

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Rando Porosk

Wolframi sündroom 1 geeni defektiga hiire metabooli kirjeldus

Magistritöö

Juhendajad Kalle Kilk PhD

Riina Mahlapuu PhD

Prof. Margus Pooga

TARTU 2013

SISUKORD

SISUKORD	2
KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	6
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1 Metaboolika	7
1.1.1 Metaboolikas kasutatavad analüütilised aparaadid	8
1.1.2 Vedelikkromatograaf-tandem-mass-spektromeetria metaboolikas	10
1.1.3 Statistiline analüüs	12
1.2 Wolframi sündroom.....	13
1.2.1 Wolframi sündroom 1 geen ja valk	13
1.2.2 Wolframi sündroom 1 geeni defektiga hiir.....	15
2 EKSPERIMENTAALOSA	18
2.1 Töö eesmärgid.....	18
2.2 Materjalid.....	19
2.2.1 Reagensid ja tarvikud.....	19
2.2.2 Katseloomad	20
2.3 Metoodika	20
2.3.1 Proovide kogumine ja ettevalmistus.....	20
2.3.2 Erinevate kudede suunamata LC-MS analüüs.....	20
2.3.3 Oksüdatiivse stressi markerite kvantitatiivne määramine	22
2.3.3.1 Totaalse ja oksüdeeritud glutatiooni taseme määramine.....	22
2.3.3.2 Glutatiooni reduktaasi ja peroksüdaasi aktiivsuse määramine	23
2.3.4 Aminohapete ja karnitiinide kvantitatiivne määramine.....	24

2.3.5	Puriinide ja pürimidiinide kvantitatiivne määramine	25
2.4	Tulemused ja arutelu.....	26
2.4.1	Erinevate kudede suunamata LC-MS analüüs.....	26
2.4.2	Totaalse valgu kontsentratsiooni määramine	27
2.4.3	Glutatiooni süsteemi iseloomustamine.....	28
2.4.4	Aminohapete ja karnitiinide kvantitatiivne määramine.....	31
2.4.5	Puriinide ja pürimidiinide kvantitatiivne määramine	33
2.4.6	Glükoosi kontsentratsiooni määramine uriinis	34
2.5	Tulevikuplaanid	35
	KOKKUVÕTE	36
	SUMMARY	37
	KIRJANDUSE LOETELU.....	39
	KASUTATUD VEEBIAADRESSID	45
	LISAD	46
	Lisa 1.	46
	Lisa 2	47
	Lisa 3.	47
	Lisa 4	49
	LIHTLITSENTS.....	50

KASUTATUD LÜHENDID

ANOVA – dispersioonanalüüs (*analysis of variance*)

CE-MS – kapillaarelektroforees-mass-spektromeeter (*capillary electrophoresis mass spectrometer*)

CID – neutraalsete gaasimolekulidega kokkupõrgetest põhjustatud fragmenteerimine (*collision-induced dissociation*)

ER – endoplasmaatiline retiikulum

ESI – elektropihustusionisatsioon (*electrospray ionization*)

DI-MS – otsese infusiooni mass-spektromeeter (*direct infusion mass spectrometer*)

DNTB – (5,5-ditio-bis(2-nitrobensoehape)

GC-MS – gaaskromatograaf-mass-spektromeeter (*gas-chromatography mass spectrometer*)

GPx – glutatiooni peroksüdaas

GR – glutatiooni reduktaas

GSH – redutseeritud glutatioon

GSSG – oksüdeeritud glutatioon

GSTNB – redutseeritud glutatiooni ja 5-tio-2-nitrobensoehappe aniooni konjugaat

LC-MS – vedelikkromatograaf-mass-spektromeeter (*liquid chromatography mass spectrometer*)

LC-MS/MS – vedelikkromatograaf-tandem-mass-spektromeeter (*liquid chromatography tandem mass spectrometer*)

LDI-MS – laser desorptsiooni/ionisatsiooni mass-spektromeeter (*laser desorption/ionization mass spectrometer*)

MALDI-TOF-MS – maatriks-assisteeritud laser desorptsiooni/ionisatsiooni lennuaja mass-spektromeeter (*matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometer*)

m/z – massi ja laengu suhe

NMR – tuumamagnetresonants (*nuclear magnetic resonance*)

PCA – peakomponentanalüüs (*principal component analysis*)

SFC-MS – ülekiirilise fluidumi (voolise) kromatograaf mass-spektromeeter (*supercritical fluid chromatography mass spectrometer*)

tGSH – totaalne glutatioon (reduitseeritud + oksüdeeritud glutatioon)

TNB – 5-tio-2-nitrobensoehape

$Wfs1^{-/-}$ – geeni defektiga (*Wfs1 knockout*) hiir

$Wfs1^{+/-}$ – heterosügootne hiir

$Wfs1^{+/+}$ – metsiktüüpi hiir

$Wfs1$ – Wolframi sündroom 1 geen hiirel

$WFS1$ – Wolframi sündroom 1 geen inimesel

WS – Wolframi sündroom

SISSEJUHATUS

Metaboloomika on kiirelt arenev teadusharu, mis koos genoomika ja transkriptoomikaga võimaldab saada paremat ülevaadet organismis toimuvatest protsessidest. Metaboloomika keskendub organismi rakkudes, biovedelikes ja kudedes leiduvate madalmolekulaarsete ühendite ehk metaboliitide identifitseerimisele ja nende kontsentratsioonide kvantifitseerimisele. Antud metoodika abil on võimalik teada saada, milliste metaboliitide osakaal on muutunud võrreldes terve organismiga ja rakendada seda infot haiguste varajaste biomarkerite kindlakstegemiseks, haiguste diagnoosimiseks ning ravi kulu jälgimiseks. Uuritavate ühendite gruppi kuuluvad kõik madalmolekulaarsed struktuursed ehitusüksused, signalisatsioonielemendid ja metabolismi vaheühendid nagu nukleotiidid, aminohapped, suhkrud, vitamiinid, rasvhapped, lipiidid ning samuti ravimid ja nende metaboolsed derivaadid.

Wolframi sündroom on haruldane autosomaalne retsessiivne haigus, mida iseloomustavad juveniilne diabeet, progressiivne neurodegeneratsioon ja endokriinsed kahjustused. Wolframi sündroom on põhjustatud mõlemas alleelis esinevatest mutatsioonidest *WFS1* geenis, mille tõttu geeni produkt, wolframiin, ei oma enam tavapärasest funktsiooni. Mutantse wolframiini puhul kuhjuvad voltumata valgud endoplasmaatilise retiikulumi luumenisse ning põhjustavad homoöstaasi häirumist ja apoptootilise raja käivitumist.

Seni on Wolframi sündroomi uuritud genoomika ja transkriptoomika tasandil, kuid metaboloomilised andmed antud haigusest puuduvad. Käesoleva magistr töö põhieesmärgiks on defektse *Wfs1* geeniga hiire metaboloomi kirjeldamine erinevate metaboliitide ja oksüdatiivse stressi markerite kontsentratsioonide määramisega võrdluses *Wfs1* geeni suhtes heterosügootse ja metsiktüüpi hiirega.

