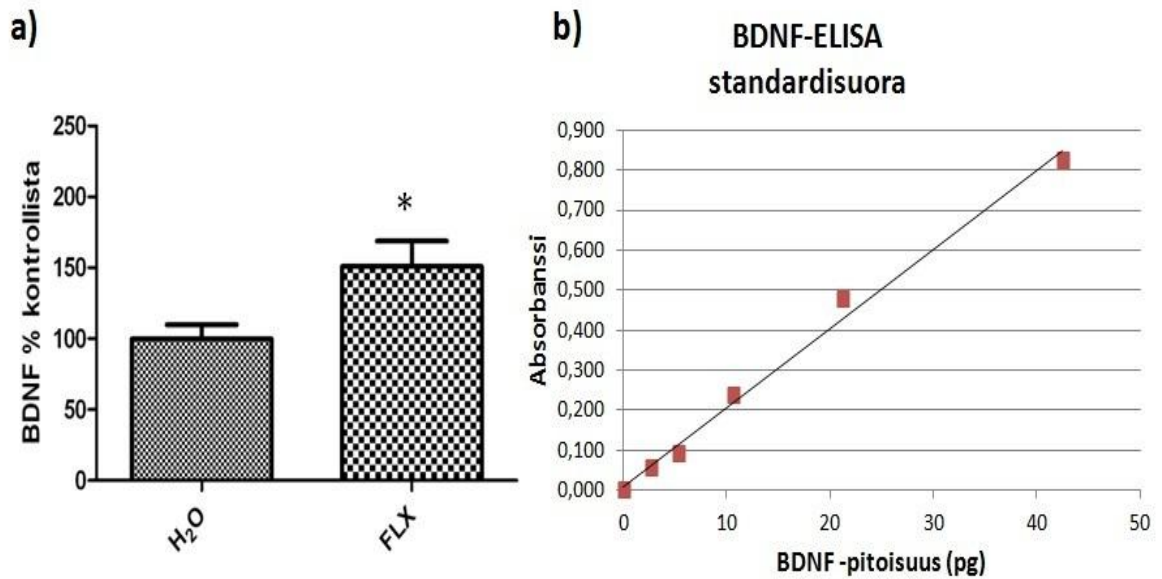
BDNF-proteiinitasot

Fluoksetiinin vaikutusta hiiren hippokampuksen BDNF-proteiinitasoihin tutkittiin western blot- ja ELISA –menetelmien avulla. BDNF-proteiinitasot nousivat fluoksetiiniryhmän (3 vko, juomavedessä 0,08 mg/ml, n. 15 mg/kg/pv, n=8) hiirillä vesiryhmään verrattuna tilastollisesti merkitsevästi. Western blot -menetelmässä fluoksetiiniryhmän hippokampuksen BDNF-proteiinipitoisuus oli noin kaksinkertainen kontrolliryhmään verrattuna ($p=0,009$, Studentin t-testi) (kuva 14a). Western blotissa näytteiden kanssa samalle geelille ajettiin vasta-aineen toiminnan varmistamiseksi BDNF-poistogeenisten (conditional knock out) ja BDNF-heterotsygoottihiirten hippokampuskudosta, sekä rekombinanttitekniikalla valmistettua BDNF:ä ja proBDNF:ä (kuva 14b). Vasta-aine tunnisti sekä BDNF:n että proBDNF:n. BDNF-poistogeenisten hiirten hippokampuksessa ei ollut havaittavissa lainkaan BDNF:ä ja BDNF-heterotsygoottihiirillä BDNF:ä oli huomattavasti vähemmän kuin villityypin hiirillä.



Kuva 14. BDNF-proteiinin määrä hippokampuksessa lisääntyi fluoksetiini-liuosta juoneilla hiirillä (3 vko, 0,08mg/ml, n.15mg/kg/d, n=8) vettä juoneisiin hiiriin (3 vko, n=8) verrattuna tilastollisesti merkitsevästi Western blot –menetelmällä mitattuna ($p=0,009$, Studentin t-testi). Tulokset on esitetty kontrolliin suhteutettuna keskiarvona \pm keskiarvon keskivirhe (SEM). b) Kuva western blot –tuloksista. Samalle geelille näytteiden kanssa ajettiin kudosta BDNF-poistogeenisistä (conditional knock out, -/-) ja BDNF-heterotsygoottihiiristä (+/-) sekä rekombinanttitekniikalla tuotettua BDNF:ä ja proBDNF:ä. BDNF-poistogeenisen hiiren hippokampusnäytteessä ei voida havaita lainkaan BDNF:ä ja heterotsygoottihiiren näytteessä BDNF:ä esiintyy vähemmän kuin villityypin hiirillä. Vasta-aine tunnisti rekombinanttitekniikalla tuotetun proBDNF:n, vaikka näytteistä sitä ei voida havaita. **: $p < 0,01$.

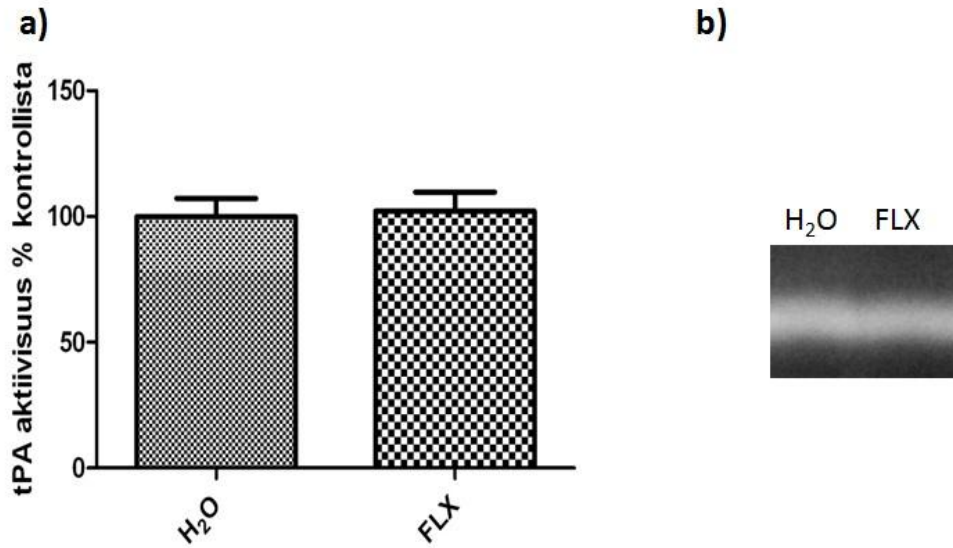
BDNF-ELISA-menetelmässä fluoksetiiniiryhmän hiirillä BDNF-tasot olivat kohonneet vesiryhmään verrattuna noin 1,5-kertaiseksi ($p=0,025$, Studentin t-testi) (Kuva 15a). ELISA-menetelmässä BDNF-pitoisuuden määrittäminen tehdään BDNF-proteiinistandardinäytteiden muodostaman standardisuoran avulla (Kuva 15b). BDNF-pitoisuudet normalisoidaan proteiinimäärään eli näytteiden lopulliset BDNF-pitoisuudet on laskettu pikogrammoina proteiinimilligrammaa kohden.



