

Sanna Kärkkäinen

Glutationireduktaasigeenin vaikutus hiirten ahdistuskäyt-
täytymiseen

Metropolia Ammattikorkeakoulu
Laboratorioanalyttikko
Laboratorioalan koulutusohjelma
Opinnäytetyö
27.11.2012

ALKULAUSE

Sain erinomaisen tilaisuuden tehdä opinnäytetyöni akatemiatutkija Iiris Hovatan tutkimusryhmässä, Helsingin yliopistolla. On ollut ilo työskennellä erittäin mukavassa ja ammattitaitoisessa tutkimusryhmässä.

Haluan kiittää Iiristä sekä tutkijatohtori Ewa Sokolowskia työni ohjaamisesta, sekä kaikesta siitä mitä he ovat minulle opettaneet.

Kiitos kuuluu myös opettajalleni lehtori Jarmo Palmille, jonka neuvot ja kannustus ovat vieneet pitkälle.

Lisäksi haluan kiittää työtovereitani, ja kaikkia jotka ovat osaltaan olleet apuna tämän projektin aikana. Kiitos myös Mimi-koiralle mallina toimimisesta.

Neljän lapsen äitinä on ollut hyvin haasteellista löytää aikaa niin opinnäytetyön tekemiseen kuin perheellekin, joten erityinen kiitos kuuluu miehelleni Karolille. Hänen tukensa on ollut korvaamatonta.

Helsingissä 27.11.2012

Sanna Kärkkäinen

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Sanna Kärkkäinen Glutathionireduktaasigeenin vaikutus hiirten ahdistuskäyttäytymiseen 26 sivua + 4 liitettä 27.11.2012
Tutkinto	Laboratorioanalyytikko
Koulutusohjelma	Laboratorioalan koulutusohjelma
Suuntautumisvaihtoehto	
Ohjaajat	Lehtori Jarmo Palm Dosentti, akatemiaturkija Iiris Hovatta Tutkijatohtori Ewa Sokolowska
<p>Tämä opinnäytetyö tehtiin Iiris Hovatan tutkimusryhmässä, joka toimii osana Helsingin yliopiston lääketieteellisen tiedekunnan molekyylineurologian tutkimusohjelmaa. Ryhmä tutkii ahdistuneisuuteen liittyviä geenejä ja niiden vaikutusta erilaisissa ahdistuneisuushäiriöissä. Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää glutathionireduktaasigeenin (<i>Gsr</i>) vaikutusta ahdistuneisuuskäyttäytymiseen käyttäen geenimuunneltua hiirimallia. Lisäksi tutkittiin stressin vaikutusta fenotyyppiin.</p> <p>Ahdistuneisuushäiriöt ovat psykiatrisia häiriöitä, joissa ahdistuneisuus on kokonaisvaltaista ja haittaa normaalia elämää. Ne ilmenevät usein muiden mielenterveyden sairauksien rinnalla. Oireita voidaan lievittää, mutta vain osa potilaista hyötyy lääkehoidosta tai terapiasta. Ahdistuneisuushäiriöissä on kyse sekä geenien että ympäristötekijöiden yhteisvaikutuksesta. Aiemmissä tutkimuksissa ahdistuneisuuteen on voitu liittää useita geenejä. <i>Gsr</i>-geenin vaikutusta ahdistukseen on tutkittu lähinnä Iiris Hovatan tutkimusryhmässä ja vahvin näyttö on hiirimalleista. Tässä työssä käytettiin <i>Gsr</i>-geenin suhteen poistogeenisen hiirilinjan heterotsygootteja ja villityypin eläimiä. Eläimillä tutkittiin ahdistuneisuuskäyttäytymistä avokenttä- ja valoisa-pimeä laatikko-testillä. Testeissä tutkittiin myös stressin vaikutusta käyttäytymiseen. Lisäksi tutkittiin eläinten pelkoehdollistumista ja ehdollistumisen purkautumista.</p> <p>Tuloksista genotyyppien välillä näkyi selkeä suunta, mutta erot eivät olleet tilastollisesti merkittäviä. Oletuksesta poiketen heterotsygootit eläimet liikkuivat vähemmän ja vaikuttivat ahdistuneemmilta. Tulosten hajonta vaikutti tilastollisen eron merkittävyyteen. Pelkoehdollistuminen ja pelkoehdollistumisen purkaminen olisi hyvä toistaa erillisenä kokeena, jolloin aikaisemmat käytöskokeet ja stressi eivät vaikuttaisi tuloksiin. Saatujen tulosten perusteella <i>Gsr</i>-geenillä ei ollut tilastollisesti merkittävää vaikutusta hiirten ahdistuneisuuskäyttäytymiseen.</p>	
Avainsanat	ahdistuneisuus, eläinkoe, käyttäytymiskoe, geeni

Author	Sanna Kärkkäinen
Title	The effect of the glutathione reductase gene on anxiety-like behaviour in mice
Number of Pages	26 pages + 4 appendices
Date	27th November 2012
Degree	Bachelor of Laboratory Sciences
Degree Programme	Laboratory Science
Specialisation option	
Instructors	Jarmo Palm, Senior Lecturer Iiris Hovatta, PhD, Academy research fellow Ewa Sokolowska, Postdoctoral Researcher
<p>This thesis was made in Iiris Hovatta´s group, which operates as part of the University of Helsinki, Faculty of Medicine research program of Molecular Neurology. The group studies anxiety-related genes and their effect on a different kind of anxiety disorders. The purpose of my study was to examine the function of the glutathione reductase gene (<i>Gsr</i>) using a genetically modified mouse model and assess its effect on the anxiety-like behavior after acute stress application.</p> <p>Anxiety disorders are complex psychiatric diseases in which anxiety disrupts normal daily life. Anxiety disorders often appear along with other mental illnesses. Symptoms can be alleviated, but only a part of the patients benefits from medical treatment or cognitive therapy. Anxiety disorders are caused by the genes, as well as the environmental factors. In previous studies it has been possible to connect multiple genes to anxiety. The effect of the glutathione reductase gene on anxiety has been studied mainly in Iiris Hovatta´s group and the strongest evidence is from mouse models.</p> <p>In my study I used <i>Gsr</i> knockout mouse line heterozygous and wild type animals. Animals anxiety-like behavior was assessed using open field and a light-dark box tests. The tests examined also the impact of stress on anxiety-like behavior. The animal´s fear conditioning and fear extension were also tested.</p> <p>Results showed a clear trend between genotypes, but the differences were not statistically significant. Unlike the assumption heterozygous animals moved less and seemed less anxious. The variation in results affected the statistical significance of the difference. Fear conditioning and fear extension tests would be good to repeat as a separate experiment, so that the previous behavior tests and applied stress would not affect the results. Summarizing, based on the results the <i>Gsr</i> gene had no statistically significant effect on the anxiety-like behavior in mice.</p>	
Keywords	anxiety, animal test, behavioral test, gene

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Teoria	2
2.1	Ahdistuneisuus	2
2.2	Glutathionireduktaasi-geeni	3
2.3	Koe-eläimet	4
2.4	Käyttäytymiskokeet	5
2.4.1	Valoisa-pimeä laatikko -testi	5
2.4.2	Avokenttätesti	6
2.4.3	Immobilisaatiostressi	7
2.4.4	Pelkoehdollistuminen	7
3	Työn suoritus	8
3.1	Eläinten tuotto	8
3.2	Genotyypaus	9
3.3	Ryhmäjako	11
3.4	Käyttäytymiskokeet	11
3.4.1	Valoisa-pimeä laatikko-testi	12
3.4.2	Avokenttätesti	12
3.4.3	Pelkoehdollistuminen	13
3.5	Tilastolliset menetelmät	14
4	Tulokset	15
4.1	Valoisa-pimeä laatikko-testi	15
4.2	Avokenttätesti	19
4.3	Pelkoehdollistumiskoe	21
5	Tulosten tarkastelu	24
	Lähteet	26

Liitteet

Liite 1. Valoisa-pimeä laatikko -testin varianssianalyysin tulokset

Liite 2. Avokenttätestin varianssianalyysin tulokset

Liite 3. Pelkoehdollistumiskokeiden varianssianalyysin tulokset

Liite 4. Pelkoehdollistumisen purkamisen varianssianalyysin tulokset

Lyhenteet

ANOVA Varianssianalyysi

C57Bl/6 Sisäsiittoinen C57Bl/6-hiirikanta

Gsr Glutationireduktaasigeeni

HPA-akseli Hypotalamus-aivolisäke-lisämunuais-akseli

PCR Polymeerasiketjureaktio

129S1 Sisäsiittoinen 129S1-hiirikanta

1 Johdanto

Ahdistus ja pelko ovat normaaleja tunteita, jotka auttavat ihmistä reagoimaan mahdollisiin uhkiin. Jos ahdistus ja pelko kuitenkin on jatkuvaa ja haittaa normaalia elämää, voidaan puhua ahdistuneisuushäiriöstä. Ahdistuneisuushäiriöitä on useanlaisia, ja ne ilmenevät usein muiden mielenterveyden sairauksien ohella. Ahdistuneisuushäiriöiden tiedetään kulkevan suvussa, mutta hyvin suuri merkitys on myös ympäristön vaikutuksilla. [1.]

Ahdistuneisuuteen liittyviä geenejä pystytään tutkimaan eläinmalleilla, joilla geenimuuntelun avulla saadaan joko vaimennettua tai voimistettua ahdistuneisuuskäyttäytymistä. Käyttäytymiskokeiden avulla vertaillaan geenin mahdollista vaikutusta eläimen käyttäytymiseen. Erilaisia hiirimalleja käytetään yleisesti ihmisten sairauksien tutkimuksessa. Hiiri on helposti käsiteltävissä, ja sen ympäristö ja olosuhteet ovat helposti muokattavissa tutkimusta varten. [4.]

Tämän työn tarkoituksena oli selvittää glutationireduktaasigeenin (*Gsr*) vaikutusta ahdistuneisuuteen hiirellä. Aikaisemmissa tutkimuksissa on *Gsr*-geenillä todettu olevan yhteys ahdistuneisuushäiriöihin [3]. Työssä suoritetuissa kokeissa keskityttiin perinteisiin käytöskokeisiin sekä pelkoehdollistumiseen ja sen purkautumiseen. Kokeissa käytetyt eläimet olivat *Gsr*-poistogeenisiä hiiriä, ja mukana oli sekä geenin suhteen heterotsygootteja että villityypin eläimiä. Poistogeenisten homotsygoottien eläinten tutkiminen ei ollut mahdollista sikiövaiheen letaalitekijöiden takia. Tarkoituksena oli verrata heterotsygoottien ja villityypin eläinten välisiä eroja, sekä stressin vaikutusta eläinten käyttäytymiseen. Hypoteesina oli, että *Gsr*-geenin suhteen heterotsygootit hiiret olisivat vähemmän ahdistuneita ja reagoisivat stressiin vähemmän verrattuna villityypin hiiriin.