Antud magistr töö esimeses osas antakse ülevaade metaboloomikast ja metaboloomikas kasutatavast aparatuurist, mille käigus keskendutakse põhiliselt vedelikkromatograaf-tandem-mass-spektromeetrialet. Seejärel kirjeldatakse Wolframi sündroomi, selle haigusega seotud geeni ja valku ning samuti antud töös kasutatud Wolframi sündroom 1 geeni defektiga katseloomade konstrueerimist. Järgneb lühiülevaade kasutatud metoodikatest, tuuakse välja põhilised tulemused ja viimastest lähtuv diskussioon. Töö teostati Tartu Ülikooli Arstiteaduskonna biokeemia instituudis prof. Ursel Soometsa töögrupis.

1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Metaboloomika

Metaboloomika on kiirelt arenev teadusharu, mille eesmärgiks on organismi madalmolekulaarsete ühendite kvantifitseerimine ja identifitseerimine. Kogu protsessi käigus saadakse informatsiooni bioloogilise süsteemi metaboloomist. Metaboloom hõlmab endas organismi kõiki struktuurseid ehitusüksusi, signalisatsioonielemente ja metabolismi vaheühendeid nagu näiteks nukleotiidid, aminohapped, suhkrud, vitamiinid, rasvhapped ja lipiidid (Lu jt., 2013; Milne jt., 2013). Võrreldes genoomika, transkriptomika ja proteoomikaga, kus muutused ei ole alati seotud kindla fenotüübiga, kirjeldavad metaboloomikas uuritavad ühendid selgelt bioloogilise süsteemi arengujärku, patoloogiat ja füsioloogiat (Milne jt., 2013). Vastavalt eesmärkidele ja omadustele saab metaboloomilisi uuringuid jagada kolme suuremasse gruppi (Tabel 1).

Tabel 1. Põhiliste metaboloomika analüüsimeetodite eelised ja puudused (Shulaev 2006).

Meetod	Eelised	Puudused
Suunatud analüüs	Kvantitatiivne Madal detekteerimismäär Kõrge läbilaskvus	Metaboliitide arv piiratud Vastavad ühendid peavad olema puhastatud kujul saadaval Ei detekteeri uuringust välja jäänud ühendeid
Suunamata analüüs	Analüüsitakse kõiki metaboliite	Poolkvantitatiivne, keskmine läbilaskvus Enamik metaboliite jääb identifitseerimata Keeruline andmetöötlus
Metaboolse mustri analüüs	Analüüsitakse paljusid metaboliite Suunatud kindlale metaboliitide mustrile Kõrgeim läbilaskvus	Ei võimalda identifitseerimist

Esiteks **suunatud analüüs**, mille eesmärgiks on kindlate, juba teadaolevate, metaboliitide kontsentratsiooni täpne ja kvantitatiivne määramine. Suunatud analüüsi läbiviimiseks peab eelnevalt teada olema uuritava analüüdi struktuur. Lisaks tuleb analüüsiks välja töötada sobilik meetodika ning kalibreerida tulemused puhastatud kujul uuritava ühendi suhtes (Shulaev 2006). Suunatud analüüsi detekteerimismäär sõltub meetodikast ning on enamasti väga madal. Seda tüüpi analüüsi peamiseks miinuseks on kommertsiaalselt kättesaadavate puhaste ühendite piiratud hulk ja suure tõenäosusega jäävad avastamata paljud metaboliidid, mis vastava uuringu seisukohalt võiksid olla olulised (Shulaev 2006; Blekherman jt., 2011).

Suunamata analüüs on teine laialdaselt levinud lähenemine organismi metabolismi kirjeldamisele. Suunamata analüüsi eesmärk on detekteerida võimalikult palju erinevaid metaboliite, luua andmetest organiseeritud mitmedimensionaalne maatriks ning seejärel leida statistilise andmetöötlusega oluliselt muutuvad metaboliidid. Järgnevatiks etappideks on tulemuste valideerimine, statistilise mudeli loomine ning vastavate andmebaaside abil (näiteks <http://www.hmdb.ca>, <http://metlin.scripps.edu/>) metaboliitide identifitseerimine (Putri jt., 2012). Suunamata analüüsi puuduseks on keeruline andmetöötlus, väiksem metaboliitide detekteerimisvõime ning kuna andmebaasid ei ole täiuslikud, siis jäävad suure tõenäosusega paljud metaboliidid kindlaks tegemata (Shulaev 2006; Putri jt., 2012).

Kolmandaks metabolismi uurimise meetodiks on **metaboolse mustri analüüs** (*metabolic fingerprinting* – ingl.k), mille puhul arvestatakse ainult kindla geeni, rakutüübi või koe iseloomulikke metaboliite. Antud meetod võimaldab kõrget metaboliitide detekteerimisvõimet ja haarab suhteliselt suurt hulka metaboliite, kuid ei võimalda ühendite otsest identifitseerimist (Raamsdonk jt., 2001; Ellis jt., 2007).

1.1.1 Metaboloomikas kasutatavad analüütilised aparaadid

Metaboloomika peamiseks eesmärgiks on bioloogiliste süsteemide metaboliitide põhjalik kirjeldamine. Kuna organismi metaboliitide omadused (näiteks molekulaarmass, polaarsus ja lahustuvus) erinevad märgatavalt, siis ei ole hetkel saadaval tehnoloogiat, mis suudaks üheaegselt analüüsida kõiki metaboliite (Rochfort 2005). Praegu on kasutusel mitmed erinevad tehnoloogiad, millest igaljuhul on oma eelised, aga ka puudused. Protsessi lihtsustamiseks vähendatakse mõõdetavate metaboliitide hulka ning kombineeritakse ühel aparatuuril saadud tulemusi teiste instrumentide mõõtmistulemustega (Shulaev 2006; Blekherman jt., 2011; Putri jt., 2012).