Kuva 15. Kroonisen fluoksetiinisäätelyn vaikutus BDNF-proteiinimäärään hiiren hippokampuksessa ELISA –menetelmällä mitattuna. a) Fluoksetiinisäätely (juomavedessä 0,08mg/ml, n. 15 mg/kg/pv, 3 vko, n=8) lisäsi BDNF-proteiinimäärää vesiryhmään verrattuna tilastollisesti merkitsevästi ($p=0,025$, Studentin t-testi). Tulokset on esitetty kontrolliin suhteutettuna keskiarvona \pm keskiarvon keskivirhe (SEM). b) Näytteiden BDNF-pitoisuudet määritettiin BDNF-proteiinistandardinäytteiden muodostaman standardisuoran perusteella. *: $p<0,05$;

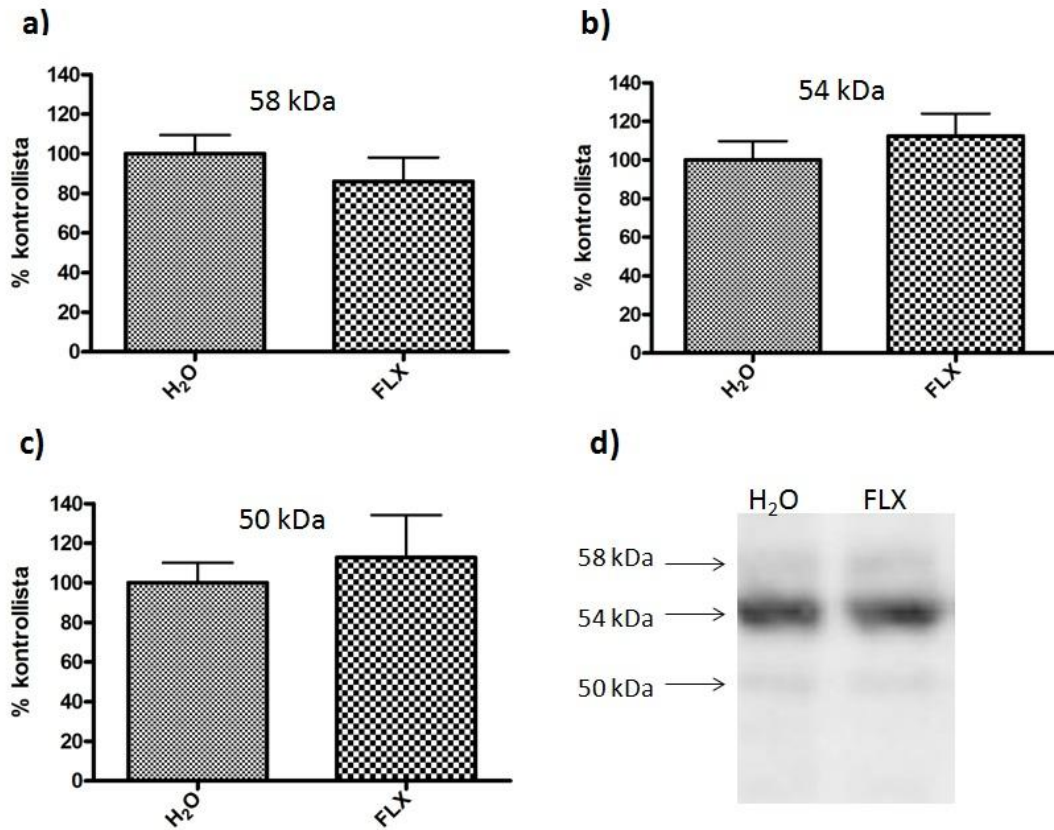
tPA:n aktiivisuus ja proteiinitasot

Hiiren hippokampusnäytteiden tPA-aktiivisuutta tutkittiin SDS-PAGE –tsymografia –menetelmällä. Fluoksetiiniryhmän (juomavedessä 0,08 mg/ml, n. 15 mg/kg/pv, 3 vko, n=8) hiirillä tPA-aktiivisuudessa ei ollut eroa vesiryhmän hiiriin (n=8) verrattuna. (Kuva 16).



Kuva 16. Kolmen viikon fluoksetiinikäsittely (juomavedessä 0,08mg/ml, n. 15mg/kg/pv, n=8) ei aiheuttanut muutosta hiiren hippokampuksen tPA-aktiivisuudessa vesiryhmään (3 vko, n=8) verrattuna SDS-PAGE –tSYMOGRAFIALLA tutkittuna. Tulokset on esitetty kontrolliin suhteutettuna keskiarvona ± keskiarvon keskivirhe (SEM). b) Kuva SDS-PAGE –tSYMOGRAFIA –menetelmän tuloksesta, jossa tPA –aktiivisuus näkyy vaaleana alueena.

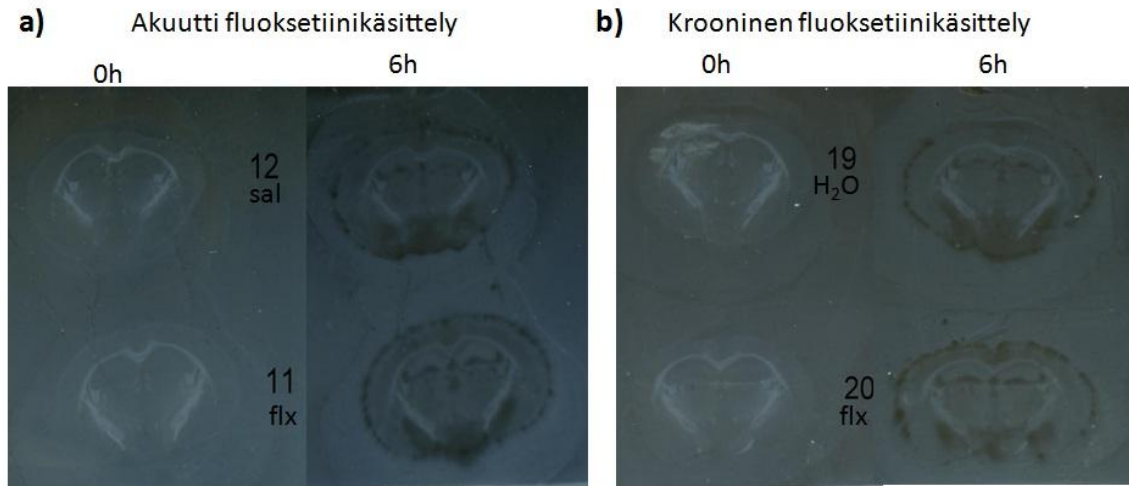
Krooninen fluoksetiinikäsittely (juomavedessä 0,08mg/ml, n. 15mg/kg/pv, n=8) ei aiheuttanut muutoksia tPA-vasta-aineen tunnistamisessa kolmessa 50-58 kDa proteiinissa hiiren hippokampuksessa western blot –menetelmällä tutkittuna (Kuva 17).



Kuva 17. tPA -vasta-aine tunnisti kolme erikokoista proteiinia hiiren hippokampusnäytteistä Western blot –menetelmällä. A) Ylimmän proteiinin (n. 58 kDa), b) keskimmäisen proteiinin (n. 54 kDa) ja c) alimman proteiinin (n.50 kDa) määrässä ei havaittu muutoksia fluoksetiiniliuosta (0,08mg/ml, n.15mg/kg/pv, n=8) kolmen viikon ajan juoneiden ja vesiryhmän hiirten (3vko, n=8) välillä. Tulokset on esitetty kontrolliin suhteutettuna keskiarvona \pm keskiarvon keskivirhe (SEM). d) Kuva western blot –tuloksesta, jossa näkyy tPA -vasta-aineen tunnistamat kolme proteiinia.

6.3.3 *In situ* –tsymografia

tPA-aktiivisuutta ja sen sijaintia hiiren aivoleikkeissä tutkittiin *in situ* –tsymografia –menetelmällä. Mahdollisia akuutin (30 mg/kg, i.p., 1 h, n=4) ja kroonisen fluoksetiinisäätelyn (0,08 mg/ml juomavedessä, n. 15 mg/kg/pv, 3 vko, n=4) aiheuttamia muutoksia tPA-aktiivisuuden sijainnissa kontrolliryhmiin verrattuna tarkasteltiin silmämääräisesti. Selkeitä eroja tPA-aktiivisuuden sijainnissa tai määrässä ei havaittu akuutin eikä kroonisen fluoksetiinisäätelyn vaikutuksesta (kuva 18).