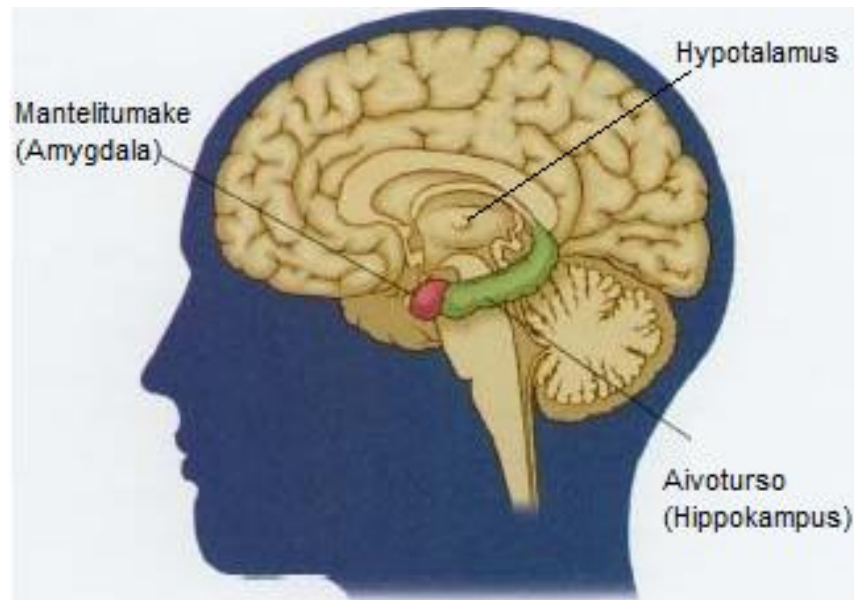
2 Teoria

2.1 Ahdistuneisuus

Jokainen ihminen tuntee joskus ahdistusta ja pelkoa. Nämä ovat normaaleita tunteita, mutta myös hyödyllisiä suojakeinoja uudessa tai pelottavassa tilanteessa. Ahdistuneisuushäiriöiksi kutsutaan psykiatrisia häiriöitä, joissa ahdistuneisuus, jännittyneisyys tai pelko ovat keskeisiä ja haittaavat normaalia elämää. Erilaisia ahdistuneisuushäiriöitä ovat muun muassa paniikkihäiriö, sosiaalisten tilanteiden pelko, määräkohteinen pelko, yleistynyt ahdistuneisuushäiriö, pakko-oireinen häiriö ja traumaperäinen stressihäiriö. [1] Ahdistuneisuushäiriöt ovat yleisimpiä mielenterveyden häiriöitä, ja Suomessa tehdyn Terveys 2000 -tutkimuksen mukaan niistä kärsii yli 4,2 % yli 30 -vuotiaasta suomalaisväestöstä joka vuosi [2]. Ahdistuneisuushäiriöihin liittyy varsin yleisesti depresiota, sekä muita mielenterveyden sairauksia ja päihdehäiriöitä [1].

Tutkimusten avulla on selvitetty, että ahdistuneisuushäiriöiden syntyyn vaikuttavat niin perintö- kuin ympäristötekijätkin. Eri ahdistuneisuushäiriöiden heritabiliteetti (osuus ilmiänsä vaihtelusta, jonka geneettiset tekijät selittävät) vaihtelee noin 30 - 60 %:n välillä. Yleistyneen ahdistuneisuushäiriön heritabiliteetti on 32 % . [4.] Vaikka pelkoa ja ahdistuneisuutta säätelevien aivoalueiden anatomiasta tiedetään verrattain paljon, molekyyli-tason säätelymekanismit tunnetaan vielä puutteellisesti. Useita geenejä on tutkimuksissa pystytty yhdistämään ahdistuneisuuteen, kuten glyoksalaasi ja glutationireduktaasi, mutta yksittäisten geenien vaikutuksista tiedetään vielä hyvin vähän. [9.]

Ahdistuksen säätelyyn osallistuu keskeisesti amygdala eli manteliumake, septohippokampaalinen järjestelmä, hypothalamus, periaqueductaalinen harmaa aine, insula eli aivosarekke sekä etu- ja singulaarinen aivokuori. Kuvassa 1 on osoitettu kyseisiä aivojen osa-alueita.



Kuva 1. Lämpileikkaus ihmisaivoista, jossa näkyy keskellä mantelitumake, aivoturso ja hypotalamus. Kuvaa muokattu alkuperäisestä [11].

Ahdistuneisuushäiriöiden hoitona käytetään yleisesti eri terapiamuotoja, sekä masennuslääkitystä ja bentsodiatsepiineja, kuten Diapam. Bentsodiatsepiinit ovat hyvin tehokkaita ahdistuksen lievittäjiä, mutta niiden käyttöön liittyy ongelmia, kuten toleranssin kehittyminen, riippuvuus ja se, että ne alentavat kognitiivisia kykyjä. Tämän takia niiden käytöstä yritetään päästä eroon. [3; 4.]

2.2 Glutathionireduktaasi-geeni

Glutathionireduktaasi (*Gsr*) on entsyymi, joka muuttaa hapettuneen glutathionin pelkistyneeksi glutathioniksi. Pelkistynyt glutathioni hapettuu glutathioniksi, kun sitä käytetään antioksidanttina. Tämän jälkeen *Gsr* muuttaa sen takaisin pelkistyneeseen muotoon, jotta se voidaan käyttää uudelleen. *Gsr* säätelee näin hapetustressiaineenvaihduntaa, ja saman aineenvaihduntareitin entsyymien yliaktiivisuutta on aikaisemmin havaittu myös ahdistuneisuushäiriöpotilailla. [4.] *Gsr*-geenin vaikutusta ahdistukseen on aikaisemmin tutkittu Iiris Hovatan tutkimusryhmässä, ja vahvin näyttö on saatu hiirimalleista. *Gsr*-geeni oli ekspressoitunut korkeammalla tasolla ahdistuneissa sisäsiittoisissa hiirikannoissa verrattuna ei-ahdistuneisiin. Kun sitä yli-ilmennettiin hiiren aivoissa, hiiret muuttuivat ahdistuneemmiksi. [9] Hovatan ryhmässä on tutkittu myös *Gsr*-geenin vaikutusta ahdistuskäyttäytymiseen hiirillä. *Gsr*-hiirillä tehtiin käytöskokeita, mutta erot genotyyppien välillä olivat pieniä. Tämän takia koe päätettiin toistaa, hieman suu-

remmalla eläinmäärällä. Tutkimuksessa osoitettiin myös, että *Gsr*-entsyymin aktiivisuus oli suurempi pelokkaiden kuin rohkeiden hiirten aivoissa. Tutkimuksessa mitattiin geeniekspressiota useasta aivojen osa-alueesta. *Gsr*-geeni oli yksi löydetyistä 17 geenistä, jonka ekspressio korreloi ahdistuneisuuskäyttäytymistä. [3; 10.]

2.3 Koe-eläimet

Hiiri ovat ylivoimaisesti yleisin koe-eläin tutkimuksessa. Hiiret ovat pieniä, helppoja käsitellä, ne lisääntyvät hyvin ja tarvittaessa niiden elinoloja voidaan kontrolloida ja muokata. Ihmisten tauteja tutkittaessa hiiret ovat geneettisesti hyvä malli, koska suurin osa ihmisen ja hiiren geeneistä on homologisia ja hiiren genomia voidaan suhteellisen helposti muokata. Neurobiologisen tutkimuksen kannalta hiiren aivot toimivat samankaltaisesti kuin ihmisen. Sisäsiittoisilla kannoilla voidaan pitää geneettinen vaihtelu mahdollisimman pienenä. Geenimuunnellut hiirikannat ovat tärkeä työkalu tutkittaessa tietyn geenin toimintaa. Geenimuunnelluilla eläimillä voidaan esimerkiksi selvittää, milloin ja missä tiettyjä geenejä ilmennetään sekä havaita ylimääräisten geenien vaikutuksia yksilönkehitykselle. Voidaan myös luoda eläinmalleja, jotka muistuttavat jotakin ihmisen sairautta. Näitä eläimiä tutkimalla voidaan selvittää sairauksien mekanismeja ja mahdollisesti löytää sairauksiin hoitokeinoja. Tietyn geenin merkitystä yksilölle voidaan tutkia myös poistamalla tämä geeni. Poistogeenisten eläinten avulla voidaan myös havaita kyseisen geenin tärkeys eliölle. Poistogeenisten eläinten tutkimista vaikeuttaa se, että joitakin geenejä poistettaessa eläimet kuolevat hyvin varhain yksilönkehityksen aikana, ja joissakin tapauksissa toiset geenit voivat kompensoida poistetun geenin roolia. [4.]

Tässä tutkimuksessa käytettiin sisäsiittoisia *Gsr*-hiiriä. Kyseessä on *Gsr*-geenin suhteen poistogeeninen hiirilinja. Alkuperäinen kanta, B6;129S5-*Gsr*Gt(neo)472Lex, on peräisin The Mutant mouse Regional Resource Centeristä, ja se on tuotettu ns. gene trap menetelmällä. Suomessa hiirilinja takaisinristeytettiin C57Bl/6JRccHsd-kantaan. Siitostuksessa hetrosygootti uros risteytetään villityypin C57Bl/6-naaran kanssa, jolloin poikasista syntyy poistetun *Gsr*-geenin suhteen heterotsygootteja sekä villityypin hiiriä samassa suhteessa. Lähes kaikki *Gsr*-geenin suhteen homotsygootit poikaset kuolevat sikiönkehityksen aikana, ilmeisesti aivofenotyyppin vuoksi. Poistogeenisistä eläimistä puhuttaessa, homotsygootti yksilö on sellainen, jolta kyseinen geeni puuttuu kokonaan,

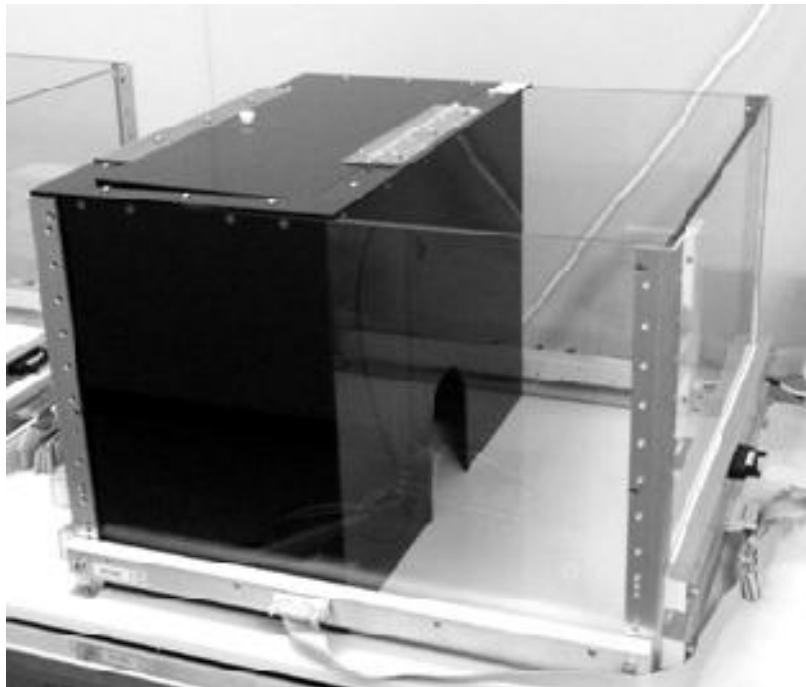
heterotsygootti sellainen, jolla vaimennettu geeni on peritty toiselta vanhemmalta, ja villityypin eläimellä geeni on toiminnassa. [3 s.54 – 57.]

2.4 Käyttäytymiskokeet

Käyttäytymiskokeiden avulla voidaan tutkia esimerkiksi monia psykiatrisia tautimalleja. Eläin laitetaan tiettyyn testiympäristöön ja riippuen tutkittavasta ilmiasusta tarkkaillaan tai mitataan eri parametreja. Monet kokeet ovat alun perin kehitetty rotille, mutta samoja testejä on myöhemmin alettu soveltamaan myös hiirillä. [5; 6.]