Metaboloomikas on kasutusel mitmed erinevad aparaadid. Enamik neist võimaldab analüüsida suurt osa erinevate kudede metaboliitidest (Beckonert jt., 2007; Bictash jt., 2010). Üheks metaboloomikas laialdaselt kasutatavaks meetodiks on tuumamagnetresonants-spektroskoopia (*nuclear magnetic resonance* – ingl.k, NMR), mis detekteerib magnetväljas raadiolainete neeldumise profiili. Neeldumise profiil on spetsiifiline ühele kindlale metaboliidile ja sõltub ühendi struktuurist. NMR on metaboloomikas kasutusel juba üle kümne aasta ning tema abil on analüüsitud erinevaid biovedelikke, rakukultuure ja tahkeid kudesid (Ott ja Aranibar 2007). NMR-i põhiliseks eeliseks on see, et mõõtmiseks ei ole vaja analüüti osadeks lahutada. See tähendab, et proovi on võimalik kasutada ka teiste analüüsides teostamiseks. Lisaks on proovide ettevalmistus NMR-i puhul lihtne ja derivatiseerimist ei ole

vaja. Meetod võimaldab uurida erinevaid komponentide segusid, ilma et metaboliidid häiriks üksteise mõõtmistulemusi (Smolinska jt., 2012). Samas on NMR-i puuduseks tema madal tundlikkus ning tulemi spektri keeruline tõlgendamine. Madalat tundlikkust saab kompenseerida märgistatud ühendite (^{13}C või ^{15}N) kasutamisega, kuid spektri interpreteerimine vajab väljaõppinud spetsialiste (Putri jt., 2012). Hiljuti on Chylla jt. poolt loodud kiire suurima tõepärasuse rekonstrueerimise meetod (*fast maximum likelihood reconstruction* – ingl. k), mis annab parema täpsuse signaali kvantifitseerimiseks spetsialisti vähese vahelekkumisega (Chylla jt., 2011).

Teiseks laialdaselt kasutatavaks meetodikaks on gaaskromatograaf-mass-spektromeetria (*gas-chromatography mass-spectrometry* – ingl. k, GC-MS). Antud meetodi eelisteks on kõrge ühendite detekteerimisvõime ja täpne retentsiooniaeg. Lisaks on olemas mahukad andmebaasid ühendite identifitseerimiseks. GC-MS-ga saab uurida ühendeid, mida on võimalik viia gaasifaasi ning mis ei lagune kuumutamisel. Kui uuritav analüüt ei ole lenduv, siis vajab GC-MS derivatiseerimist (polaarsed vesiniksidet moodustavad grupid muudetakse mittepolaarseteks lenduvamateks gruppideks) (Zhang jt., 2007). Madalmolekulaarsete hüdrofiilsete metaboliitide (suhkrud, orgaanilised happed, aminohapped jt.) jaoks kasutatakse vastavalt kahte derivatiseerimist metüülamiini vesinikkloriidi ja N-metüül-N-(trimetüülsilüül)trifluoroatsetamiidiga (Pongsuwan jt., 2007). Hiljuti välja arendatud kahedimensionaalne GC-MS on võrreldes varasemaga oluliselt parema lahutuvuse ja tundlikkusega (Lee jt., 2001).

Maatriks-assisteeritud laser desorptsiooni/ionisatsiooni mass-spektromeetrias (*matrix-assisted laser desorption/ionization mass-spectrometry* - ingl. k, MALDI-MS) kasutatakse analüüdi ioniseerimiseks erinevaid maatrikseid. Maatriksi funktsiooniks on laseri energia ülekande analüüsitavate ühendite ioniseerimiseks ja nende ühendite kaitsmine lagunemise eest. MALDI-MS eeliseks on tema kasutuslihtsus, lihtne proovi ettevalmistus ja võimalus analüüsida kõrgmolekulaarseid ühendeid nagu näiteks valke (Vaidyanathan jt., 2006). Aparaaadi suurimateks puudusteks on madal lahutuvus (ei kasutata kromatograafiat) ja keemiline müra madalmolekulaarsete ühendite piirkonnas. Müra on põhjustatud peamiselt liigest maatriksist ning seda on võimalik vältida, kasutades laser desorptsiooni/ionisatsiooni mass-spektromeetrit (*laser desorption/ionization mass spectrometry* – ingl. k, LDI-MS), kus maatriksi asemel kasutatakse valguse mõjul lõhustuvaid märgiseid (Maki ja Ishida 2007). Lisaks kasutatakse ka lennuaja (*time-of-flight* – ingl. k, TOF) MALDI-TOF-MS-i, Fourier' teisendusegaioon tsüklotron resonantsi ja MALDI-TOF/TOF-i (Sun jt., 2007; Rosenling jt., 2009).

Metaboloomilistes uuringutes on kasutatud ka mass-spektromeetriga ühendatud kapillaarelektroforeesi (*capillary electrophoresis mass spectrometer* – ingl. k, CE-MS). CE-MS abil on teostatud aminohapete, glükolüüsiraja, pentoosfosfaadiraja, tsitraaditsükli vaheühendite jt. metaboliitide detekteerimist. CE-MS-i puuduseks on keeruline tulemuste korratavus, mis on põhjustatud temperatuuri muutustest elektroosmootsel liikumisel katoodilt anoodile ning andmebaaside limiteeritusest (Soga ja Heiger 2000; Shulaev 2006).

Vähem on metaboloomikas kasutatud ülekriitilise fluidumi (voolise) kromatograaf mass-spektromeetrit (*supercritical fluid chromatography mass-spectrometer* – ingl. k, SFC-MS), kus mobiilse faasina kasutatakse ülekriitilist fluidumi (voolist) ehk ainet, mille rõhk ja temperatuur on tema kriitilise punkti väärtusest kõrgemal. Selle abil on võimalik saavutada GC-MS-st parem analüütide lahutuvus. SFC-MS-i kasutatakse peamiselt lipiidide (sh fosfo-, glüko-, sfingo- ja neutraalsete lipiidide) detekteerimiseks (Bamba jt., 2008). Lisaks eelpool nimetatutele on kasutatud ka otsese infusiooni mass-spektromeetrit (*direct infusion mass-spectrometer* – ingl. k, DI-MS), kus analüüt sisestatakse süstlapumba või nanopihustuskiibi abil otseioonallikasse ning analüüt ei läbi kromatograafilist lahutamist. DI-MS võimaldab kiiremat analüüsi, kuid sagedaseks probleemiks on matrikseffektid ja madal metaboliitide selektiivsus. Metoodika efektiivsust on märkimisväärselt tõstnud isotoop-märgistuse kasutamine (Giavalisco jt., 2008).

Kõige sagedamini kasutatakse metaboloomsete analüüsides läbiviimiseks vedelikkromatograaf (tandem)-mass-spektromeetria (*liquid chromatography (tandem) mass-spectrometry* – ingl. k, LC-MS, LC-MS/MS), mille täpsem kirjeldus, eelised ja puudused ning kasutusvaldkonnad on välja toodud järgmises peatükis.

Vaatamata erinevatele metoodilistele lähenemistele ja uuendustele ei ole veel hetkel välja töötatud universaalset aparati, mis oleks võimeline detekteerima kõiki metaboliite. Seetõttu tuleb aparatuur valida vastavalt metaboloomse katse eesmärkidele ning võtta arvesse meetodi lahutuvust, selektiivsust, tundlikkust, läbilaskevõimet ja aparatuuri hinda.