Kuva 18. Kudoksen plasminogeeniaktivaattorin aktiivisuuden sijaintia aivoleikkeissä tutkittiin in situ -tymografian avulla. Samat leikkeet ennen plasminogeeni-maito -inkubaatiota ja 6 tuntia inkubaation jälkeen, jolloin tPA:n aktiivisuutta voidaan havaita hippokampuksessa, amygdalassa ja hypothalamuksessa sekä aivokuorella (tummat alueet). a) Akuutin fluoksetiinikäsittelyn vaikutus tPA:n aktiivisuuteen. Ylempi leike on kontrolliryhmän (saliini, i.p., 1 h) hiireltä ja alempi fluoksetiinikäsittelyn (30 mg/kg, i.p., 1 h) saaneelta hiireltä. Selkeitä eroja kontrolliryhmään verrattuna ei voida havaita. b) Kroonisen fluoksetiinikäsittelyn vaikutus tPA:n aktiivisuuteen. Ylempi leike on kontrolliryhmän hiireltä (vesi, 3 vko) ja alempi fluoksetiiniliuosta juoneelta hiireltä (0,08 mg/ml juomavedessä, n. 15 mg/kg/pv, 3 vko). Muutoksia tPA-aktiivisuuden sijainnissa ei voida havaita ryhmien välillä.

6.4 Tulosten pohdinta

6.4.1 Akuutti fluoksetiinikäsittely

Fluoksetiinin kerta-annoksen on aikaisemmin havaittu aktivoivan TrkB-reseptoria jyräjän hippokampuksessa ja etuaivokuorella (Rantamäki ym. 2007; Saarelainen ym. 2003). Tässä kokeessa TrkB-reseptorin aktivoitumisen merkkinä käytettiin reseptorin katalyyttisen alueen (Y705/6) fosforyloitumista. TrkB-reseptorissa on useita fosforyloituvia kohtia, joista katalyyttinen alue fosforyloituu ensimmäisenä reseptorin aktivoituessa (Segal ym. 1996). Akuutin fluoksetiinikäsittelyn aikaansaama TrkB-

reseptorin katalyyttisen alueen fosforyloituminen oli erittäin lähellä tilastollista merkitsevyyttä ($p=0,089$). Tässä kokeessa tilastollisen merkitsevyyden puuttuminen aiheutui todennäköisesti hajonnasta hiirten välillä, sillä yhdellä kontrolliryhmän hiirellä fosforyloituminen oli hyvin voimakasta ja yhdellä fluoksetiinihiirellä vaste oli kontrolliryhmän tasolla.

BDNF-proteiinimäärä hippokampuskudoksessa ei muuttunut akuutin fluoksetiini-käsittelyn seurauksena. On kuitenkin mahdollista, että BDNF:n vapautuminen solusta on lisääntynyt, sillä se tapahtuu hyvin paikallisesti ja hermosolujen aktiivisuudesta riippuvaisesti (Lu 2003). Käytetyt menetelmät, ELISA ja western blot, eivät sovellu solunsisäisen ja -ulkoisen BDNF:n erottamiseen, joten mahdollista BDNF:n lisääntynyttä vapautumista solusta ei voida havaita. On myös mahdollista, että TrkB-reseptori aktivoituu ns. transaktivaation kautta ilman BDNF:n sitoutumista reseptoriin (Lee ym. 2002).

SDS-PAGE -tsymografialla tutkittuna tPA:n aktiivisuus ei muuttunut fluoksetiinikäsittelyn vaikutuksesta. Tämä tukee havaintoa, jonka mukaan muutoksia ei havaittu myöskään BDNF-proteiinitasoissa. tPA pilkkoo BDNF:n esimuotoa proBDNF:ä solun ulkopuolella kypsään muotoon ja voi sitä kautta vaikuttaa BDNF:n määrään.

tPA:n vapautuminen solusta tapahtuu hermoston aktiivisuuden seurauksena (Galandris ym. 1996). Myös tPA:n mRNA:n määrä voi lisääntyä nopeasti, sillä se on ns. immediate early gene (Qian ym. 1993). tPA-proteiinitasoja tutkittiin western blot -menetelmällä, mutta ongelmana oli vasta-aineen mahdollinen epäspesifinen sitoutuminen. Vasta-aine tunnisti kolme hieman erikokoista proteiinia (50, 54 ja 58 kDa), jotka reguloituivat fluoksetiinikäsittelyn vaikutuksesta. On mahdollista, että kyseessä ovat esimerkiksi tPA:n eri tavoin glykosyloituneet muodot tai täysin epäspesifiset proteiinit. tPA-poistogeenisten hiirten kudokset olisi ollut tärkeä kontrolli western blot-menetelmässä, mutta sitä ei ollut saatavilla. Mielenkiintoisesti fluoksetiini vaikutti suurimpaan ja pienimpään proteiiniin päinvastaisesti lisäten 58 kDa- ja vähentäen 50 kDa -proteiinin määrää. On mahdollista, että kyseessä on molekyylin muuttuminen toiseen muotoon fluoksetiinikäsittelyn vaikutuksesta. Tällaiset muutokset proteiinien rakenteessa voivat tapahtua hyvin nopeasti.

Normaalisti tPA eritetään solusta kahden glykoformin seoksena (Allen ym. 1995), eli sellainen muoto, jossa ei ole lainkaan sokerimolekyylejä (tässä tapauksessa 50 kDa -proteiini), on vielä solun sisällä prosessoitavana. Jos kyseessä olisivat tPA:n eri tavoin glykosyloituneet muodot, fluoksetiini lisääisi voimakkaammin glykosyloituneen muodon (58 kDa -proteiini) määrää. Tämä tapahtuisi lisäämällä vähiten glykosyloituneeseen muotoon sokeriryhmiä eli voimistamalla epä kypsän proteiinin prosessointia solusta eritettävään muotoon. 54 kDa -proteiinin määrään fluoksetiinilla ei ollut vaikutusta. Eri tavalla glykosyloituneilla tPA-molekyyleillä on eroja aktiivisuudessa siten, että kahteen asparagiini-aminohappoon glykosyloitunut tPA (eli keskimäinen proteiini) on noin kaksi kertaa aktiivisempi kuin voimakkaimmin glykosyloitunut muoto (Wittwer ja Howard 1990). Fluoksetiini voisi siis vaikuttaa tPA-aktiivisuuteen säätelemällä glykosyloituneiden muotojen suhdetta. Käsittelemällä näytteet proteiinin sokeriosia pilkkovalla entsyymillä (PNGase) voitaisiin selvittää, ovatko nämä kolme proteiinia eri tavalla glykosyloituneita tPA:n muotoja. Kun entsyymillä käsitellyt näytteet ajetaan geelille, pitäisi kaikkien kolmen muodon olla samankokoisia eli vasta-aineen pitäisi tunnistaa kolmen sijasta vain yksi proteiini.

tPA voi sitoutua myös suoraan solukalvon reseptoreihin, esimerkiksi LRP1-reseptoriin (Hu ym. 2006). tPA:n sitoutuminen LRP1-reseptoriin aktivoi solunsisäisiä signaalintireittejä, jotka voisivat johtaa esimerkiksi TrkB-reseptorin transaktivaatioon. LRP1-reseptorin merkitystä TrkB-reseptorin aktivoitumisessa olisi mahdollista tutkia käyttämällä LRP1-inhibiittoria RAP:a. Jos RAP estäisi fluoksetiinin aikaansaaman TrkB-reseptorin aktivaation, osoittaisi se LRP1-reseptorisignaalinnin osallistuvan fluoksetiinin vaikutusten välittämiseen.

SDS-PAGE -tsymografiassa tPA:n aktiivisuutta havaittiin samalla kohdalla geelissä kuin missä vasta-aineen tunnistamat proteiinit ovat. Sekä western blotissa että SDS-PAGE -tsymografiassa käytetyt geelit olivat 10 % -polyakryyliamidigeeliejä ja niissä käytettiin samaa proteiinikokomarkkeria. SDS-PAGE -tsymografiassa ei kuitenkaan voitu havaita aktiivisuutta kuin yhdessä kohdassa, mutta degradaatioalueen koon vuoksi voi olla hankala erottaa hyvin lähellä toisiaan olevia proteiineja. SDS-PAGE -tsymografiassa kontrollinäytteinä oli rekombinanttitekniikalla valmistettua tPA:a ja hiiren munuaislysaattia, joiden entsyymäattista aktiivisuutta voitiin havaita samalla

kohdalla geelissä kuin hippokampusnäytteissä. Nämä havainnot tukevat oletusta, että vasta-aineen tunnistamat proteiinit ovat tPA:a.