2.4.1 Valoisa-pimeä laatikko -testi

Valoisa-pimeä laatikko, kuvassa 2, on jaettu puoliksi pimeään ja valoisaan osaan. Keskellä on aukko, mistä eläin pääsee kulkemaan. Testissä tarkkaillaan eläimen liikkeitä valoisan ja pimeän puolen välillä. Laatikossa olevien infrapunatunnistimien avulla tietokone tallentaa kaikki eläimen liikkeet. Kerätyn tiedon avulla voidaan tarkkailla, kuinka paljon eläin viettää aikaa valoissassa tai pimeässä ja millaisen matkan eläin kulkee.



Kuva 2. Valoisa-pimeä laatikko.

Luonnostaan hiiri viettää enemmän aikaa pimeällä puolella, joka on sille turvallisempi ympäristö kuin valoisa puoli. Hiiren käyttäytyminen perustuu välttämislähestymis-ristiriitaan, jolloin sen on valittava onko se turvallisella vai uudella alueella. Luonnossa hiiri tutkii ympäristöään ravinnon löytämiseksi ja tiedostaakseen mahdollisia uhkia. Tuloksia analysoitaessa on otettava huomioon keskelle jäävä ns. harmaa vyöhyke, jossa ei ole täysin pimeää, eikä valoisa. [5 s.45.]

2.4.2 Avokenttätesti

Avokenttätestissä voidaan käyttää täysin samaa laatikkoa kuin valoisa-pimeätestissäkin, ainoana erona, siitä on poistettu pimeä puoli. Avokenttätesti voidaan tehdä myös pyöreässä sylinterimäisessä laatikossa. Kuvassa 3 on kaksi rotalle tarkoitettua avokenttätestilaatikkoa, joissa voi nähdä testissä olevat kaksi hiirtä.



Kuva 3. Kaksi avokenttätestilaatikkoa.

Testissä tarkkaillaan eläimen liikkeitä ja aktiivisuutta. Avokenttätesti on yleinen määrittämään aktiivisuutta. Silloin mitataan eläimen kulkemaa matkaa laatikossa tietyssä ajassa. Ahdistuskäyttäytymistä tutkittaessa tarkastellaan kuinka paljon eläin viettää aikaa laatikon keskellä ja kuinka paljon reunoilla ja kulmissa. Ahdistusta mitatessa on tärkeää, että laatikko on kirkkaasti valaistu, jolloin se herättää eläimissä enemmän pelkoa. [5 s.44.]

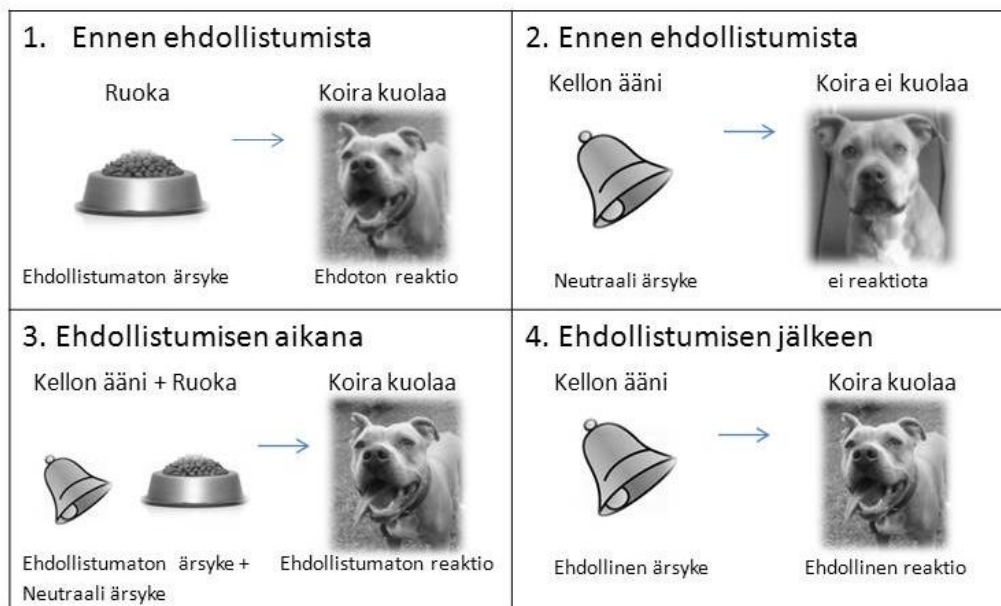
2.4.3 Immobilisaatiostressi

Immobilisaatiossa eläimen liikkuminen estetään määrätyksi ajaksi, kuten asettamalla eläin muoviputkeen, jossa se ei mahdu liikkumaan. Immobilisaatio aiheuttaa eläimelle ylimääräistä stressiä, ja ajan ja valon määrällä voidaan vaikuttaa immobilisaation aiheuttaman stressin voimakkuuteen. Immobilisaatiostressi lisää elimistön tärkeimmän stressijärjestelmän, hypotalamus-aivolisäke-lisämunuais-akselin eli HPA-akselin aktivoitumista. Immobilisaation jälkeen ahdistuneisuutta mitataan käyttäytymiskokeen avulla. [3 s.79.]

2.4.4 Pelkoehdollistuminen

Venäläinen fysiologian tutkija Ivan P. Pavlov tunnetaan klassisen ehdollistumisen isänä. Hän tuli tunnetuksi ehdollistumiskokeistaan, joita hän teki koirilla.

Kuvassa 4 on esitetty Pavlovin klassinen ehdollistuminen koiralla. Ennen ehdollistumista jo ruoan haistaminen aiheuttaa ehdollistumattoman reaktion, eli koira alkaa kuolaamaan. Kellon ääni on neutraali ärsyke eikä tämä aiheuta reaktiota. Kun ehdollistumaton ja neutraali ärsyke (ruoka ja kello) esitetään toistuvasti yhdessä, koira ehdollistuu kuolaamaan pelkästään kellon äänestä. Tällöin neutraali ärsyke muuttuu ehdolliseksi ärsykkeeksi ja kuolaaminen ehdolliseksi reaktioksi. [5 s. 50 - 51; 6 s. 233 – 235; 8.]



Kuva 4. Pavlovin klassinen ehdollistuminen pääpiirteittäin.

Pelkoehdollistuminen on tärkeä mekanismi monissa ihmisen ahdistuneisuushäiriöissä, kuten paniikkihäiriössä. Pelkoehdollistuminen perustuu hyvin pitkälle klassiseen ehdollistumiseen, mutta siinä ehdollistumaton ärsyke on epämiellyttävä sähköisku. Eläin laitetaan testikammioon, jossa sille ehdollisena ärsykkeenä soitetaan yksitaajuuksista ääntä. Äänen viimeisen sekunnin aikana eläin saa lievän sähköiskun lattian ritilästä. Monelle lajille paikalleen jähmettyminen on tyypillistä pelkokäyttäytymistä, joten saadessaan sähköiskun eläin jähmettyy ja sen karvat nousevat pystyyn. Sähköisku annetaan eläimelle muutaman kerran, jolloin eläin ehdollistuu pelkäämään pelkkää ääntä. Pelkoehdollistumistestissä voidaan tutkia myös kontekstiin eli ympäristöön ehdollistumista, jolloin ehdollistumisen jälkeen ääntä soitetaan samassa testikammiossa, mutta ympäristö on muutettu niin, ettei eläin tunnista sitä. Myös pelkoehdollistumisen purkautumista voidaan testata. Ehdollistuminen voidaan purkaa toistettaessa ääntä useita kertoja ilman ärsykettä, jolloin eläin oppii, ettei ääntä tarvitse pelätä. Tämä kuitenkin vaatii useita toistoja.

Aivorakenne, jossa ehdollistumisen assosiaatio tapahtuu, on mantelitulmake, kun taas kontekstiin ehdollistumista säätelee aivoturso [8].

3 Työn suoritus

3.1 Eläinten tuotto

Tutkimuksessa käytetyt eläimet tuotettiin Helsingin yliopiston koe-eläinyksikössä. Eläinten hyvinvoinnista huolehtivat koulutetut eläintenhoitajat ja niiden kasvattamisessa noudatettiin koe-eläinlain ja -asetuksen määrittämiä vaatimuksia. Tämä tarkoittaa käytännössä sitä, että eläimet saivat kasvaa vaatimusten mukaisissa häkeissä sekä häkkien puhtaudesta huolehdittiin säännöllisesti. Lisäksi eläimillä oli aina puhdasta vettä saatavilla ja ruokaa rajoittamaton määrä (ad libitum).

Siitostuksessa villityypin naaraat risteytettiin heterotsygootin uroksen kanssa, jolloin jälkeläiset olivat sekä villityyppisiä että heterotsygootteja perimältään Gsr-geenin suhteen. Poikaset vieroitettiin 3 viikon iässä, jonka jälkeen ne saivat kasvaa 4 - 5 hiiren ryhmissä. Noin 11-viikkoisina eläimet erotettiin yksittäin häkkeihin.

3.2 Genotyyppaus

Genotyyppauksella voidaan määrittää yksilön tietty DNA-sekvenssi ja verrata sitä toisten yksilöiden sekvensseihin. Näin voidaan esimerkiksi verrata tietyn geenin esiintymistä yksilöiden välillä. Genotyyppaukseen tarvitaan näyte, joka sisältää yksilön DNA:ta. Hiirellä näyte otetaan yleensä korvasta tai hännästä.

Gsr-hiirten genotyyppauksella haluttiin selvittää, olivatko eläimet heterotsygotteja Gsr-geenin suhteen, vai ns. viillityypin eläimiä.

Kaikki eläimet genotyyppattiin korvapalanäytteestä käyttäen PCR-reaktiota. Ensin solut hajotettiin Direct PCR Lysis -reagenssilla (Viagen Biotech), johon oli lisätty 0,3 mg/ml proteaasi kinaasi K:ta. Näytteitä inkuboitiin +55-asteisessa lämpöhauteessa yön yli ja lyysaus lopetettiin nostamalla lämpötila + 85 asteeseen 45 min ajaksi. Hajotetuista näytteistä tehtiin kaksi erillistä PCR-reaktiota, joissa käytettiin eri alukepareja.

Alukeparit heterotsygotille:

0669-3' aluke (5'-ACTCCTCCACGCCAGAACCCTC-3')

0669-5' aluke (5'-AGTCACAAGCTGGGTGGCACTTGC-3')

Tuotteen koko 292 bp.

Alukeparit villityypille:

0669-3' aluke (5'-ACTCCTCCACGCCAGAACCCTC-3')

LTR-2 aluke (5'-AAATGGCGTTACTTAAGCTAGCTTGC-3')

Tuotteen koko 342 bp.

PCR-reaktioseoksen koostumus on kuvattu taulukossa 1

Taulukko 1. PCR-reaktioseos.