1.1.2 Vedelikkromatograaf-tandem-mass-spektromeetria metaboloomikas

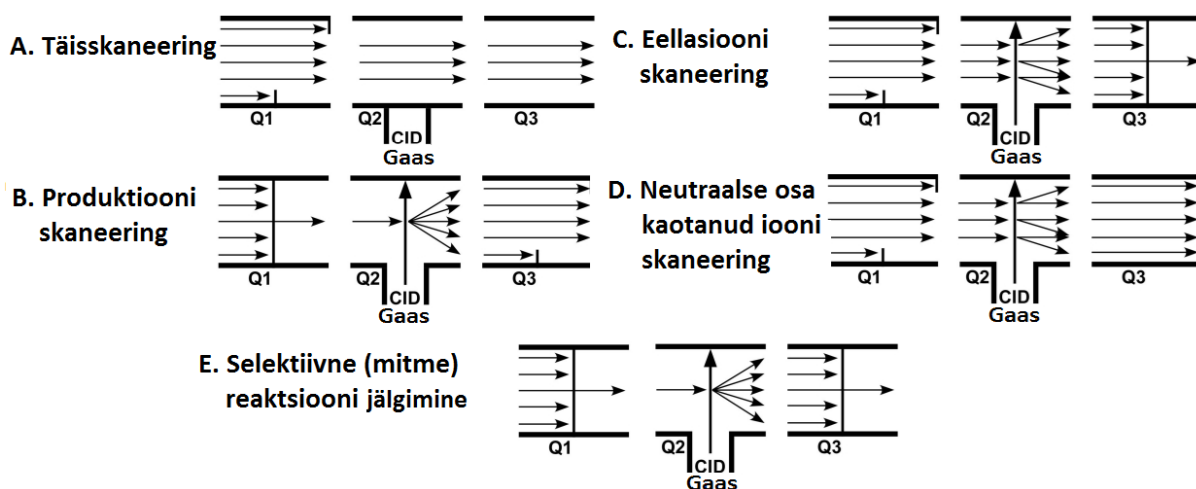
LC-MS/MS koosneb vedelikkromatograafist ja tandem-mass-spektromeetrist. Vedelikkromatograaf võimaldab lahutada erinevaid ühendeid kasutades vastavaid mobiilseid ja statsionaarseid faase. MS koosneb neljast põhikomponendist, milleks on proovi sisestusmehhanism, ionisatsiooniallikas, lennutoru ja detektor. Sisestusmehhanism võimaldab vedeliku aurustamist gaasifaasi ning seejärel aurustunud analüüt ioniseeritakse. Ionisatsiooniallika ülesandeks on anda analüüdile kas positiivne või negatiivne laeng.

Ioniseerimiseks kasutatakse peamiselt kahte erinevat ionisatsiooniallikat: elektropihustus (*electrospray ionization* – ingl. k, ESI) või keemilise ionisatsiooni allikas. Kuna ESI võimaldab ioniseerida peaaegu kõiki ühendeid, kasutatakse seda kõige laialdasemalt (Fenn jt., 1989). Ionisatsiooniallikale järgneb lennutoru, kus tekitatud metaboliitide ioonid vastavalt oma massi ja laengu suhtele (m/z -i) kõrge vaakumi keskkonnas eraldatakse. Lõpuks detektor konstrueerib vastuvõetud ühenditest massispektri. Valides sobivad solvendid ja kolonnid on LC-MS/MS abil võimalik analüüsida kõrg- ja madalmolekulaarseid ning hüdrofiilseid ja hüdrofoobseid metaboliite.

LC-MS-i eelisteks on kõrge tundlikkus, laia spektriga metaboliitide tuvastamine ning enamasti ei vaja uuritavad ühendid derivatiseerimist. Seevastu puudusteks on ioniseerimisel tekkivad matriksefektid, mis põhjustavad ionisatsiooni efektiivsuse langust, ja andmebaaside vähesus (Ikonomou jt., 1990; Shulaev 2006). Matriksefekte põhjustavad analüüsil kaasaeruleeruvad ühendid ning üheks matriksefektide vältimise võimaluseks on uuritavas lahuses stabiilsete isotoop-märgistatud ühendite kasutamine (Ikonomou jt., 1990; Shortreed jt., 2006).

LC-MS/MS-i metaboolmilises uuringus kasutatakse peamiselt viit erinevat analüüsimeetodikat (vt. Joonis 1). Nendeks on täis-, produktiooni-, eellasiooni- ja neutraalse osa kaotanud ionide skaneering ning selektiivne reaktsiooni jälgimine. Suunamata analüüsi puhul kasutatakse täisskaneeringut, kus analüüsi haaratakse kõik m/z väärtused või nende kindel vahemik ning metaboliitide fragmenteerimist ei teostata (Joonis 1A). Statistilise andmetöötlusega leitakse huvipakkuvamad m/z väärtused, mille identifitseerimiseks teostatakse produktiooni skaneering. Skaneeringuks valitakse välja kindel m/z väärtus, mis eeldatavasti vastab otsitavale metaboliidile. Seejärel toimub fragmenteerimine ning tekkinud fragmentide analüüs (Joonis 1B). Fragmentid vastandatakse metaboliitide andmebaasides (nt <http://www.hmdb.ca>, <http://metlin.scripps.edu/>) leiduvatega. Juhul kui fragmenteeritakse kõik metaboliidid, kuid analüüsitakse vaid üht fragmenti, kasutatakse fragmendi päritolumolekuli kindlakstegemiseks eellasiooni skaneeringut (Joonis 1C). See meetod on kliinilistes uuringutes laialdaselt kasutuses näiteks aminohapete ja karnitiinide kontsentratsiooni määramisel (Chace jt., 1997). Võrreldes eelpoolnimetatud analüüsimeetoditega, on harva kasutusel metaboliidi neutraalse osa kaotanud ionide skaneering (Joonis 1D). See võimaldab analüüsi haarata kõikide algsest struktuurist kindla keemilise grupi (näiteks metüülrühma) kaotanud ühendite fragmendid. Kvantitatiivsel suunatud analüüsil kasutatakse kõige enam selektiivset (mitme) reaktsiooni jälgimist, mis võimaldab kiirelt ja täpselt anda infot konkreetse metaboliidi sisalduse kohta proovis. Meetod põhineb kindla m/z väärtusega

metaboliidi selekteerimisel ja fragmenteerimisel ning seejärel analüüsitakse ainult üht selle metaboliidi kindlaksmääratud fragmenti (Joonis 1E).



Joonis 1. Viis põhilist vedelikkromatograaf-tandem-mass-spektromeetrias kasutatavat erineva suunitlusega analüüsi meetodit. Q1 ja Q3 on massifiltrid ning Q2 on fragmentatsioonikamber. CID – neutraalse gaasi molekulidega (nt He, Ar, N) kokkupõrgetest põhjustatud metaboliitide fragmenteerimine (*collision-induced dissociation* – ingl. k) (Grebe ja Singh 2011).