6.4.2 Krooninen fluoksetiinikäsittely

Yksittäishäkissä oleville hiirille juotettiin fluoksetiinia (0,08 mg/ml) juomaveden mukana kolmen viikon ajan. Keskimääräinen fluoksetiiniannos oli noin 15 mg/kg/päivä. Hiirten painoa ja juodun nesteen määrää seurattiin kokeen ajan. Fluoksetiiniryhmän hiirten paino laski ensimmäisen juottoviikon aikana. Tämä johtui todennäköisesti siitä, että fluoksetiiniryhmän hiiret joivat keskimäärin vähemmän kuin vesiryhmän hiiret. Fluoksetiiniliuoksen makuun tottuminen voi viedä aikaa, minkä vuoksi hiiret aluksi juovat vähemmän. Juotu määrä kuitenkin lisääntyi toisella ja kolmannella viikolla ja oli lopulta yhtä suuri kuin kontrolliryhmän hiirillä. Kokeen loppuessa kummankin ryhmän hiiret olivat keskimäärin yhtä painavia eli fluoksetiiniryhmän hiirten paino oli noussut takaisin lähtötasolle.

TrkB-reseptorin fosforylaatiota tutkittiin samoin kuin akuutin kokeen yhteydessä, eikä merkitsevää aktivoitumista havaittu fluoksetiiniryhmän hiirillä. TrkB-reseptorin fosforyloituminen on kuitenkin havaittu samanlaisessa koeasetelmassa, jossa fluoksetiinia juotettiin hiirille kolmen viikon ajan (Rantamäki ym. 2007). Myös kroonisesti vatsaonteloon injektoimalla annosteltu fluoksetiini aktivoi TrkB-reseptoreja, mutta erilaisen antotavan vuoksi vaikutuksia ei voi suoraan verrata (Saarelainen ym. 2003).

Juomalla ylläpidetty fluoksetiinipitoisuus on luultavasti injektoimalla annosteltua tasaisempi. Saarelainen ym. (2003) havaitsivatkin että kroonisessa käsittelyssä 30 minuuttia viimeisen injektion jälkeen TrkB-reseptorin fosforylaatio voitiin havaita, mutta kuuden tunnin kuluttua injektioista aktiivisuus oli palautunut takaisin perustasolle. Tämä osoittaa, että TrkB-reseptorin herkkyys fluoksetiinille ei vähene kroonisen käsittelyn vaikutuksesta, mutta se on riippuvainen injektion ajankohdasta.

Fluoksetiinia juomavedessä annostelemalla ei voida olla varmoja, että kaikki hiiret saavat yhtä suuren fluoksetiiniannoksen. Juodun liuoksen määrää kuitenkin tarkkailtiin

koko käsittelyn ajan. Hiiret saavuttavat tasaisen fluoksetiinin plasmapitoisuuden noin viiden päivän kuluttua juoton aloittamisesta (Santarelli ym. 2003). Hiiriltä kerättiin lopetuksen yhteydessä myös verinäytteet, joista olisi ollut mahdollista määrittää tarkat fluoksetiinipitoisuudet. Määrittämiä ei kuitenkaan tehty erikoistyön aikana.

Hiiret lopetettiin 21 päivän kuluttua juoton aloittamisesta, ja ne saivat juoda fluoksetiiniliuosta lopettamiseen saakka. Hiiret juovat hyvin pienen määrän kerralla, joten on vaikea sanoa onko tasaisen plasmapitoisuuden saavuttamisen jälkeen fluoksetiinipitoisuudessa mahdollisia piikkejä, jotka johtaisivat voimakkaampaan TrkB-reseptorin aktivoitumiseen, kuten tapahtuu fluoksetiinia injektoimalla annosteltaessa. On myös mahdollista, että TrkB-reseptorin signalointi olisi voimistuneena koko fluoksetiinijuoton ajan, mikä muistuttaisi TrkB-reseptoria yli-ilmentävien hiirten tilannetta.

Vaikka TrkB-reseptorin aktivoitumista ei voitukaan havaita tässä kokeessa, BDNF-proteiinitasot nousivat merkitsevästi fluoksetiiniryhmän hiirten hippokampusksessa. Fluoksetiiniliuosta juoneilla hiirillä BDNF-proteiinitasot olivat jopa kaksinkertaisia kontrolliryhmän hiiriin verrattuna. BDNF-proteiinin määrää hippokampusnäytteissä analysoitiin kahdella menetelmällä, joista ELISA –menetelmällä mitattuna fluoksetiiniryhmän hiirten BDNF-pitoisuudet olivat 1,5-kertaiset kontrolliryhmään verrattuna ja western blot -menetelmässä kaksinkertaiset. BDNF-proteiinimäärän on aikaisemminkin havaittu lisääntyvän kroonisen fluoksetiinikäsittelyn vaikutuksesta (Wyneken ym. 2006), mutta ei kuitenkaan kaikissa tutkimuksissa (Altar ym. 2003)

BDNF on TrkB-reseptorin endogeeninen ligandi ja sen määrän lisääntymisen pitäisi johtaa myös TrkB-reseptorin voimistuneeseen aktiivisuuteen. Tässä kokeessa ei kuitenkaan havaittu tällaista vaikutusta. On mahdollista, että BDNF:n solunsisäiset varastot olivat lisääntyneet, mutta ei sen määrä synapsiraossa, jossa se pääsisi aktivoimaan TrkB-reseptoria. Käytetyillä menetelmillä ei ole mahdollista erottaa, missä BDNF:n määrä tarkalleen on lisääntynyt. Koska BDNF:n vapautuminen on normaalisti tarkkaan säädeltyä, aktiivisuudesta riippuvaista ja hyvin paikallista, olisi fysiologisestikin järkevää, että masennuslääkkeet eivät lisääisi sen vapautumista soluista kontrolloimattomasti. Esimerkiksi BDNF:ä sisältävien synapsirakkuloiden määrän lisääntyminen voisi johtaa voimakkaampaan hermoston aktiivisuuden aiheuttamaan

vasteeseen, minkä seurauksena hermoyhteydet olisivat ikään kuin alttiimpia stimulaatiolle.

BDNF:n proteiinitasojen nousu hippokampuksessa on liitetty antidepressiiviseen vaikutukseen jrsijöillä tehdyissä käyttäytymiskokeissa (Shirayama ym. 2002). Kuitenkin esimerkiksi ventraalisessa tegmentumissa kohonnut BDNF-pitoisuus johtaa päinvastoin depressiiviseen käyttäytymiseen (Eisch ym. 2003). Olisikin ollut mielenkiintoista tutkia, nostaako fluoksetiini BDNF:n pitoisuuksia myös ventraalisessa tegmentumissa. BDNF:n aiheuttamat käyttäytymisvaikutukset riippuvat siis sen roolista eri aivoalueilla, eikä pitoisuuden kasvu suoraan tarkoita antidepressiivistä vaikutusta (Castrén ja Rantamäki 2010).

Hiiret elävät normaalisti ryhmähäkeissä ja tässä kokeessa niitä pidettiin kolme viikkoa yksittäishäkeissä. Yksittäishäkissä oleminen saattaa aiheuttaa hiirille stressiä, mikä voi johtaa BDNF-pitoisuuden laskuun hippokampuksessa (Nibuya ym. 1995). Kroonisen masennuslääkekäsittelyn on havaittu estävän stressin aiheuttaman BDNF-tasojen laskun. Vesiryhmän hiirten BDNF-pitoisuudet hippokampuksessa saattoivat siis olla normaalia alhaisemmat, mikä lisäisi eroa fluoksetiini- ja vesiryhmän hiirten välillä. Tämän varmistamiseksi olisi tarvittu kontrolliksi ryhmähäkissä olevia hiiriä.

Fluoksetiinin aiheuttama BDNF:n määrän lisääntyminen voi tapahtua TrkB-reseptorin aktivoitumisen kautta, sillä TrkB-reseptorin tyrosiini 816:n fosforyloituminen johtaa PLC γ 1-signaaloinnin kautta lisääntyneeseen fosforyloituneen CREB:n määrään. Fluoksetiinin on osoitettu aktivoivan tätä signalointireittiä, vaikka tässä tutkimuksessa sitä ei varmistettu (Rantamäki ym. 2007). CREB:n kiinnittyminen BDNF-geenin promoottorialueeseen lisää bdnf-geenin luentaa ja sen lähetti-RNA:n määrää, mikä lopulta johtaa myös proteiinimäärän lisääntymiseen (Nibuya ym. 1996). TrkB-reseptoria yli-ilmentävillä hiirillä, joilla TrkB-signaali on voimistunut, BDNF:n määrä hippokampuksessa tai aivokuorella ei kuitenkaan ole lisääntynyt (Koponen ym. 2004).