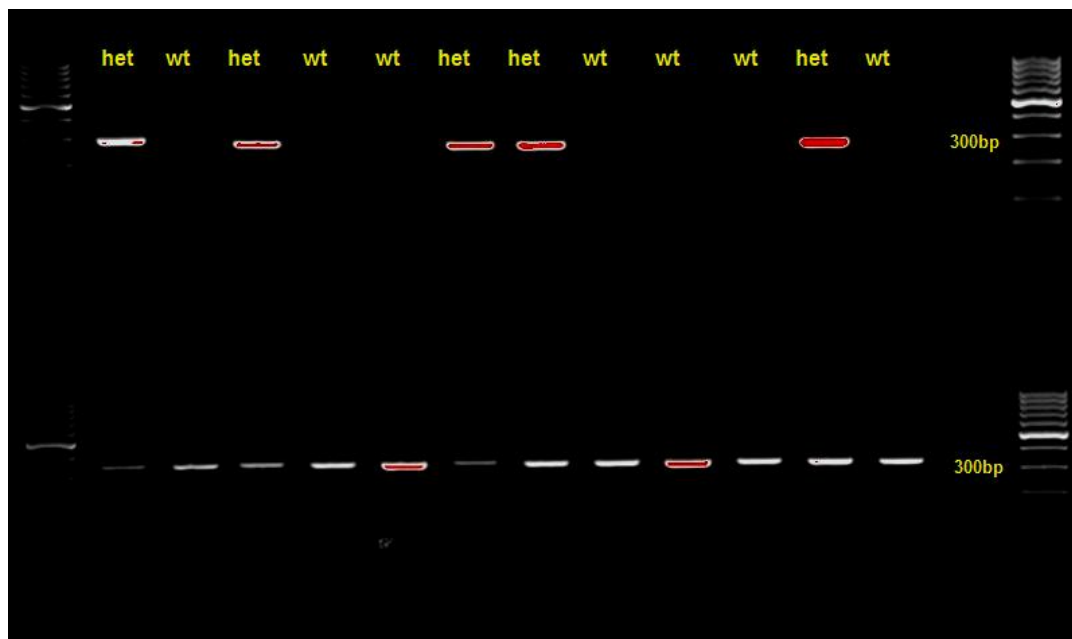
	Konsentraatio	µl
GoTaq Green Mastermix 2X	1X	7,5
H ₂ O	-	6,0
5'-aluke	10 µM	0,5
3'-aluke	10 µM	0,5
DNA-templaatti	-	0,5

PCR-ohjelma on esitetty taulukossa 2.

Taulukko 2. Genotyypauksen PCR-ohjelma.

PCR ohjelma	
1. Alkudenaturaatio	94°C, 3 min
2. Denaturaatio	94°C, 30 s
3. Annealing	61°C, 10 s
4. Ekstensio	72°C, 45 s
5. Palaa vaiheeseen 2.	29 x
6. Loppuekstensio	72°C, 5 min
7. Loppu	10°C, ∞

Lopuksi PCR-tuotteet ajettiin 2 % agarosigeelillä ja geelikuvasta voitiin lukea tulokset. Kuvassa 5 on esimerkki geelikuvasta. Ylemmällä rivillä on ensimmäisen alukeparin tuotteet ja alemmalla rivillä toisen alukeparin tuotteet. Villityypin eläimillä tuotetta ei synny ensimmäisellä alukeparilla ja heterotsygooteilla tuotetta syntyy molemmilla alukepareilla.



Kuva 5

Esimerkki genotyypauksen agarosigeelikuvasta

Kokeen jälkeen otettiin uudet genotyypausnäytteet ja genotyyppi varmistettiin.

3.3 Ryhmäjako

Hiiret erotettiin yksittäin häkkeihin viikkoa ennen käytöskokeiden aloittamista, koska ryhmäasetelman tiedetään vaikuttavan ahdistukseen. Ryhmät jaettiin sekä genotyypausnäytteiden perusteella, että sukupuolen mukaan. Ryhmäjako on esitetty taulukossa 3. Kaikkiin ryhmiin oli tarkoitus saada 15 eläintä, mutta koska villityypin naaraita ei ollut tarpeeksi, yhteen ryhmään saatiin vain 13 eläintä.

Taulukko 3. Ryhmäjako.

Ryhmä	Urokset (n)	Naaraat (n)
Heterotsygootit	15	15
Villityypit	15	13

Ryhmien jakamisen jälkeen eläimet koodattiin uudestaan ja tiedot geneettisestä taustasta peitettiin. Näin voitiin varmistaa testien suorittajan puolueettomuus.

3.4 Käyttäytymiskokeet

Käyttäytymiskokeet aloitettiin kun eläimet olivat 12-viikkoisia. Kaikki käyttäytymiskokeet pyrittiin suorittamaan aamulla jolloin eläimet olivat mahdollisimman virkeinä normaaliin vuorokausirytmiiin verrattuna. Käyttäytymiskokeita varten huolehdittiin, ettei eläimille aiheuteta minkäänlaista tarpeetonta stressiä, mikä voisi vaikuttaa kokeen lopputulokseen. Eläinten käsittely pidettiin mahdollisimman vähäisenä. Ennen jokaista testiä eläimet siirrettiin tutkimuhuoneen eteistilaan hämääseen valaistukseen rauhoittamaan 45 min ajaksi.

Kokeen aikataulu on esitetty taulukossa 4. Testit tehtiin kahdessa eri erässä, suuren eläinmäärän takia.

Taulukko 4. Käyttäytymiskokeiden aikataulu.

Päivä	Testi
1. ja 2.	Valoisa-pimeä laatikko-testi
7. ja 8.	Avokenttätesti
12. ja 13.	30 min immobilisaatio + Valoisa-pimeä laatikko-testi
15. ja 16.	30 min immobilisaatio + Avokenttätesti
21. ja 22. 26. Ja 27.	Pelkoehdollistuminen
23. ja 24. 28. ja 29.	Pelkoehdollistumisen purkaminen

3.4.1 Valoisa-pimeä laatikko-testi

Testissä käytettiin rotille tarkoitettua valoisa-pimeä laatikkoa (Med Associates). Se ei eroa muuten hiirille tarkoitettua laatikosta kuin kokonsa puolesta. Laitteistossa käytettiin Activity monitor -ohjelmaa, joka tallensi ja analysoi eläimen liikkeitä.

Testi aloitettiin asettamalla hiiri testilaatikon pimeälle puolelle vasempaan etunurkkaan. Jokaista hiirtä monitoroitiin tasan 5 min. Eläinten välissä laatikot puhdistettiin miedolla pesuaineella. Koe toistettiin 11 päivän kuluttua, niin että ennen testiä eläin laitettiin immobilisaatioputkeen 30 min ajaksi pimeään laatikkoon. Immobilisaation jälkeen eläimen annettiin rauhoittua kotihäkissään 5 min ajan, jonka jälkeen tehtiin välittömästi valoisa-pimeä laatikko-testi.

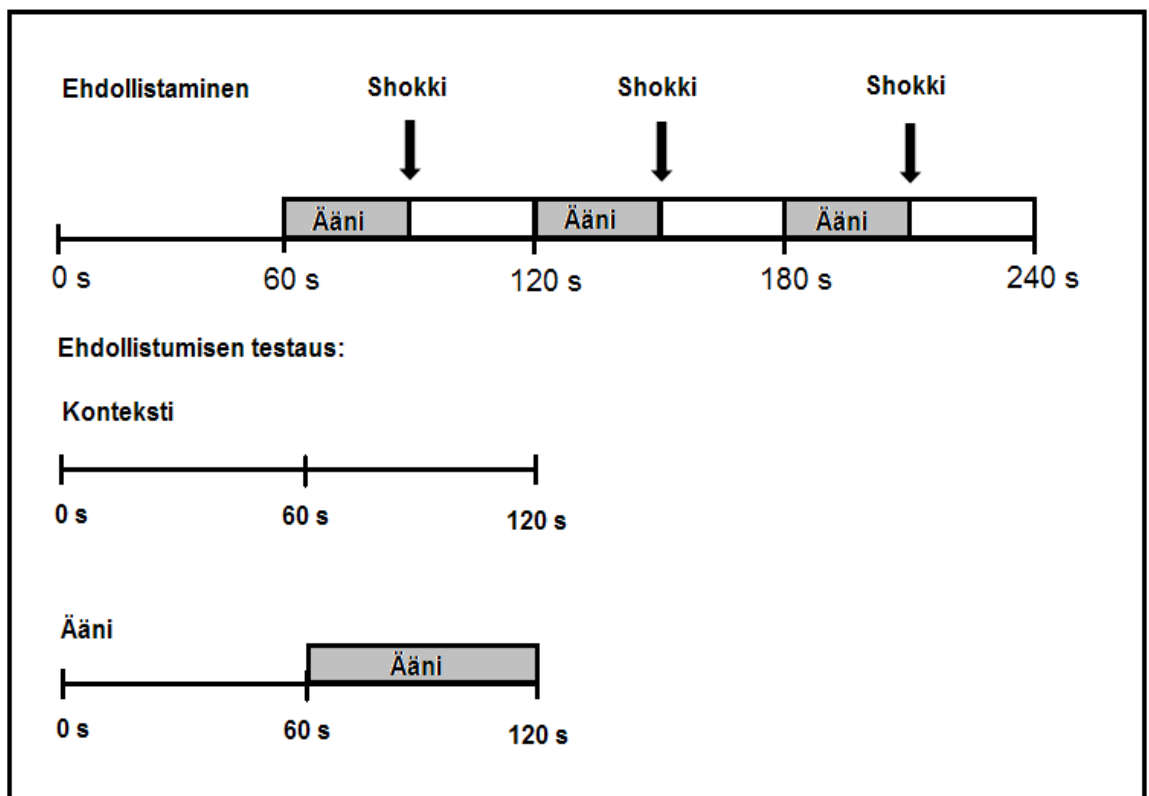
3.4.2 Avokenttätesti

Avokenttätesti suoritettiin samalla laitteistolla ja tietokoneohjelmalla kuin valoisa-pimeätestikin ja käytettiin samaa laatikkoa ilman pimeää puolta. Testissä eläin asetettiin aluksi samaan vasempaan etunurkkaan kuin valoisa-pimeätestissäkin. Eläintä monitoroitiin viiden minuutin ajan. Avokenttälaitikko puhdistettiin jokaisen eläimen välissä miedolla pesuaineella. Koe toistettiin 8 päivän kuluttua, niin että ennen mitausta eläimelle tehtiin 30 min immobilisaatio muoviputkessa, pimeässä laatikossa. Immobilisaation jälkeen eläin siirrettiin kotihäkkiin 5 min ajaksi, jonka jälkeen välittömästi tehtiin avokenttätesti.

3.4.3 Pelkoehdollistuminen

Pelkoehdollistumistestissä käytettiin MED Associatesin Video Tracking of Fear Conditioning System (VFC) -laitteistoa ja Video Freeze Software -ohjelmistoa. Laitteisto laskee eläimen jähmettymisiä paikoilleen. Ohjelmaan voidaan määrittää, kuinka pitkään eläimen täytyy olla liikkumatta, jotta laitteisto katsoo sen jähmettymiseksi.

Ensimmäisenä testipäivänä eläin ehdollistettiin pelkäämään ääntä. Yksitaajuuksista ääntä (5000 Hz) soitettiin 30 s ajan 92 db:n voimakkuudella ja viimeisen 2 s ajan eläin sai 0,4 mA:n sähköshokin lattian ritilästä. Ääni yhdistettynä shokkiin toistettiin 3 kertaa. Toisena päivänä testattiin ehdollistumista ääneen ja kontekstiin. Ääneen ehdollistumista testattaessa eläin laitettiin samaan testikammioon 2 min ajaksi ilman ääntä ja ilman sähköiskua. Eläimen jähmettymistä tarkkailtiin. Samana päivänä 3 h:n tauon jälkeen testattiin ehdollistumista kontekstiin. Testikammion sisustaa muutettiin peittämällä lattiaritilä, lisäämällä hieman häkeissä käytettävää kuiviketta ja kivi. Näin eläin ei enää tunnistanut kammiota samaksi. Muutetulla sisustuksella eläimelle soitettiin samaa ääntä, ja tarkkailtiin eläimen jähmettymistä. Kuvassa 6 on esitetty pelkoehdollistumiskokeiden protokolla.