1.1.3 Statistiline analüüs

Metaboloomikas kasutatakse mitmeid erinevaid mitmemõõtmelisi statistilisi meetodeid, mis on olulised suurte andmemahtude korrastamiseks, analüüsiks, vähendamiseks ja visualiseerimiseks. Põhiliselt klassifitseeritakse mitmemõõtmelised meetodid juhindamatuteks ja juhitud algoritmideks (Mendes 2002). Juhindamatud algoritmid ei vaja lisainformatsiooni vaid teostavad analüüsi etteantud andmetest. Nende hulka kuulub näiteks hierarhiline klasteranalüüs ja peakomponentanalüüs (*principal component analysis* – ingl. k, PCA). PCA on kõige enam kasutatav statistiline meetod metaboloomikas, mille eesmärgiks on jaotada suur hulk andmeid väiksemasse mittekorreleeruvasse alajaotusse nii, et nad seletaksid ära suure osa omavahelistest erinevustest.

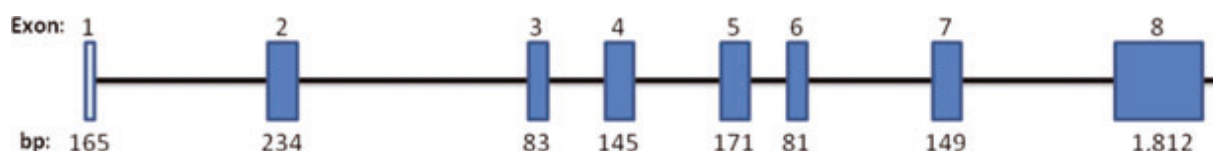
Vastupidiselt juhindamatutele algoritmidele vajavad juhitud algoritmid eelnevalt osalist klassifitseerimist, mis näitaksid ära proovide jaotuse. Siia kuuluvad näiteks vähimruutude meetod ja dispersioonanalüüs (*analysis of variance* – ingl. k, ANOVA). ANOVA eesmärgiks on leida gruppidevahelisi erinevusi nende keskväärtuste põhjal.

1.2 Wolframi sündroom

Wolframi sündroom (WS) on autosomaalne retsessiivse päritavusega haigus, mida põhjustavad bialleelsed mutatsioonid Wolframi sündroom 1 geen (WFS1-s) (Inoue jt., 1998). WS-i esinemissagedus Suurbritannias on ligikaudu 1:770 000 (Barrett jt., 1995) ja Põhja-Ameerikas 1:100 000 (Fraser ja Gunn 1977). Esimesed kirjalikud märked WS-ist pärinevad 1938. aastast, kui dr. D. J. Wolfram ja H. P. Wagener kirjeldasid neljal õel-vennal esinevat juveniilset suhkruhaigust ja nägemisnärvide atroofiat (Wolfram 1938). WS on progressiivne, neurodegeneratiivne haigus, mille esmasteks tunnusteks on lapseas avalduvad suhkruhaigus (~6-aastaselt) ja nägemisnärvide atroofia (~11-aastaselt). Mõni aasta pärast esmaste tunnuste tekkimist kujuneb välja magediabeet ja kurtus. Loetletud patoloogiate alusel nimetatakse WS-i ka DIDMOAD-iks (*Diabetes Insipidus, Diabetes Mellitus, Optic Atrophy, Deafness*) (Barrett ja Bunday 1997). Kahekümnendates eluaastates võivad WS-i haiged jääda pimedaks, kujunevad välja ka kuseteede häired, perifeerne neuropaatia, psühhiaatrilised häired ja meestel võib esineda hüpogonadism (Swift jt., 1998; Medlej jt., 2004). Enamasti surevad WS-i haiged kolmekümnendatel eluaastatel ajutüve atroofiast tingitud hingamiskeskuse kahjustusse (Barrett jt., 1995).

1.2.1 Wolframi sündroom 1 geen ja valk

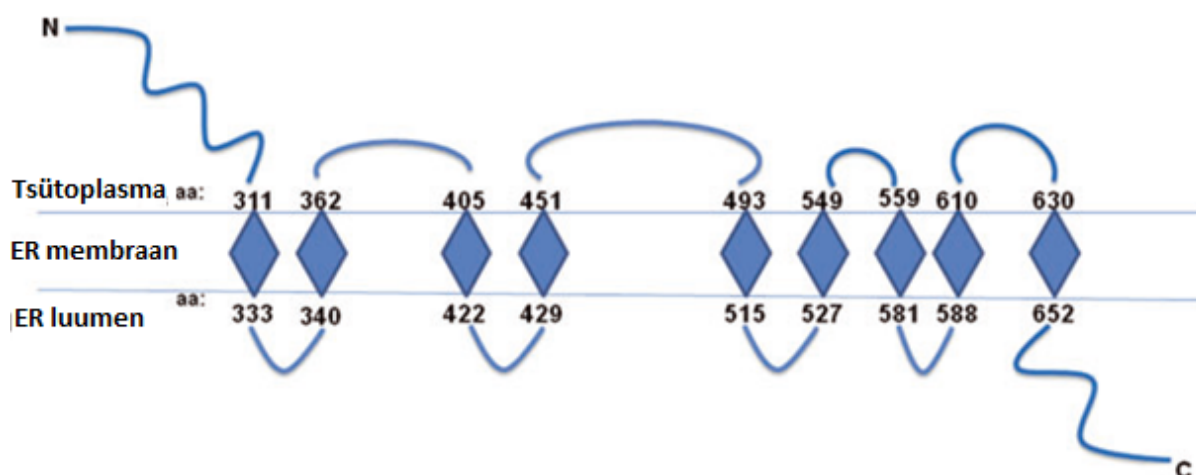
Inoue jt. ja Strom jt. avastasid WFS1 geeni 1998. aastal geneetilise kaardistamise käigus (Inoue jt., 1998; Strom jt., 1998). WFS1 paikneb inimesel 4. kromosoomi p16.1 piirkonnas ning hõlmab endas 33.4 kb suuruse genoomse ala. WFS1 geen koosneb kaheksast eksonist, millest ekson 1 on mitte-kodeeriv, eksonid 2-7 on väikesed ja ekson 8 on suur kodeeriv ala (Joonis 2). Hiire *Wfs1* geen asub 5. kromosoomis ning omab inimese WFS1 geeniga 87% homoloogiat (Strom jt., 1998). Inimese WFS1 geenilt transkribeeritakse 3.6 kb suurune mRNA, mis on kõrgelt ekspresseeritud maksas, pankreases (põhiliselt insuliini tootvates beeta-rakkudes) (Hofmann jt., 2003), südames, ajus, platsentas ja kopsudes. Väiksemal määral on WFS1 ekspresseeritud ka neerudes, skeletilihastes, nahas jm (Inoue jt., 1998; De Falco jt., 2012).



Joonis 2. Kaheksast eksonist koosnev WFS1 geen ja nende pikkused aluspaarides. Esimene ekson on mittekodeeriv, ülejäänud kodeerivad (Rigoli jt., 2011).