On myös mahdollista, että fluoksetiini lisää proBDNF:n pilkkoutumista BDNF:ksi. proBDNF:ä BDNF:ksi solun ulkopuolella pilkkovan tPA:n aktiivisuudessa ei kuitenkaan havaittu muutoksia kroonisen fluoksetiinikäsittelyn seurauksena eli

luultavasti BDNF:n määrä ei lisääntynyt tPA:n aktiivisuuden muutoksen vaikutuksesta. Toisaalta ei voida olla varmoja, oliko käytetty aikapiste sopiva tPA:n aktiivisuuden arviointiin, sillä BDNF-proteiinin määrä oli jo lisääntynyt ja on mahdollista, että muutokset tPA:n aktiivisuudessa tapahtuvat aikaisemmin. proBDNF:n pilkkomiseen BDNF:ksi osallistuu myös muita entsyymejä, joista osa toimii jo solun sisällä (Mowla ym. 2001). Tässä tutkimuksessa ei kuitenkaan selvitetty vaikuttaako fluoksetiini näiden muiden entsyymien aktiivisuuteen.

BDNF-proteiinimäärän analysoinnissa käytetyllä western blot -menetelmällä on mahdollista tunnistaa myös proBDNF. Fluoksetiinin vaikutusta proBDNF:n ja BDNF:n suhteeseen ei kuitenkaan voitu selvittää, sillä hippokampusnäytteissä ei havaittu lainkaan proBDNF:a, vaikka vasta-aine tunnisti rekombinanttitekniikalla valmistetun proBDNF-kontrollin. On mahdollista, että hippokampusnäytteissä on niin vähän proBDNF:ä, ettei sitä voida havaita western blot-menetelmällä. Tähän viittaisi myös se, että pilkkoutumatonta proBDNF:n muotoa ilmentävillä hiirillä sama vasta-aine tunnistaa proBDNF:n aivokudoksesta (Autio Henri, julkaisematon havainto).

Hippokampuksen tPA-aktiivisuuden ja BDNF:n määrän on havaittu lisääntyvän virikkeellisessä ympäristössä, jossa jyrksijöillä on mahdollisuus esimerkiksi juosta juoksupyörällä (Horie-Hayashi ym. 2010; Sun ym. 2010). Fyysisellä harjoittelulla onkin antidepressiivinen vaikutus, minkä uskotaan osittain välittyvän BDNF-proteiinitasojen nousun vaikutuksesta (Sartori ym. 2011). Koska fyysinen harjoittelu lisää tPA:n ja sen aktiivisuutta voimistavan p11 -proteiinin mRNA:n määrää, tämä saattaisi johtaa BDNF:n prosessoinnin lisääntymiseen. Fyysisen harjoittelun ja kroonisen fluoksetiinikäsittelyn vaikutukset BDNF:n proteiinimäärään saattavat osittain välittyä samanlaisen mekanismin kautta, johon liittyy tPA:n mRNA:n, tPA-proteiinin ja tPA:n aktiivisuuden lisääntyminen. Masennuslääke imipramiinin onkin havaittu lisäävän tPA:n mRNA:n määrää, joten on mahdollista, että myös fluoksetiini toimii samalla tavalla (Knuutila ym. 2004). Fluoksetiinin vaikutusta tPA:n mRNA:n määrään täytyisi tutkia tarkemmin.

tPA:n aktiivisuuden voimistumisella olisi myös paljon muita kuin neurotrofiinivaikutuksia, sillä plasmaliini on laajakirjoinen proteaasi. Jos veren tPA-määrä lisääntyisi samoin kuin keskushermostossa, esimerkiksi verenvuotoalttius

saattaisi lisääntyä, sillä verihyytymien pilkkoutuminen voimistuisi. tPA vaikuttaa kuitenkin jo syntyneen verihyytymän hajoamiseen ja toimiakseen tehokkaasti tarvitsee kofaktoriksi verihyytymän fibriniä. tPA:ta keskushermostossa yli-ilmentävillä hiirillä ei olekaan havaittu verenvuotoalttiuden lisääntyneen (Madani ym. 1999)

SDS-PAGE –tsymografian herkkyys ja erotuskyky olisivat vaatineet lisää validointia, jotta voitaisiin luotettavasti arvioida, kuinka suuria muutoksia entsyymiaktiivisuudessa sillä voidaan havaita. Entsyymiaktiivisuuden mittauksessa hyvin monet tekijät voivat vaikuttaa lopputulokseen. Näytteiden käsittelyvaiheessa kudoksen homogenisoidaan, jolloin kudoksen rakenne ja solut hajoavat. Tämä mahdollistaa esimerkiksi normaalisti toisaalla kudoksessa olevien inhibiittorien pääsyn tPA:n lähelle, mikä saattaa vaikuttaa sen aktiivisuuteen. Toisaalta kudoksessa on paljon molekyyliä, jotka interaktoidessaan tPA:n kanssa voimistavat sen aktiivisuutta huomattavasti.

SDS-PAGE –tsymografiassa tPA:n aktiivisuutta tutkitaan epäsuorasti mittaamalla plasmiinin aiheuttamaa kaseiinien pilkkoutumista. Plasmiini voi aktivoitua myös muiden entsyymien kuin tPA:n vaikutuksesta. Toisaalta SDS-PAGE –tsymografiassa erikokoiset proteiinit erotetaan toisistaan ennen aktiivisuuden määrittystä, ja esimerkiksi uPA:n aikaansaama plasmiinin aktivoituminen näkyi geelillä alempana kuin tPA:n aktiivisuus.

tPA:n toimintaa säätelevät voimakkaasti inhibiittorit ja masennuslääkkeiden on aikaisemmin havaittu vähentävän esimerkiksi PAI-1:n määrää verenkierrossa (Geiser 2011), joten olisi mielenkiintoista tutkia fluoksetiinikäsittelyn vaikutusta tPA:n inhibiittorien määrään myös keskushermostossa. Krooninen fluoksetiinikäsittely ei aiheuttanut muutoksia tPA-vasta-aineen tunnistamien kolmen proteiinin määrässä, toisin kuin akuutti fluoksetiinikäsittely. Koska ei ole varmuutta siitä, onko mikään proteiineista tPA, ei voida varmasti sanoa aiheuttaako fluoksetiini muutoksia tPA-proteiinitasoissa.

6.4.3 *In situ* –tsymografia

In situ –tsymografiaa oli tarkoituksena käyttää mahdollisten paikallisten tPA-aktiivisuuden muutosten toteamiseen. Se soveltuu selkeiden erojen havaitsemiseen aivoalueiden välillä, eikä sellaisia muutoksia havaittu akuutin tai kroonisen fluoksetiinikäsittelyn vaikutuksesta. Myöskään SDS-PAGE –tsymografiassa tPA:n aktiivisuudessa ei havaittu muutoksia, joten *in situ* –tsymografian tulokset tukevat tätä havaintoa. SDS-PAGE –tsymografilla tutkittiin vain hippokampuksen tPA-aktiivisuutta, mutta *in situ* –tsymografialla voitiin havaita aktiivisuutta myös muilla aivoalueilla. tPA:n aktiivisuutta esiintyi hippokampuksen lisäksi myös aivokuorella, hypotalamuksessa ja amygdalassa. tPA:n aktiivisuutta on aikaisemminkin kuvattu juuri näillä aivoalueilla (Sappino ym. 1993).

Koska myös uPA voi pilkkoa plasminogeenin aktiiviseksi plasmiiniksi, käytettiin joillakin leikkeillä kontrollina amiloridia. Amiloridi estää uPA:n aktiivisuuden, jolloin tPA:n ja uPA:n aktiivisuus voidaan erottaa toisistaan. tPA:ta esiintyy aivoissa huomattavasti enemmän kuin uPA:ta, ja amiloridilla käsitellyissä leikkeissä aktiivisuuden heikkeneminen oli kontrolliin verrattuna lähes huomaamatonta. *In situ* –tsymografia -leikkeet kuvattiin skannaamalla, sillä tarkkuuden arveltiin riittävän tähän tarkoitukseen.