Kuva 6. Pelkoehdollistuminen ja sen testauksen protokolla.

Pelkoehdollistumisen purkaminen tehtiin kaksipäiväisellä kokeella. Testikammion sisus oli muutettu samoin kun edellisenä päivänä kivellä ja kuivikkeella. Eläimelle soitettiin ääntä, johon se oli ehdollistunut 30 s ajan 20 kertaa, 5 s välein. Sama toistettiin 2 peräkkäisenä päivänä. Pelkoehdollistumisen purkamisen protokolla on esitetty kuvassa 7.

Pelkoehdollistumisen purkaminen (2 päivää)



Kuva 7. Pelkoehdollistumisen purkaminen.

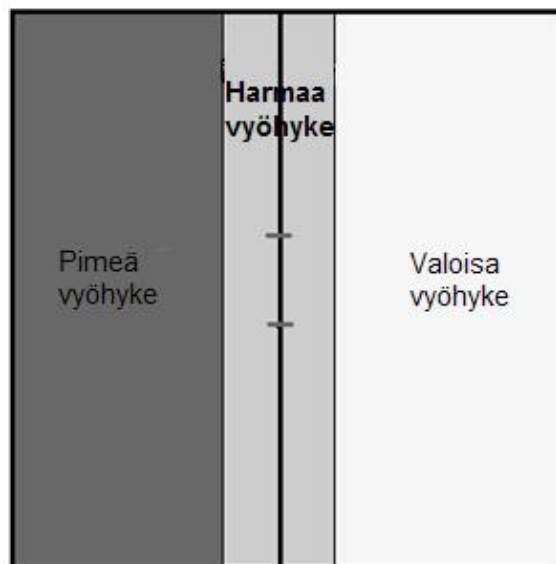
3.5 Tilastolliset menetelmät

Kaikki havaintoaineisto käsiteltiin PAWS-statistics -tilasto-ohjelmalla. Tuloksista laskettiin ANOVA-variانسianalyysin avulla erojen tilastollista merkitsevyyttä. Jos p-arvo on vähemmän kuin 0,05, lasketaan ero tilastollisesti merkittäväksi. Tuloksista piirrettiin kuvaajat ja laskettiin, eroavatko ryhmien keskiarvot tilastollisesti toisistaan. Liitteinä 1 - 4 variانسianalyysien tulokset.

4 Tulokset

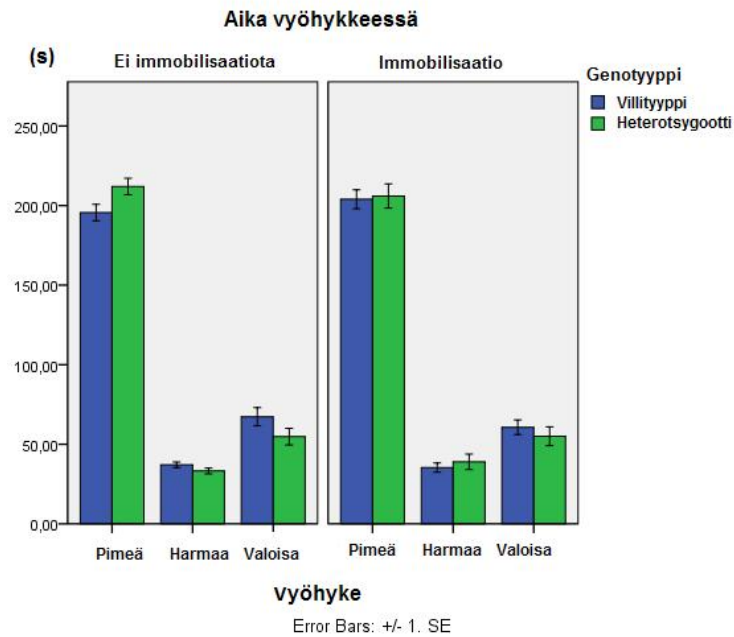
4.1 Valoisa-pimeä laatikko-testi

Valoisa-pimeä laatikko-testin tuloksissa tarkasteltiin genotyypin, sukupuolen ja immobilisaation vaikutusta eläinten ahdistuneisuuteen. Lisäksi katsottiin oliko testikammioiden tai mittauspäivien välillä eroja. Valoisa-pimeä laatikko jaettiin kolmeen vyöhykkeeseen: valoisa, pimeä ja harmaa vyöhyke. Harmaa vyöhyke on alue, joka ei ole täysin pimeä eikä valoisa. Kuvassa 8 on esitetty kuinka, laatikon vyöhykkeet jaettiin. Tuloksissa tarkasteltiin eläimen viettämää aikaa eri vyöhykkeissä, sekä kuljettua matkaa. Lisäksi tarkasteltiin aikaa, jolloin eläin ensimmäisen kerran astui valoisalle puolelle.



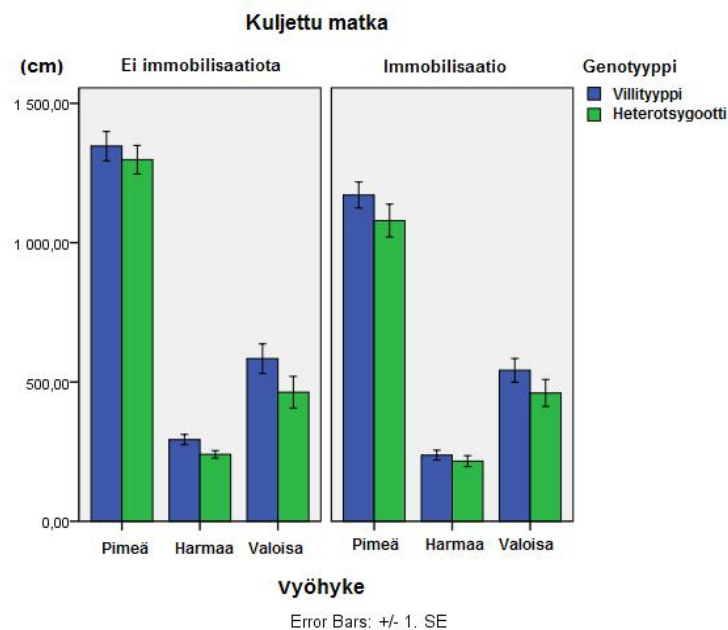
Kuva 8. Valoisa-pimeä laatikon eri vyöhykkeet.

Kuvassa 9 on esitetty, kuinka paljon aikaa on vietetty eri vyöhykkeissä. Genotyyppien välillä näkyy pieni ero, jonka mukaan heterotsygotit eläimet viettävät enemmän aikaa pimeällä puolella, mutta ero ei ole tilastollisesti merkittävä. Immobilisaatiolla ei ollut tuloksiin vaikutusta.



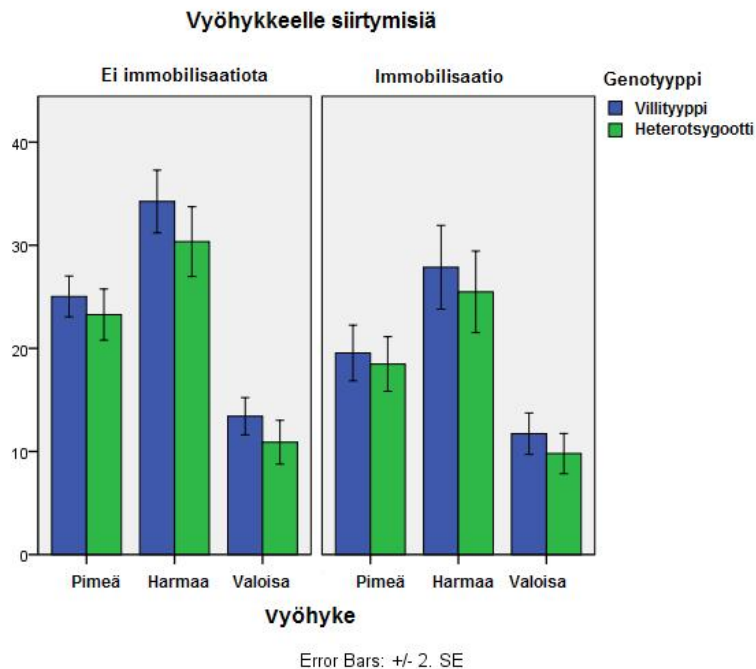
Kuva 9. Vietetty aika eri vyöhykkeissä.

Kuvassa 10 on esitetty kuljettu matka eri vyöhykkeissä ja vertailtu immobilisaation vaikutusta siihen. Kuvaajasta voidaan nähdä kuinka eläimet luontaisesti viettävät eniten aikaa pimeällä vyöhykkeellä. Heterotsygootit liikkuvat hieman vähemmän kuin villityypin eläimet, mutta genotyyppien välillä ei kuitenkaan ole tilastollisesti merkittävää eroa. Kuvaajasta voi myös nähdä, kuinka immobilisaatio vähentää eläinten liikkumaa matkaa.



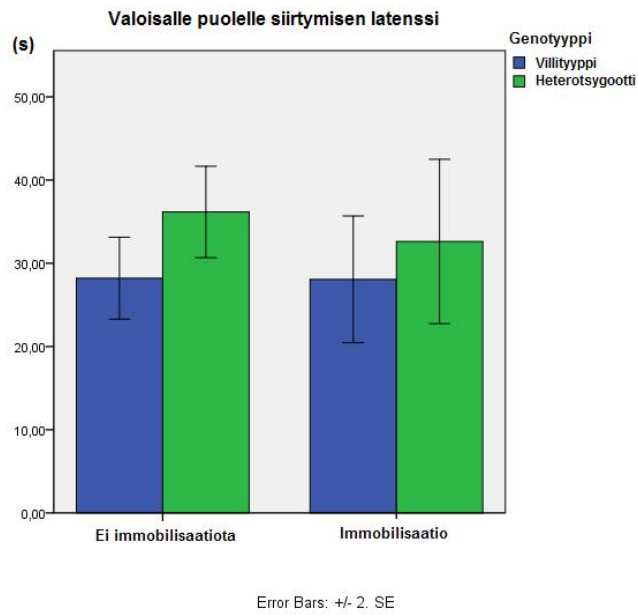
Kuva 10. Kuljettu matka eri vyöhykkeissä.

Kuvassa 11 nähdään, kuinka paljon eläimet ovat siirtyneet vyöhykkeiden välillä. Useimmat siirtymiset ovat tapahtuneet harmaalle vyöhykkeelle ja tämä johtuu siitä, että harmaa vyöhyke on läpikulkualuetta. Genotyyppien välillä ei ole tilastollisesti merkittävää eroa. Myöskään immobilisaatiolla ei ole merkittävää vaikutusta.



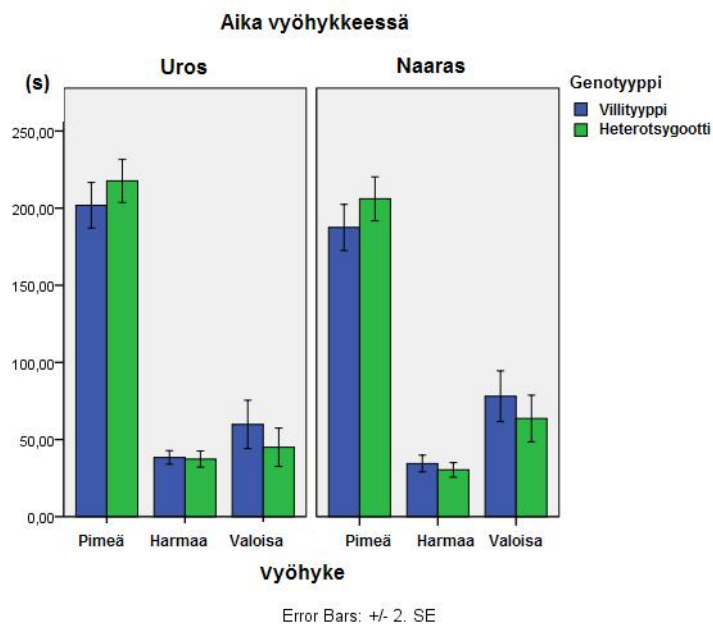
Kuva 11. Siirtymiset vyöhykkeiden välillä.