Aastate jooksul on *WFS1* geenis avastatud palju mutatsioonisaite, mis on jaotunud ilma märkimisväärse seaduspärasuseta üle kogu kodeeriva ala. Siiski, kõige rohkem on mutatsioone suurimas ehk 8. eksonis. Valdavalt esinevad raaminihke-, stopp-, *missense*- ja splaissingusaidi mutatsioonid, mille tagajärjel kaob *WFS1* kodeeritud valgu funktsioon (Inoue jt., 1998). *WFS1* geeni homosügootsete kandjate sagedus on populatsioonis suhteliselt väike, kuid heterosügootseid kandjaid esineb üldises populatsioonis ligikaudu 1% (Swift jt., 1991). Heterosügootsetel *WFS1* kandjatel on näidatud 26-kordselt suurenenud riski haigestuda psühhiaatrilistesse haigustesse, millest enim esinevad kalduvus enesetapule, depressioon, unetus, vägivaldne käitumine ja õpiraskused (Swift jt., 1990).

WFS1 kodeerib 890 aminohappe pikkust, ligikaudu 100 kDa molekulmassiga polüpeptiidi nimega wolframiin. Wolframiin on hüdrofoobne ja tetrameerne üheksa transmembraanse segmendiga valk, mille otstes on suured hüdrofiilsed regioonid (Joonis 3). Mutatsioonid *WFS1* geenis põhjustavad wolframiini taseme langust (Rigoli jt., 2011).



Joonis 3. Hüpotetiline wolframiini struktuur. Wolframiin omab üheksat transmembraanset segmenti ja hüdrofiilset N- ja C-terminust (Rigoli jt., 2011).

Wolframiin on endoplasmaatilise retiikulumi (ER-i) membraanis asuv glükoproteiin ning seetõttu arvatakse, et wolframiin omab olulist rolli ER-i funktsioneerimisel (Takeda jt., 2001). ER-i põhiülesanneteks on reguleerida kaltsiumi homöostaasi (vajalik rakkudel signalisatsioonis, sekretsioonis ja apoptoosis) ja tagada valkude korrektne kokkupakkimine. Arvatakse, et wolframiini funktsioonid on analoogsed ER-i põhiülesannetele sealhulgas valkude membraanne transport, sekretsioon, protsessing ja/või ER-i kaltsiumi homöostaasi regulatsioon (Hofmann jt., 2003).

Katsed kannuskonna munarakkudel on näidanud, et *WFS1* ekspressioon tõstab katioon-selektiivse ioonkanali aktiivsust ja kaltsiumi sisaldust tsütoplasmas ning selle funktsiooni

häirumine viib rakusisese kaltsiumi homöostaasi häireteni ning lõpuks apoptoosini (Osman jt., 2003). Zatyka jt. näitasid, et wolframiin on oluline ka Na^+/K^+ -ATPaasi beeta 1 subühiku küpsemises ning wolframiini puudusel on oligomeersete valkude subühikute kokkupakkimine häiritud (Zatyka jt., 2008).

Mitmed uuringud wolframiinist ja *WFS1* geenist on seotud veresuhkru taseme kontrollis osalevate pankrease beeta-rakkude ja insuliini sekretsiooniga. On näidatud, et wolframiin võib osaleda proinsuliini (insuliini eellasvalgu) kokkupakkimises insuliiniks (Fonseca jt., 2005). Lisaks on näidatud, et wolframiin seostub kalmoduliiniga (Yurimoto jt., 2009). Kalmoduliin mõjutab omakorda paljusid valke täiustamaks kaltsium-vahendatud signaali ülekannet (Xia ja Storm 2005). Kalmoduliiniga seostumist soodustab glükoos, mis stimuleerib wolframiini translokatsiooni ER-ist Golgi kompleksi ja akumulereerumist plasmamembraanil. Plasmamembraanil moodustub kalmoduliini ja adenüültsüklaas 8 kompleks, mis stimuleerib insuliini biosünteesi ja sekretsiooni (Fonseca jt., 2012). *WFS1* (või *Wfs1*) geeni mutatsioon vähendab oluliselt pankrease beeta-rakkude hulka nii inimesel kui ka hiirel (põhjustatud ER-i stressist). Seetõttu võib arvata, et wolframiin on vajalik insuliini tootvate beeta-rakkude elulemuseks ja korrektseks funktsioneerimiseks (Karasik jt., 1989; Riggs jt., 2005; Yamada jt., 2006).

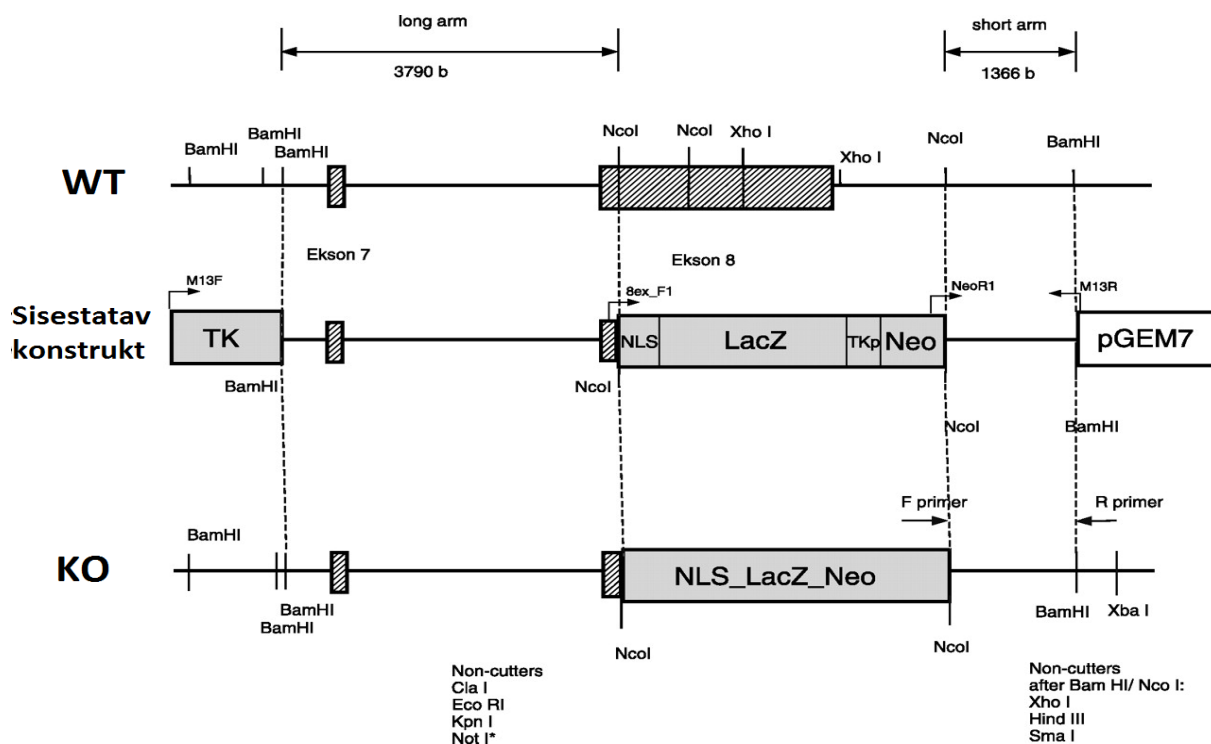
1.2.2 Wolframi sündroom 1 geeni defektiga hiir

Wfs1-defektiga hiiri on konstrueeritud kolmes üksteisest sõltumatus uurimisgrupis. Ishihara jt. konstrueerisid hiiremudeli lisades neomütsiini resistentsusgeeni *Wfs1* teise eksonisse, mille tagajärjel vähenes märgatavalt pankrease beeta-rakkude hulk ning seetõttu ka insuliini sekretsioon (Ishihara jt., 2004). Antud mudeliga on tehtud mitmeid käitumis- ja depressiooni-uuringuid, millega on võimalik kirjeldada WS-iga inimeste psühhiaatrilisi käitumishäireid (Kato jt., 2008).