6.5 Yhteenveto tuloksista

Hermoston muovautuvuuden voimistumisen uskotaan liittyvän masennuslääkkeiden terapeuttisten vaikutusten ilmenemiseen (Castrén ja Rantamäki 2010). BDNF:llä ja sen TrkB-reseptorilla on merkittävä rooli masennuslääkkeiden muovautuvuusvaikutuksissa, mutta tarkalleen ei tiedetä miten masennuslääkkeiden vaikutukset BDNF-TrkB –signalointiin välittyvät. tPA:lla on merkittävä rooli BDNF:n prosessoinnissa, joten se voi toimia mahdollisena masennuslääkkeiden hermokasvutekijävaikutusten välittäjänä.

Tässä tutkimuksessa akuutti (1 h) tai krooninen (3 vko) käsittely masennuslääke fluoksetiinilla ei kuitenkaan vaikuttanut tPA:n aktiivisuuteen hiiren hippokampuksessa.

Fluoksetiinin vaikutuksia tPA-proteiinitasoihin ei voida luotettavasti arvioida, sillä käytetty tPA -vasta-aine tunnisti useita proteiineja. Proteiinimäärä ei kuitenkaan kerro yhtä paljon entsyymien toiminnasta kuin aktiivisuuden mittaaminen, sillä entsyymien aktiivisuus voi vaihdella runsaasti proteiinimäärästä riippumatta esimerkiksi inhibiittorien tai kofaktorien vaikutuksesta.

Akuutti fluoksetiinikäsittely lisäsi TrkB-reseptorien aktivaatiota hippokampuksessa, mutta BDNF-proteiinitasoissa ei havaittu muutoksia kontrolliryhmään verrattuna. Koska BDNF-proteiinitasoissa ei tapahtunut muutoksia, todennäköisesti myöskään sen prosessointi ei ollut lisääntynyt, mitä tukee havainto tPA:n aktiivisuuden muuttumattomuudesta. Äskettäin julkaistun tutkimuksen mukaan masennuslääkkeiden aiheuttama nopea TrkB-aktivoituminen voikin tapahtua BDNF:stä riippumattomasti (Rantamäki ym. 2011).

Kroonisen fluoksetiinikäsittelyn seurauksena BDNF-proteiinimäärä fluoksetiiniryhmän hiirten hippokampuksessa oli kaksinkertainen kontrolliryhmään verrattuna. tPA-aktiivisuudessa ei kuitenkaan havaittu muutoksia, joten BDNF:n määrän lisääntyminen ei tämän tutkimuksen perusteella tapahdu tPA:n aktiivisuuden voimistumisen kautta. Kroonisen fluoksetiinikäsittelyn on aikaisemmin havaittu aktivoivan TrkB-reseptoria (Rantamäki ym. 2007), mutta tässä tutkimuksessa aktivaatio ei merkittävästi lisääntynyt. TrkB-reseptorin aktivoituminen akuutin ja kroonisen fluoksetiinikäsittelyn vaikutuksesta tapahtuukin luultavasti erilaisten mekanismien välityksellä.

Äskettäin ilmestyneen tutkimuksen mukaan tPA:n aktiivisuutta hiiren hippokampuksessa voidaan lisätä virikkeellisellä ympäristöllä (Horii-Hayashi ym. 2011). Koska virikkeellinen ympäristö aiheuttaa samanlaisia hermokasvutekijävaikutuksia kuin krooninen fluoksetiinikäsittely, on mahdollista, että tämän tutkimuksen tuloksista huolimatta krooninen fluoksetiinikäsittely vaikuttaa tPA:n aktiivisuuteen. Tämän vuoksi olisikin tarpeellista toistaa tPA:n aktiivisuusmittaukset paremmin validoidulla menetelmällä.

KIRJALLISUUSLUETTELO

Allen S, Naim HY, Bulleid NJ: Intracellular folding of tissue-type plasminogen activator. *J Biol Chem* 270: 4797-4804, 1995

Altar C, Whitehead R, Chen R, Wörtwein G, Madsen T: Effects of electroconvulsive seizures and antidepressant drugs on brain-derived neurotrophic factor protein in rat brain. *Biol Psychiatry* 54(7):703-709, 2003

Baranes D, Lederfein D, Huang YY, Chen M, Bailey CH, Kandel ER: Tissue plasminogen activator contributes to the late phase of LTP and to synaptic growth in the hippocampal mossy fiber pathway. *Neuron* 21: 813-825, 1998

Barlatti S, De Petro G, Bona C, Paracini F, Tonelli M: Phosphorylation of human plasminogen activators and plasminogen. *FEBS Lett* 363: 170-174, 1995

Bear M, Abraham W: Long-term depression in hippocampus. *Annu Rev Neurosci* 19:437-62, 1996

Berton O, Nestler EJ: New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nat Rev Neurosci* 7: 137-152, 2006

Bode W, Renatus M: Tissue-type plasminogen activator: variants and crystal/solution structures demarcate structural determinants of function. *Curr Opin Struct Biol* 7: 865-872, 1997

Calabrese F, Molteni R, Racagni G, Riva MA: Neuronal plasticity: a link between stress and mood disorders. *Psychoneuroendocrinology* 34 Suppl 1: S208-16, 2009

Castrén E: Neurotrophic effects of antidepressant drugs. *Curr Opin Pharmacol* 4: 58-64, 2004

Castrén E, Rantamaki T: The role of BDNF and its receptors in depression and antidepressant drug action: Reactivation of developmental plasticity. *Dev Neurobiol* 70(5):289-297, 2010

Castrén E: Is mood chemistry? *Nat Rev Neurosci* 6: 241-246, 2005

Chen B, Dowlathshahi D, MacQueen GM, Wang JF, Young LT: Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. *Biol Psychiatry* 50: 260-265, 2001

Cowansage KK, LeDoux JE, Monfils MH: Brain-derived neurotrophic factor: a dynamic gatekeeper of neural plasticity. *Curr Mol Pharmacol* 3: 12-29, 2010

Eisch AJ, Bolaños CA, de Wit J, Simonak RD, Pudiak CM, Barrot M, Verhaagen J, Nestler EJ: Brain-derived neurotrophic factor in the ventral midbrain–nucleus accumbens pathway: a role in depression. *Biol Psychiatry* 54: 994-1005, 2003

Ellis V: Plasminogen activators - Structure and function. Kirjassa: Plasminogen - Structure, activation and regulation, ss. 19-40, 1.painos. Toim.Waisman DM, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York 2003

Gebbink M: Tissue-type plasminogen activator-mediated plasminogen activation and contact activation, implications in and beyond haemostasis. *J Thromb Haemost* 9: 174-181, 2011

Geiser F, Conrad R, Imbierowicz K, Meier C, Liedtke R, Klingmüller D, Oldenburg J, Harbrecht U: Coagulation activation and fibrinolysis impairment are reduced in patients with anxiety and depression when medicated with serotonergic antidepressants. *Psychiatry Clin Neurosci* 65: 518-525, 2011

Gualandris A, Jones TE, Strickland S, Tsirka SE: Membrane depolarization induces calcium-dependent secretion of tissue plasminogen activator. *J Neurosci* 16: 2220-2225, 1996

Halperin D, Reber G: Influence of antidepressants on hemostasis. *Dialogues Clin Neurosci* 9: 47-59, 2007

Hensch TK: Critical period mechanisms in developing visual cortex. *Curr Top Dev Biol* 69: 215-237, 2005

Horii-Hayashi N, Yoshikawa M, Ishizaka S, Nishi M, Wanaka A: Environmental stimulation changes tissue-type plasminogen activator activity in the adult mouse hippocampus. *Neurochem Int* 58:1-4, 2011