Mittauksissa kirjattiin ylös myös latenssiaika valoisalle puolelle siirtymisessä, eli se aika, mikä eläimellä menee mittauksen alusta siihen, kun se astuu ensimmäisen ker- ran valoisalle puolelle. Kuvassa 12 on esitetty pylväsdiagrammi, jossa on vertailtu genotyypin ja immobilisaation vaikutusta latenssiaikaan. Kuvasta voidaan nähdä heterotsygoottien eläinten latenssiajan olevan pidempi, ja ilman immobilisaatiota ero genotyyppien välillä on tilastollisesti merkittävä ($p=0,038$). Immobilisaatio kuitenkin tasoitti eroa ja kasvatti eläinten välistä hajontaa.



Kuva 12. Latenssiaika valoisalle puolelle siirtymiselle.

Lisäksi verrattiin sukupuolen merkitystä vietettyyn aikaan eri vyöhykkeissä. Kuvassa 13 voidaan nähdä, että sukupuolten välillä ei ole tilastollisesti merkittävää eroa. Liitteenä 5 ANOVA varianssianalyysin tulokset.



Kuva 13. Vietetty aika erivyöhykkeissä sukupuolittain.

Valoisa–pimeä laatikko– testin ANOVA-varianssianalyysin tulokset liitteenä 1.

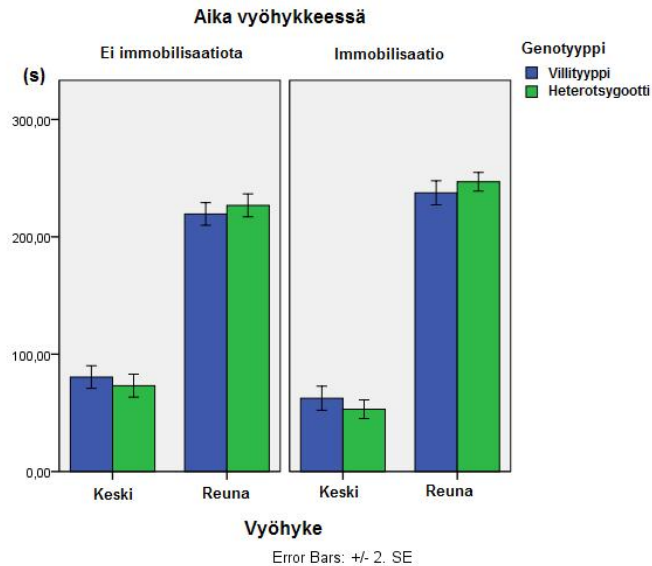
4.2 Avokenttätesti

Avokenttätestissä tarkasteltiin genotyypin, immobilisaation sekä sukupuolen vaikutusta eläinten ahdistuneisuuskäyttäytymiseen. Avokenttä jaettiin kahteen vyöhykkeeseen, jotka on esitetty kuvassa 14.



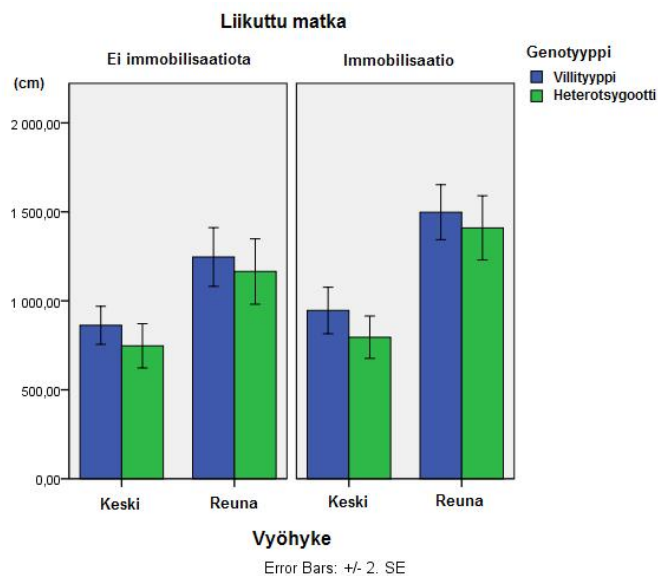
Kuva 14. Avokentän vyöhykejako.

Kuvassa 15 on tarkasteltu vietettyä aikaa eri vyöhykkeissä, sekä genotyypin ja immobilisaation vaikutusta siihen. Jälleen kuvaajasta on nähtävissä, ettei ryhmien välillä ole tilastollisesti merkittävää eroa. Immobilisaatiolla ei ollut vaikutusta eri vyöhykkeissä vietettyyn aikaan.



Kuva 15. Vietetty aika eri avokentän vyöhykkeissä.

Avokenttätestissä liikuttua matkasta on piirretty kuva 16. Siinä tarkastellaan eri vyöhykkeissä liikuttua matkaa ja verrataan genotyypin ja immobilisaation vaikutusta siihen. Hiirelle luontaisella tavalla eläimet ovat viettäneet enemmän aikaa reuna-vyöhykkeellä kuin keskellä. Jälleen on huomattavissa, että villityypin eläimet liikkuvat hieman enemmän, mutta ero ei ole tilastollisesti merkittävä. Immobilisaatiolla ei myöskään ole tilastollisesti merkittävää vaikutusta.

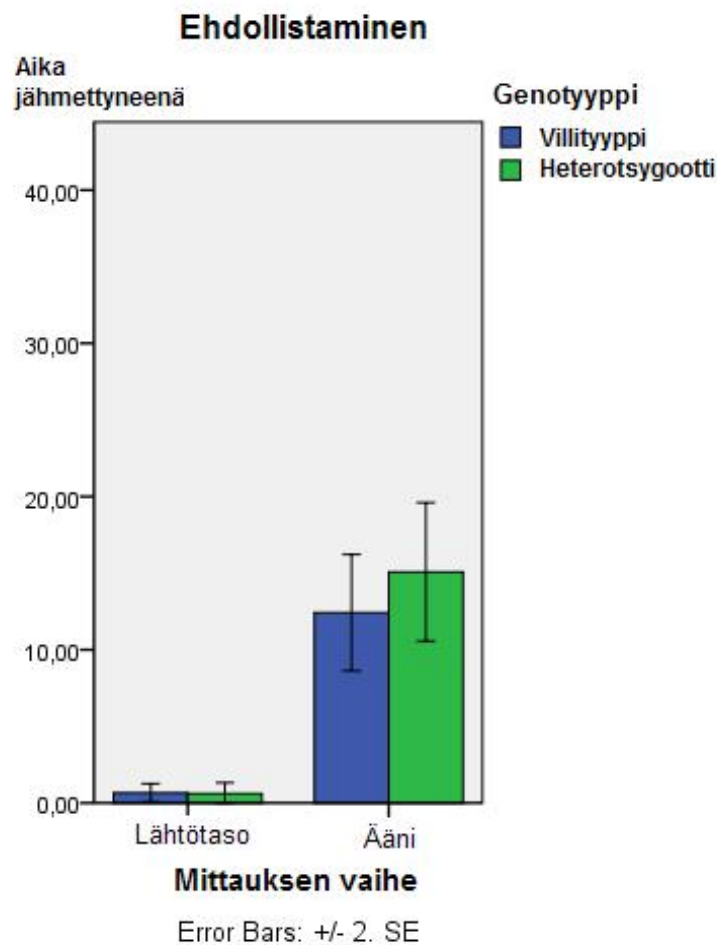


Kuva 16. Liikuttu matka avokentän eri vyöhykkeissä.

Avokenttätestin ANOVA-varianssianalyysin tulokset liitteenä 2.

4.3 Pelkoehdollistumiskoe

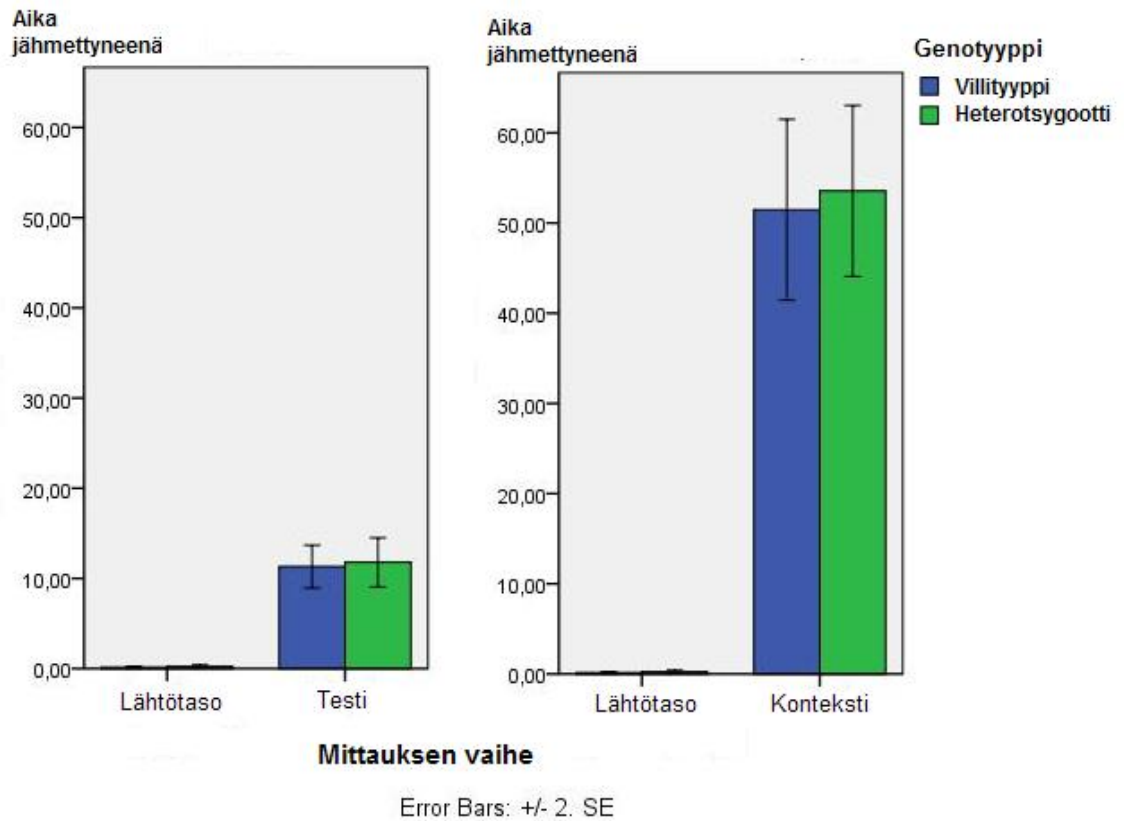
Pelkoehdollistumiskokeen tuloksissa tarkasteltiin eläimen paikalleen jähmettymisten määrää ja verrattiin sitä lähtötilanteeseen. Aluksi eläin ehdollistettiin pelkäämään ääntä. Kuvassa 17 lähtötaso tarkoittaa testin ensimmäistä 60 s, jolloin eläimelle ei ole esitetty ääntä, eikä se ole saanut sähköshokkia. Ääni tarkoittaa ehdollistamisen viimeistä ääntä, johon on yhdistetty sähköisku. Kuvasta voi nähdä, että eläinten jähmettyminen on lisääntynyt huomattavasti lähtötasoon verrattuna.