Riggs jt. poolt Cre/loxP rekombinatsioonisüsteemiga disainitud hiiremudelil esinesid samuti WS-ile iseloomulikud tunnused nagu näiteks 12. nädalaks väljakujunenud glükoosi talumatus ja insuliini defitsiit. Samuti vähenes *Wfs1* defektiga hiirel pankrease beeta-rakkude hulk ning sages ER-i stressi tagajärjel indutseeritud apoptoos (Riggs jt., 2005).

Tartu Ülikooli Arstiteaduskonna füsioloogia instituudis on konstrueeritud *Wfs1* geeni defektiga hiiremudel, kellega on võimalik teostada uuringuid wolframiini valgu puudulikkusest tingitud patoloogiate tuvastamiseks. Antud hiiremudel valmistati kioneerides NLS-LacZ-Neo geenikassett *Wfs1* geeni kaheksandasse eksonisse, mille tagajärjel eemaldati enamik *Wfs1* kodeerivast järjestusest (Joonis 4). Konstrueeritud hiir on homoloogilisel

rekombinatsioonil saadud mutantne F2 põlvkond C57BL/6 ja 129S6/SvEv hiiremudelite segatüübist (Luuk jt., 2008).



Joonis 4. *Wfs1* geeni defektiga hiire konstrueerimise strateegia. Ülemine (WT) – *Wfs1* geen, keskmine – sisestatav NLS-LacZ-Neo geenikassett, alumine (KO) – muteerunud *Wfs1* geen (Noormets jt., 2009).

Katsed antud hiiremudeliga on näidanud wolframiini seotust ärevuse ja hirmu avaldumisega mandelkehas (Luuk jt., 2008; Luuk jt., 2009) ning seotust G-valgu signalisatsiooniraja Rgs4 ja C4b geenidega hüpotaalamuses (Köks jt., 2011). Samuti on näidatud ärevuse tekkimisel seost GABA_A retseptorite subühikute, Gabra1 ja Gabra2, vähenenud ekspressiooni oimusagaras ja ajukoore eesmisest korteksis (Raud jt., 2009). Kõik näitena toodud uuringud nimetavad sarnaseid neuroloogilisi ja psühhiaatrilisi jooni, mis esinevad ka WS-i puhul.

Lisaks neuroloogilistele ja käitumuslikele uuringutele on analüüsitud ka *Wfs1* defektiga hiire reproduktsiooni, kus on näidatud, et *Wfs1* defektiga isased on vähem viljakamad kui metsiktüüpi hiired ning põhjusteks on spermi morfoloogia muutused (vähem proksimaalseid painutatud sabasid ja muteerunud spermi pead) ja vähenenud spermatogeensete rakkude hulk (Noormets jt., 2009). Soolistest erinevustest on välja toodud isaste *Wfs1* geeni defektiga hiirte suurem risk diabeedi kujunemiseks seoses proinsuliini konverteerimisega insuliiniks, mille tagajärjel kujuneb välja insuliini defitsiit (Noormets jt., 2011). Muteerunud hiir on ka märkimisväärselt väiksem kui metsiktüüpi hiir, kuid samas on neil kõrgeenenud kasvuhormooni ja insuliini-sarnase kasvufaktori (IGF-1) tase (Köks jt., 2009), mis on aga

vastuolus inimuuuringus Medlej jt. poolt saadud tulemustega, kus peaaegu pooltel uuritud patsientidest oli vähenenud kasvuhormooni sekretsioon (Medlej jt., 2004).

Metabolismiuuringuid WS-i loommudelitel teostatud ei ole ning erinevate metaboliitide kvantitatiivne analüüs ja varajaste biomarkerite tuvastamine täiustaks märkimisväärselt uuringu perspektiive ning tulemusi oleks võimalik võrrelda genoomika ja transkriptoomika andmetega.

2 EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

Magistritöö peaesmärgiks on kirjeldada Wolframi sündroom 1 geeni (*Wfs1*) defektiga hiire metabooloomi, mille käigus analüüsitakse hiire uriinist, maksa-, südame- ja neerukoest ning rümbaverest (täisverest) erinevate metaboliitide sisaldust ja kõiki tulemusi võrreldakse heterosügootse ja metsiktüüpi hiire vastavate kudedege. Selle täitmiseks püstitati järgnevad alameesmärgid:

- Teostada vedelikkromatograaf-tandem-mass-spektromeetriga suunamata analüüs.
- Identifitseerida süsteemsed biomarkerid, kasutades erinevaid metabooloomika andmebaase.
- Põhjalikumalt iseloomustada identifitseeritud metaboliitide ainevahetusradasid kvantitatiivsete ja ensümaatiliste analüüsidega.
 - Määrata kudedes ja täisveres totaalse ja oksüdeeritud glutatiooni sisaldus.
 - Määrata kudedes ensüümide glutatiooni peroksüdaasi ja reduktaasi aktiivsus.
- Määrata glükoosi kontsentratsioon hiirte uriinis.
- Teostada vedelikkromatograaf-tandem-mass-spektromeetriga suunatud analüüs aminohapete, puriinide, pürimidiinide ja karnitiinide kontsentratsiooni määramiseks.