Hu K, Yang J, Tanaka S, Gonias SL, Mars WM, Liu Y: Tissue-type plasminogen activator acts as a cytokine that triggers intracellular signal transduction and induces matrix metalloproteinase-9 gene expression. *J Biol Chem* 281: 2120-2127, 2006

Huang EJ, Reichardt LF: Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 24: 677-736, 2001

Huang YY, Bach ME, Lipp HP, Zhuo M, Wolfer DP, Hawkins RD, Schoonjans L, Kandel ER, Godfraind JM, Mulligan R: Mice lacking the gene encoding tissue-type plasminogen activator show a selective interference with late-phase long-term potentiation in both Schaffer collateral and mossy fiber pathways. *Proc Natl Acad Sci* 93: 8699-8704, 1996

Jang SW, Liu X, Chan CB, Weinshenker D, Hall RA, Xiao G, Ye K: Amitriptyline is a TrkA and TrkB receptor agonist that promotes TrkA/TrkB heterodimerization and has potent neurotrophic activity. *Chem Biol* 16: 644-656, 2009

Kassam G, Le BH, Choi KS, Kang HM, Fitzpatrick SL, Louie P, Waisman DM: The p11 Subunit of the Annexin II Tetramer Plays a Key Role in the Stimulation of t-PA-Dependent Plasminogen Activation. *Biochemistry (N Y)* 37: 16958-16966, 1998

- Kelsch W, Sim S, Lois C: Watching synaptogenesis in the adult brain. *Annu Rev Neurosci* 33: 131-149, 2010
- Kingsbury TJ, Murray PD, Bambrick LL, Krueger BK: Ca(2+)-dependent regulation of TrkB expression in neurons. *J Biol Chem* 278: 40744-40748, 2003
- Knuuttila JE, Toronen P, Castrén E: Effects of antidepressant drug imipramine on gene expression in rat prefrontal cortex. *Neurochem Res* 29: 1235-1244, 2004
- Koponen E, Rantamäki T, Voikar V, Saarelainen T, MacDonald E, Castrén E: Enhanced BDNF signaling is associated with an antidepressant-like behavioral response and changes in brain monoamines. *Cell Mol Neurobiol* 25: 973-980, 2005
- Koponen E, Lakso M, Castrén E: Overexpression of the full-length neurotrophin receptor trkB regulates the expression of plasticity-related genes in mouse brain. *Brain Res Mol Brain Res* 130: 81-94, 2004
- Korte M, Staiger V, Griesbeck O, Thoenen H, Bonhoeffer T: The involvement of brain-derived neurotrophic factor in hippocampal long-term potentiation revealed by gene targeting experiments. *J Physiol Paris* 90: 157-164, 1996
- Krystosek A, Seeds NW: Plasminogen activator release at the neuronal growth cone. *Science* 213: 1532-1534, 1981
- Krystosek A, Seeds NW: Peripheral neurons and Schwann cells secrete plasminogen activator. *J Cell Biol* 98:773-776, 1984
- Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL: Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 294: 1945-1948, 2001
- Lee FS, Rajagopal R, Chao MV: Distinctive features of Trk neurotrophin receptor transactivation by G protein-coupled receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 13: 11-17, 2002
- Lu B, Pang PT, Woo NH: The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci* 6: 603-614, 2005
- Lu B: BDNF and activity-dependent synaptic modulation. *Learn Mem* 10: 86-98, 2003
- Lu B, Chow A: Neurotrophins and hippocampal synaptic transmission and plasticity. *J Neurosci Res* 58: 76-87, 1999
- Madani R, Hulo S, Toni N, Madani H, Steimer T, Muller D, Vassalli JD: Enhanced hippocampal long-term potentiation and learning by increased neuronal expression of tissue-type plasminogen activator in transgenic mice. *EMBO J* 18: 3007-3012, 1999
- Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS: Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci* 20: 9104-9110, 2000

- Martin AM, Kuhlmann C, Trossbach S, Jaeger S, Waldron E, Roebroek A, Luhmann HJ, Laatsch A, Weggen S, Lessmann V, Pietrzik CU: The functional role of the second NPXY motif of the LRP1 beta-chain in tissue-type plasminogen activator-mediated activation of N-methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem* 283: 12004-12013, 2008
- May A: Experience-dependent structural plasticity in the adult human brain. *Trends Cogn Sci* 15: 475-482, 2011
- Maya Vetencourt JF, Sale A, Viegi A, Baroncelli L, De Pasquale R, O'Leary OF, Castrén E, Maffei L: The antidepressant fluoxetine restores plasticity in the adult visual cortex. *Science* 320: 385-388, 2008
- McAllister AK, Katz LC, Lo DC: Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 22: 295-318, 1999
- Minichiello L: TrkB signalling pathways in LTP and learning. *Nat Rev Neurosci* 10: 850-860, 2009
- Minichiello L, Calella AM, Medina DL, Bonhoeffer T, Klein R, Korte M: Mechanism of TrkB-mediated hippocampal long-term potentiation. *Neuron* 36: 121-137, 2002
- Mongiat LA, Schinder AF: Adult neurogenesis and the plasticity of the dentate gyrus network. *Eur J Neurosci* 33: 1055-1061, 2011
- Mowla SJ, Farhadi HF, Pareek S, Atwal JK, Morris SJ, Seidah NG, Murphy RA: Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. *J Biol Chem* 276: 12660-12666, 2001
- Müller CM, Griesinger CB: Tissue plasminogen activator mediates reverse occlusion plasticity in visual cortex. *Nat Neurosci* 1: 47-53, 1998
- Nagappan G, Zaitsev E, Senatorov VV, Yang J, Hempstead BL, Lu B: Control of extracellular cleavage of ProBDNF by high frequency neuronal activity. *Proc Natl Acad Sci* 106: 1267-1272, 2009
- Nibuya M, Morinobu S, Duman RS: Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J Neurosci* 15: 7539-7547, 1995
- Nibuya M, Nestler EJ, Duman RS: Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in rat hippocampus. *J Neurosci* 16: 2365-2372, 1996
- Pang PT, Teng HK, Zaitsev E, Woo NT, Sakata K, Zhen S, Teng KK, Yung WH, Hempstead BL, Lu B: Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science* 306: 487-491, 2004

- Pawlak R, Magarinos AM, Melchor J, McEwen B, Strickland S: Tissue plasminogen activator in the amygdala is critical for stress-induced anxiety-like behavior. *Nat Neurosci* 6: 168-174, 2003
- Pawlak R, Strickland S: Tissue plasminogen activator and seizures: a clot-buster's secret life. *J Clin Invest* 109: 1529-1531, 2002
- Pletscher A: The discovery of antidepressants: a winding path. *Cell Mol Life Sci* 47: 4-8, 1991
- Qian Z, Gilbert ME, Colicos MA, Kandel ER, Kuhl D: Tissue-plasminogen activator is induced as an immediate-early gene during seizure, kindling and long-term potentiation. *Nature* 361:453-457, 1993
- Rantamäki T, Hendolin P, Kankaanpää A, Mijatovic J, Piepponen P, Domenici E, Chao MV, Männistö PT, Castrén E: Pharmacologically diverse antidepressants rapidly activate brain-derived neurotrophic factor receptor TrkB and induce phospholipase-C γ signaling pathways in mouse brain. *Neuropsychopharmacology* 32: 2152-2162, 2007
- Rantamäki T, Vesa L, Antila H, Di Lieto A, Tammela P, Schmitt A, Lesch KP, Rios M, Castrén E: Antidepressant drugs transactivate TrkB neurotrophin receptors in the adult rodent brain independently of BDNF and monoamine transporter blockade. *PLoS One* 6(6):e20567, 2011
- Renatus M, Engh RA, Stubbs MT, Huber R, Fischer S, Kohnert U, Bode W: Lysine 156 promotes the anomalous proenzyme activity of tPA: X-ray crystal structure of single-chain human tPA. *EMBO J* 16: 4797-4805, 1997
- Saarelainen T, Hendolin P, Lucas G, Koponen E, Sairanen M, MacDonald E, Agerman K, Haapasalo A, Nawa H, Aloyz R, Ernfors P, Castrén E: Activation of the TrkB neurotrophin receptor is induced by antidepressant drugs and is required for antidepressant-induced behavioral effects. *J Neurosci* 23: 349-357, 2003
- Sairanen M, Lucas G, Ernfors P, Castrén M, Castrén E: Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant drugs have different but coordinated effects on neuronal turnover, proliferation, and survival in the adult dentate gyrus. *J Neurosci* 25: 1089-1094, 2005
- Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R: Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 301: 805-809, 2003
- Sappino AP, Madani R, Huarte J, Belin D, Kiss JZ, Wohlwend A, Vassalli JD: Extracellular proteolysis in the adult murine brain. *J Clin Invest* 92: 679-685, 1993
- Sartori CR, Vieira AS, Ferrari EAM, Langone F, Tongiorgi E, Parada CA: The antidepressive effect of the physical exercise correlates with increased levels of mature