Kuva 17. Hiirten pelkoehdollistuminen.

Lisäksi testattiin, liittyikö pelkoehdollistumiseen kontekstiin ehdollistumista ja toimiko ääneen ehdollistuminen muuttuneessa ympäristössä. Kuvassa 18 on esitetty aika, minä eläin on ollut jähmettyneenä kontekstia sekä ääneen ehdollistumista testatessa. Kontekstin lähtötaso on otettu suoraan ehdollistamisen lähtötasosta ja itse konteksti

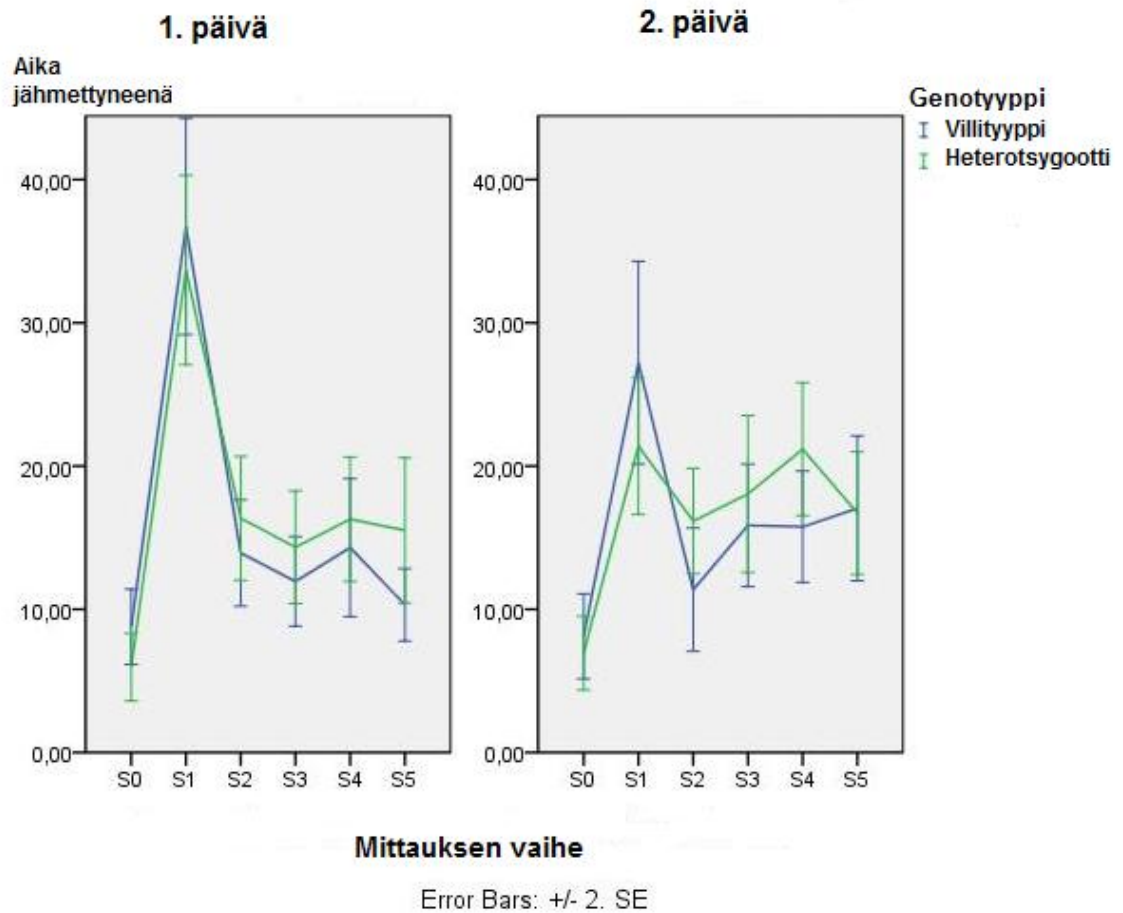
tarkoittaa testin koko kahden minuutin aikaa. Ääneen ehdollistumisen testauksessa pohjataso on ensimmäiset 60 sekuntia ja testi viimeiset 60 sekuntia, jolloin ääni on esitetty.



Kuva 18. Kontekstiin ja ääneen ehdollistuminen.

Pelkoehdollistumistestien ANOVA-varianssianalyysien tulokset liitteenä 3.

Pelkoehdollistumisen purkaminen tehtiin kaksipäiväisellä kokeella. Tuloksissa koko mittaus jaettiin kuuteen samanpituiseen vaiheeseen, tulostenkäsittelyn helpottamiseksi. Kuvassa 19 on esitetty ensimmäisen ja toisen päivän ehdollistumisen purkaminen.



Kuva 19. Ensimmäisen ja toisen päivän pelkoehdollistumisen purkaminen. Mittaus jaettiin kuuteen yhtä pitkään vaiheeseen, jotka näkyvät kuvaajassa x-akselilla.

Kuten tyypillistä ehdollistumisen purkamisessa, aluksi pelko voimistuu mutta lähtee pian laantumaan. Toisena päivänä lähtötason pitäisi olla matalammalla, eikä pelon pitäisi nousta yhtä voimakkaaksi kuin ensimmäisenä päivänä. Kuvaajasta ensimmäisen päivän tuloksista voi nähdä, että ehdollistumisen purku toimii. Toisen päivän kohdalla heterotsygoottien eläinten pelko nousee hiljalleen koko mittauksen ajan. Tilastollisesti erot eivät ole merkittäviä.

Pelkoehdollistumisen purkamisen ANOVA-varianssianalyysin tulokset liitteenä 4.

5 Tulosten tarkastelu

Opinnäytetyön tarkoituksena oli tutkia Gsr-geenin vaikutusta hiirten ahdistuneisuus-käyttäytymiseen. Hypoteesina oli, että Gsr-geenin vaikutus näkyisi erona heterotsygoottien ja villityypin eläinten välillä. Heterotsygoottien uskottiin olevan vähemmän ahdistuneita. Immobilisaation tavoitteena oli voimistaa ahdistuneisuutta ja hypoteesina oli, että immobilisaation vaikutus heterotsygootteihin eläimiin olisi pienempi kuin villityypin eläimiin.

Käyttäytymiskokeita tarkastellessa on muistettava kokeen mahdolliset virhelähteet. Vaikka koko kokeen ajan pyritään eläimet pitämään mahdollisimman stressittömissä ja muuttumattomissa oloissa, voi ympäristöllä olla vaikutusta. Kokeen suorittajalla tai käsittelytavoilla voi olla merkitystä eläinten kokemaan stressiin. Lisäksi häkkien puhdistaminen ja muut eläintenhoitajien toimet voivat vaikuttaa. Yksilötasolla ulkopuolisten häiriötekijöiden vaikutus vaihtelee suuresti. Käyttäytymiskokeissa yksilöiden välinen hajonta on normaalia ja tuloksia tarkastellessa on muistettava, että varianssianalyysi ottaa huomioon hajonnan ja näin se vaikuttaa myös tilastolliseen merkitsevyyteen.

Käyttäytymiskokeiden tulosten perusteella oli nähtävissä, että villityypin eläimet liikkivat enemmän ja olivat aktiivisempia. Liikkumisen perusteella heterotsygootit eläimet vaikuttivat enemmän ahdistuneilta kuin villityypit. Sekä valoisa-pimeä, että avokenttä-testissä suunta oli sama, mutta ainoa tilastollisesti merkitsevä ero oli valoisalle puolelle siirtymisen latenssijassa, jonka mukaan villityypin eläimet olivat rohkeampia siirtymään valoisalle puolelle. Aikaisemmissa käytöskokeissa tulokset ovat olleet päinvastaisia [3; 9; 10; 12]. Gsr-geenin vaikutusta ahdistuneisuuteen on tähän mennessä tutkittu pääasiassa Iiris Hovatan tutkimusryhmässä ja suurin näyttö on hiirimalleista. Tämän tutkimuksen tulokset eroavat suhteessa aikaisemmasta, että heterotsygootit hiiret vaikuttivat ahdistuneemmilta kuin villityypin eläimet. Toisaalta on otettava huomioon, että edelliset kokeet oli tehty eri laitteistolla ja eri henkilön toimesta. Lisäksi kokeista oli yli vuosi aikaa. Kaikki nämä tekijät voivat vaikuttaa tulokseen.

Immobilisaatiolla tarkoitus oli saada genotyyppien välille suuremmat erot, mutta tulosten perusteella erot ennemminkin tasoittuivat. Täytyy myös muistaa, että eläimet olivat ennen immobilisaatiota käyneet läpi aikaisemman käyttäytymiskokeen, joten tuloksissa voi näkyä myös eläinten oppiminen ensimmäisestä kerrasta. Voihan olla, että im-

mobilisaation pitäisi olla pidempi tai stressiä pitäisi aiheuttaa kroonisesti, että sen vaikutus näkyisi hiirten ahdistuneisuuskäyttäytymisessä.

Pelkoehdollistumistestin tulokset olivat melko vaikeasti tulkittavissa. Testien mukaan eläimet ehdollistuivat pelkäämään ääntä. Ne yhdistivät pelon myös ympäristöön, ja kontekstiin reagoiminen olikin melko voimakasta. Pelkoehdollistumisen purkaminen vaikutti ensimmäisen päivän jälkeen hyvältä, mutta toisen päivän tuloksista näkyi, että heterotsygoottien hiirten ehdollistumisen purkautuminen olisi hitaampaa. Ryhmien välillä ei kuitenkaan ollut tilastollisesti merkittäviä eroja.

Pelkoehdollistumistestin tulokset oli laskettu automaattisesti tietokoneohjelmalla, mutta hajontaa voisi saada pienemmäksi, jos tulokset laskisi uudelleen manuaalisesti. Tämä tarkoittaisi sitä, että kaikki videomateriaali katsottaisiin läpi ja kirjattaisiin eläinten jäähmettymiset ylös. Pelkoehdollistumistestiin saattoivat vaikuttaa eläimille aiemmin suoritettut kokeet ja stressi. Pelkoehdollistumiskoe olisi hyvä suorittaa omana kokonaisuutena. Mielenkiintoista olisi saada vastaavaan kokeeseen homotsygootteja *Gsr*-hiiriä, jolloin geenimutaatio tulisi oikein esille, esimerkiksi tekemällä ns. indusoiva hiirimalli, jolta puuttuu *Gsr*-geeni ainoastaan aikuisena.

Yhteenvedon voidaan todeta, että tehtyjen käytöskokeiden perusteella ei *Gsr*-geenin suhteen heterotsygoottien ja viilityypin eläinten välillä ole tilastollisesti merkittävää eroa. Myöskään sukupuolten välillä ei ole eroa.

Lähteet

- [1] Hovatta Iiris, Ahdistuneisuuden biologiaa, Suomen Lääkärilehti 36/2011.
- [2] Terveys 2000 -tutkimus, Suomalaisten työ, työkyky ja terveys 2000-luvun alkaessa -raportti, Terveystieteiden tutkimuskeskus 11/2010.
- [3] Donner Jonas, Candidate gene studies in human anxiety disorders, väitöskirja, Helsingin yliopisto 2012.
- [4] Manninen Kaisa, Anxiety-like behavior and protein nitrosylation in a heterozygous glutathione reductase mouse model, Pro gradu tutkielma, Helsingin Yliopisto 2011.
- [5] Wahlsten Douglas, Mouse behavioral testing, Academic Press 2011.
- [6] Crawley Jacqueline N., What's wrong with my mouse?, Wiley-interscience, 2007.
- [7] Powell Russell, Symbaluk Diane & Honey Lynne, Introduction to learning and Behavior, Wadsworth Cengage learning 2009.
- [8] Pitkänen Asla, Tunteiden neurobiologiaa, verkkodokumentti, <http://www.terveysportti.fi/xmedia/duo/duo93721.pdf> , luettu 15.10.2012.
- [9] Hovatta Iiris, Glyoxalase 1 and glutathione reductase 1 regulate anxiety in mice, Nature 2005.
- [10] Donner Jonas, Mouse Genes Guide Search for Human Anxiety Disorder Genes, Biological Psychiatry 2008.
- [11] Psych-brain-trust, verkkosivusto Wikispaces.com, <http://psych-brain-trust.wikispaces.com/Amygdala>, luettu 15.10.2012
- [12] Donner Jonas, julkaisematon tieto.

Valoisa-pimeä laatikko-testin varianssianalyysin tulokset

Aika eri vyöhykkeissä

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Time in zone (s)

Treatment	Zone	Source	Mean Square	F	Sig.
no immobilization	dark zone	genotype	4376,884	5,874	,019
		sex	344,228	,462	,500
		group	1462,867	1,963	,167
	gray zone	genotype	177,378	2,000	,163
		sex	21,561	,243	,624
		group	23,203	,262	,611
	light zone	genotype	2792,032	3,516	,066
		sex	538,091	,678	,414
		group	1854,543	2,335	,132
immobilization	dark zone	genotype	10,022	,007	,933
		sex	553,470	,397	,531
		group	31,688	,023	,881
	gray zone	genotype	117,627	,249	,620
		sex	315,360	,669	,417
		group	452,760	,960	,332
	light zone	genotype	196,318	,239	,627
		sex	1704,395	2,075	,156
		group	724,007	,882	,352

Liikuttu matka

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Distance moved (cm)

Treatment	Zone	Source	Mean Square	F	Sig.
no immobilization	dark zone	genotype	29868,726	0,506	0,48
		sex	3634,078	0,062	0,805
		group	4585,898	0,078	0,782
	gray zone	genotype	34195,902	4,409	0,041
		sex	5457,707	0,704	0,405
		group	7502,728	0,967	0,33
	light zone	genotype	246691,933	3,008	0,089
		sex	22361,933	0,273	0,604
		group	250962,761	3,06	0,086
immobilization	dark zone	genotype	138858,182	1,737	0,193
		sex	10652,469	0,133	0,717
		group	74929,321	0,937	0,337
	gray zone	genotype	8468,779	0,928	0,34
		sex	517,409	0,057	0,813
		group	34110,109	3,739	0,058
	light zone	genotype	63655,825	1,049	0,31
		sex	102280,332	1,686	0,2
		group	91313,349	1,505	0,225

Vyöhykkeelle siirtymisiä

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Zone entries

Treatment	Zone	Source	Mean Square	F	Sig.
no immobilization	dark zone	genotype	34,066	1,003	,321
		sex	15,600	,459	,501
		group	1,217	,036	,851
	gray zone	genotype	207,733	2,655	,109
		sex	4,103	,052	,820
		group	51,948	,664	,419
	light zone	genotype	104,944	3,721	,059
		sex	8,331	,295	,589
		group	62,509	2,216	,142
immobilization	dark zone	genotype	22,665	,435	,512
		sex	4,103	,079	,780
		group	114,931	2,207	,143
	gray zone	genotype	101,771	,948	,335
		sex	6,410	,060	,808
		group	413,741	3,853	,055
	light zone	genotype	51,781	1,929	,171
		sex	4,523	,168	,683
		group	131,985	4,916	,031

Latenssiaika valoisalle puolelle siirtymiseen**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: Latency to enter the light (s)

Treatment	Source	Mean Square	F	Sig.
no immobilization	genotype	825,261	4,540	,038
	sex	87,756	,483	,490
	group	531,532	2,924	,093
immobilization	genotype	485,309	,848	,361
	sex	471,900	,824	,368
	group	496,348	,867	,356

Avokenttätestin varianssianalyysin tulokset

Aika vyöhykkeissä**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: Time in zone (s)

Treatment	Zone	Source	Mean Square	F	Sig.
no immobilization	center	sex	2771,261	4,137	,048
		genotype	137,940	,206	,652
		group	210,436	,314	,578
		genotype * group	921,685	1,376	,247
	walls	sex	2771,261	4,137	,048
		genotype	137,940	,206	,652
		group	210,436	,314	,578
		genotype * group	921,685	1,376	,247
immobilization	center	sex	816,810	1,289	,262
		genotype	629,384	,993	,324
		group	9,034	,014	,905
		genotype * group	487,900	,770	,385
	walls	sex	816,810	1,289	,262
		genotype	629,384	,993	,324
		group	9,034	,014	,905
		genotype * group	487,900	,770	,385

Liikuttu matka

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Distance moved (cm)

Treatment	Zone	Source	Mean Square	F	Sig.
no immobilization	center	sex	67028	,647	,425
		genotype	90315	,872	,355
		group	663	,006	,937
		genotype * group	17291	,167	,685
	walls	sex	108883	,453	,504
		genotype	100677	,419	,520
		group	92208	,384	,538
		genotype * group	1	,000	,998
immobilization	center	sex	256	,002	,963
		genotype	219136	1,902	,174
		group	11449	,099	,754
		genotype * group	7023	,061	,806
	walls	sex	448467	2,373	,130
		genotype	136915	,725	,399
		group	86700	,459	,501
		genotype * group	501792	2,655	,110

Pelkoehdollistumis kokeiden varianssianalyysin tulokset

Pelkoehdollistuminen**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: Time Freezing

Stage of experiment	Source	Mean Square	F	Sig.
baseline	sex	,132	,796	,377
	genotype	,128	,768	,385
	round	,097	,581	,450
	sex * genotype	,098	,589	,447
	sex * round	,246	1,475	,230
	genotype * round	,058	,348	,558
	sex * genotype * round	,000	,002	,963
end	sex	,301	,006	,937
	genotype	3,053	,063	,802
	round	73,201	1,521	,224
	sex * genotype	14,227	,296	,589
	sex * round	36,475	,758	,388
	genotype * round	17,563	,365	,549
	sex * genotype * round	19,171	,398	,531

Ääneen ehdollistuminen**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: Time Freezing

Stage of experiment	Source	Mean Square	F	Sig.
baseline	sex	1,700	,536	,468
	genotype	,284	,090	,766
	round	,207	,065	,799
	sex * genotype	,278	,088	,768
	sex * round	,018	,006	,940
	genotype * round	2,712	,855	,360
	sex * genotype * round	15,275	4,816	,033
end	sex	46,378	,353	,555
	genotype	97,317	,741	,393
	round	105,632	,804	,374
	sex * genotype	106,211	,809	,373
	sex * round	50,862	,387	,537
	genotype * round	162,161	1,235	,272
	sex * genotype * round	138,522	1,055	,309

Kontekstiin ehdollistuminen**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: Time freezing

Stage of experiment	Source	Mean Square	F	Sig.
baseline	sex	,132	,796	,377
	genotype	,128	,768	,385
	round	,097	,581	,450
	sex * genotype	,098	,589	,447
	sex * round	,246	1,475	,230
	genotype * round	,058	,348	,558
	sex * genotype * round	,000	,002	,963
end	sex	200,721	,302	,585
	genotype	83,979	,126	,724
	round	829,528	1,249	,269
	sex * genotype	2853,571	4,297	,043
	sex * round	1391,654	2,096	,154
	genotype * round	46,542	,070	,792
	sex * genotype * round	,044	,000	,994

Pelkoehdollistumisen purkamisen varianssianalyysin tulokset

Pelkoehdollistumisen purkamisen ensimmäinen päivä**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: Time freezing

Stage of experiment	Source	Mean Square	F	Sig.
S0	sex	48,132	1,038	,313
	genotype	120,078	2,589	,114
	round	13,841	,298	,587
	sex * genotype	47,260	1,019	,318
	sex * round	2,399	,052	,821
	genotype * round	63,685	1,373	,247
	sex * genotype * round	13,206	,285	,596
S1	sex	23,265	,063	,803
	genotype	133,685	,360	,551
	round	253,701	,683	,413
	sex * genotype	481,235	1,295	,261
	sex * round	407,482	1,097	,300
	genotype * round	417,782	1,124	,294
	sex * genotype * round	189,096	,509	,479
S2	sex	148,103	1,279	,264
	genotype	109,129	,942	,336
	round	,728	,006	,937
	sex * genotype	16,057	,139	,711
	sex * round	,550	,005	,945
	genotype * round	1,903	,016	,899
	sex * genotype * round	708,208	6,115	,017
S3	sex	74,498	,756	,389
	genotype	85,633	,869	,356
	round	110,317	1,119	,295
	sex * genotype	15,555	,158	,693
	sex * round	6,747	,068	,795
	genotype * round	1,082	,011	,917
	sex * genotype * round	82,024	,832	,366
S4	sex	27,667	,178	,675
	genotype	68,023	,437	,512
	round	223,277	1,433	,237
	sex * genotype	2,470	,016	,900
	sex * round	109,481	,703	,406
	genotype * round	177,545	1,139	,291
	sex * genotype * round	147,253	,945	,336
S5	sex	59,287	,472	,495
	genotype	403,085	3,212	,079
	round	33,483	,267	,608
	sex * genotype	31,956	,255	,616
	sex * round	275,096	2,192	,145
	genotype * round	83,496	,665	,419
	sex * genotype * round	29,131	,232	,632

Pelkoehdollistumisen purkamisen toinen päivä

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Time Freezing

Stage of experiment	Source	Mean Square	F	Sig.
S0	sex	105,022	1,908	,173
	genotype	20,376	,370	,546
	round	74,564	1,354	,250
	sex * genotype	9,728	,177	,676
	sex * round	133,060	2,417	,126
	genotype * round	8,814	,160	,691
	sex * genotype * round	25,498	,463	,499
S1	sex	,004	,000	,997
	genotype	425,740	1,816	,184
	round	1088,436	4,643	,036
	sex * genotype	106,201	,453	,504
	sex * round	1425,866	6,083	,017
	genotype * round	82,777	,353	,555
	sex * genotype * round	225,423	,962	,331
S2	sex	253,185	2,413	,127
	genotype	372,498	3,551	,065
	round	39,694	,378	,541
	sex * genotype	,282	,003	,959
	sex * round	300,743	2,867	,097
	genotype * round	47,095	,449	,506
	sex * genotype * round	595,524	5,677	,021
S3	sex	6,786	,035	,852
	genotype	65,481	,342	,562
	round	33,455	,174	,678
	sex * genotype	42,074	,219	,642
	sex * round	117,967	,615	,437
	genotype * round	211,038	1,101	,299
	sex * genotype * round	,467	,002	,961
S4	sex	22,653	,166	,686
	genotype	418,013	3,058	,087
	round	607,660	4,445	,040
	sex * genotype	3,906	,029	,866
	sex * round	67,062	,491	,487
	genotype * round	7,355	,054	,818
	sex * genotype * round	3,477	,025	,874
S5	sex	32,080	,204	,653
	genotype	1,824	,012	,915
	round	50,226	,320	,574
	sex * genotype	527,426	3,362	,073
	sex * round	177,318	1,130	,293
	genotype * round	34,619	,221	,641
	sex * genotype * round	160,000	1,020	,317