BDNF, and proBDNF proteolytic cleavage-related genes, p11 and tPA. *Neuroscience* 180:9-18, 2011

Schoups A, Elliott R, Friedman W, Black I: NGF and BDNF are differentially modulated by visual experience in the developing geniculocortical pathway. *Dev Brain Res* 86: 326-334, 1995

Schweigreiter R: The dual nature of neurotrophins. *Bioessays* 28: 583-594, 2006

Seeds NW, Williams BL, Bickford PC: Tissue plasminogen activator induction in Purkinje neurons after cerebellar motor learning. *Science* 270: 1992-1994, 1995a

Segal RA, Bhattacharyya A, Rua LA, Alberta JA, Stephens RM, Kaplan DR, Stiles CD: Differential utilization of Trk autophosphorylation sites. *J Biol Chem* 271: 20175-20181, 1996

Shi Y, You J, Yuan Y, Zhang X, Li H, Hou G: Plasma BDNF and tPA are associated with late-onset geriatric depression. *Psychiatry Clin Neurosci* 64: 249-254, 2010

Shirayama Y, Chen ACH, Nakagawa S, Russell DS, Duman RS: Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. *J Neurosci* 22: 3251-3261, 2002

Siuciak JA, Lewis DR, Wiegand SJ, Lindsay RM: Antidepressant-like effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *Pharmacol Biochem and Behav* 56: 131-137, 1997

Stubbs MT, Rénatus M, Bode W: An active zymogen: unravelling the mystery of tissue-type plasminogen activator. *Biol Chem* 379: 95-103, 1998

Sun H, Zhang J, Zhang L, Liu H, Zhu H, Yang Y: Environmental enrichment influences BDNF and NR1 levels in the hippocampus and restores cognitive impairment in chronic cerebral hypoperfused rats. *Curr Neurovasc Res* 7:268-280, 2010

Svenningsson P, Greengard P: p11 (S100A10)--an inducible adaptor protein that modulates neuronal functions. *Curr Opin Pharmacol* 7: 27-32, 2007

Teesalu T, Kulla A, Asser T, Simisker A, Vaheri A: Plasminogen activators in CNS physiology and disease. Kirjassa: Plasminogen - Structure, activation and regulation, ss. 251-263, 1.painos. Toim.Waisman DM, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York 2003

Takahashi K, Kwaan HC, Koh E, Tanabe M: Enzymatic properties of the phosphorylated urokinase-type plasminogen activator isolated from a human carcinomatous cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 182: 1473-1481, 1992

Tsai SJ, Hong CJ, Liou YJ, Yu YWY, Chen TJ: Plasminogen activator inhibitor-1 gene is associated with major depression and antidepressant treatment response. *Pharmacogenet Genomics* 18: 869-875, 2008

Tsirka S: Tissue plasminogen activator as a modulator of neuronal survival and function. *Biochem Soc Trans* 30: 222-225, 2002

Urano T, Malyszko J, Takada Y, Takada A: Close relationships between serotonergic and fibrinolytic systems revealed by a monoamine oxidase inhibitor treatment in rats. *Haemostasis* 25: 277-282, 1995

Vivien D, Gauberti M, Montagne A, Defer G, Touze E: Impact of tissue plasminogen activator on the neurovascular unit: from clinical data to experimental evidence. *J Cereb Blood Flow Metab* 31:2119-2134, 2011

Wittwer AJ, Howard SC: Glycosylation at Asn-184 inhibits the conversion of single-chain to two-chain tissue-type plasminogen activator by plasmin. *Biochemistry (N Y)* 29: 4175-4180, 1990

Wyneken U, Sandoval M, Sandoval S, Jorquera F, Gonzalez I, Vargas F, Falcon R, Monari M, Orrego F: Clinically relevant doses of fluoxetine and reboxetine induce changes in the TrkB content of central excitatory synapses. *Neuropsychopharmacology* 31: 2415-2423, 2006

Yang F, Je HS, Ji Y, Nagappan G, Hempstead B, Lu B: Pro-BDNF-induced synaptic depression and retraction at developing neuromuscular synapses. *J Cell Biol* 185: 727-741, 2009a

Yang J, Siao CJ, Nagappan G, Marinic T, Jing D, McGrath K, Chen ZY, Mark W, Tessarollo L, Lee FS: Neuronal release of proBDNF. *Nat Neurosci* 12: 113-115, 2009b

Zhang C, An J, Strickland DK, Yepes M: The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 mediates tissue-type plasminogen activator-induced microglial activation in the ischemic brain. *Am J Pathol* 174: 586-594, 2009

LIITE 1

Liuosten koostumukset. Kaikkien liuosten pohjana on käytetty ionivaihdettua vettä.

	Koostumus	Valmistaja
Ajopuskuri	24 mM Tris-Hcl pH 6,8 1,44 % Glysiini 0,1 % SDS	HY Sigma-Aldrich Lappo
Akryyliamidigeeli	Akryyliamidi* 3 M Tris-Hcl pH 6,8 tai 8,8* 20 % SDS* Ammoniumpersulfaatti (APS)* TEMED*	Bio-Rad HY HY Bio-Rad Bio-Rad
Coomassie BB värjäysliuos	0,25 % Coomassie BB 45 % Metanoli 10 % Etikkahappo	Bio-Rad Mallinckrodt Baker Mallinckrodt Baker
Hanks -puskuri, pH 7,4	125 mM NaCl 5 mM KCl 1,2 mM NaH ₂ PO ₄ 1 mM CaCl ₂ 1,2 mM MgCl ₂ 1 µM ZnCl ₂ 10 mM Glukoosi 25 mM HEPES 0,25 % BSA	HY HY Lappo HY HY Sigma-Aldrich HY Finnzymes Sigma-Aldrich
Karbonaattipuskuri, pH 9,7	50mM Na ₂ HCO ₃ 50mM Na ₂ CO ₃	Lappo
Laemmlin näytekuri	20 % Glyseroli 4 % SDS 125 mM Tric-Hcl 10 % β-merkaptetaanoli 0,02 % Bromofenolisininen	HY HY HY Amresco Sigma-Aldrich

NP++ -lyysispuskuri	20 mM Tris-Hcl (pH 8,0) 137 mM NaCl 48 mM NaF 1% NP-40 10% Glyseroli 2mM Na ₃ VO ₄ (natriumvanadaatti) Complete inhibitor mix	HY HY HY WVR HY Sigma-Aldrich Roche Diagnostics
NP/Triton++ -puskuri (1:2)	20 mM Tris-Hcl (pH 8,0) 137 mM NaCl 48 mM NaF 0,33% NP-40 3,33% Glyseroli 0,33 % Triton X-100 2mM Na ₃ VO ₄ Complete inhibitor mix	HY HY HY WVR HY Sigma-Aldrich Sigma-Aldrich Roche Diagnostics
TBS-T	10X TBS (Tris-puskuroitu saliini) 0,1 % Tween 20	HY Amresco
Tris-Triton -lyysispuskuri	0,1 M Tris-Hcl (pH 8,0) 0,25% Triton X-100 10µM Leupeptiini 10 µg/ml Aprotiniini 1 mM PMSF (fenyylimetyylisulfonyylifluoridi)	HY Sigma-Aldrich Sigma-Aldrich Sigma-Aldrich Sigma-Aldrich
Väriinpoistoliuos	25 % Metanoli 0,7 % Etikkahappo	Mallinckrodt Baker Mallinckrodt Baker

*Pitoisuudet vaihtelevat