2.2 Materjalid

2.2.1 Reagendid ja tarvikud

L-karnitiin – Bachem, Šveits

Isotoop-märgistatud aminohapete standard A, isotoop-märgistatud karnitiinide standard B, isotoop-märgistatud 8-¹³C-adeniin, 1,3-¹⁵N₂-oroothape, 1,3-¹⁵N₂-uratsiil, metüül-¹³C-tümidiin – Cambridge Isotope Laboratories Inc., USA

2,4-¹³C₂-¹⁵N₃-tsütosiin – Isotec, USA

Trifluoroäädikhape – Merck, USA

D,L-türosiin, D,L-ornitiini monohüdrokloriid, D,L- α -alaniin, D,L-lüsiini monohüdrokloriid – Reahim, NSVL

L-nor-valiin, L-metioniin, L-glutamiinhape, L-glutamiin, L-asparagiin, L-asparagiinhape, L-seriin, L-arginiin, L-isoleutsiin, L-histidiin, L- β -fenüülalaniin – Reanal, Ungari

HCl/butanool – Riedel-de Haën, Saksamaa

Kloroform – Scharlau, Hispaania

Metanool, atseetonitriil (AcN), sipelghape, kõrge puhtusega vesi, metafosforhape, trans-4-hüdroksü-L-proliin, glütsiin, 2-vinüülpüridiin, trietanoolamiin, veise seerumi albumiin, dinaatriumvesinikfosfaat (Na₂HPO₄), naatriumdivesinikfosfaat (NaH₂PO₄), etüleendiamiin-tetraatsetaat (EDTA), atsetüül-L-karnitiin, heksadekanoüülkarnitiin, uridiin, adeniin, hüpoksantiin, guanosiin, inosiin, 2'-deoksüguanosiini monohüdraat, tsütosiin, tümidiin, 5-(hüdroksümetüül)-uratsiil, 2'-deoksüadenosiini monohüdraat, tümiin, oroothape, ksantiin, adenosiin – Sigma-Aldrich, USA

Valgu kontsentratsiooni määramise testkomplekt – Bio-Rad, USA

Glutatiooni testkomplekt, glutatiooni peroksüdaasi testkomplekt, glutatiooni reduktaasi testkomplekt – Cayman, USA

Luna C18 150 × 3.0 mm kolonn, C18 4 × 2.0 mm eelkolonn – Phenomenex, USA

2.2.2 Katseloomad

Katseloomadeks olid Tartu Ülikooli Arstiteaduskonna füsioloogia instituudis konstrueeritud isased *Wfs1* defektiga (*Wfs1^{-/-}*) (n=28), antud geeni suhtes heterosügootsed (*Wfs1^{+/-}*) (n=28) ja metsiktüüpi (*Wfs1^{+/+}*) (n=20) hiired. Hiiri kasvatati 12-tunnise valguse/pimeduse tsükliga (valgustus kella 7-st kuni 19-ni) standardsetes laboritingimustes, kus oli vaba ligipääs veele ja toidule. Kõik katseloomad olid keskmiselt 2 kuu vanused. Eksperimendid antud töös viidi läbi kooskõlas Euroopa Komisjoni direktiivi (86/609/EEC) ja Eesti loomkatse läbiviimise loakomisjoni loaga (nr. 39, 7. oktoober 2005).

2.3 Metoodika

2.3.1 Proovide kogumine ja ettevalmistus

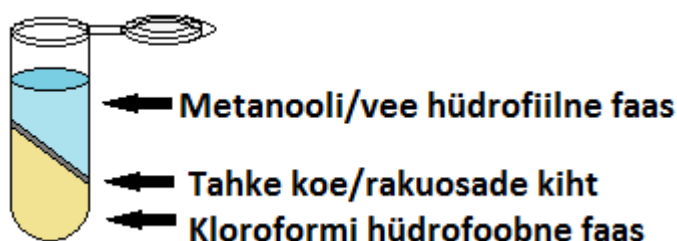
Katseloomad jaotati gruppidesse alljärgnevalt: totaalse glutatiooni (tGSH) ja oksüdeeritud glutatiooni (GSSG) kontsentratsiooni, ensüümide glutatiooni peroksüdaasi (GPx-i) ja glutatiooni reduktaasi (GR-i) aktiivuse määramiseks ning suunamata analüüsi jaoks oli igas grupis vastavalt 4 hiirt *Wfs1* suhtes *Wfs1^{-/-}*, *Wfs1^{+/-}* ja *Wfs1^{+/+}*. Aminohapete, karnitiinide ja puriinide ning pürimidiinide kontsentratsioonide analüüsil uriinist ja kudedest olid vastavate gruppide suurused 24 (*Wfs1^{-/-}*), 24 (*Wfs1^{+/-}*) ja 12 (*Wfs1^{+/+}*) hiirt, v.a täisverest kontsentratsioonide mõõtmisel jaotus igasse gruppi 20 hiirt. Kõigepealt isoleeriti isendid omavahel ja koguti uriiniproovid. Seejärel hiired surmati tservikaalse dislokatsiooni teel. Kõikidelt katseloomadelt võeti rümbavere proov ning eemaldati maks, süda ja neerud. Tahked koed külmutati koheselt vedelas lämmastikus. Rümbaverele lisati 1:1 vahekorras valkude sadestamiseks ja rakkude lõhkumiseks metafosforhapet ning tsentrifugeeriti 4 °C juures 15 minutit $21250 \times g$ (Hettich Zentrifugen, rootor 1689-L) ja eraldati supernatant. Kõik analüüsitavad proovid hoiustati -80 °C juures kuni järgnevate analüüsideni.

Glükoosi ja kreatiniini kontsentratsioonid uriinis määrati koostöös SA Tartu Ülikooli Kliinikumiga ning glükoosi kontsentratsiooni väärtused normaliseeriti kreatiniini kontsentratsioonile vastavas proovis.

2.3.2 Erinevate kudede suunamata LC-MS analüüs

Esiteks teostati suunamata analüüs, mille eesmärgiks oli laia vahemikuga (m/z 50-1500) madalmolekulaarsete metaboliitide taseme võrdlus erineva genotüübiga hiirte gruppide vahel. Proovi ettevalmistus teostati analoogselt Beckonert jt. poolt disainitud meetodile (Beckonert jt., 2007), kus on võimalik tahke koe metaboliidid jaotada hüdrofiilse ja lipofiilse faasi vahel.

Kõigepealt kaaluti tükk külmutatud südamest, maksast ja neerust ning homogeniseerimiseks lisati metanooli 4 ml/g ja vett 0,85 ml/g koe kohta. Seejärel proovid homogeniseeriti kasutades Bandelin Sonopuls ultraheli homogenisaatorit (20 sekundit, 20% amplituudi juures) ning lisati 2 ml/g koe kohta kloroformi ja segati. Protokollis kohaselt lisati veel kloroformi 2 ml/g ja vett 2 ml/g koe kohta, segati, inkubeeriti 15 minutit ning tsentrifuugiti 15 minutit 4 °C juures 1000 × g (Hettich Zentrifugen, rootor 1689-L). Pärast tsentrifuugimist jaotusid faasid tuubis ülemiseks metanooli/vee hüdrofiilseks faasiks ja alumiseks kloroformi hüdrofoobseks faasiks, mille vahele jäi tahke koe/rakuosade kiht (Joonis 5). Täisvere ja uriiniproovide suunamata analüüsiks antud protokollis ei kasutatud, vaid uuriti ainult hüdrofiilset faasi ja selleks lisati eelnevalt ettevalmistatud faaside proovidele 70%-list metanooli ja vee segu. Seejärel proovid tsentrifuugiti 4 °C juures 15 minutit 21250 × g (Hettich Zentrifugen, rootor 1689-L) ja analüüsiks eraldati supernatant. Kõik protseduurid teostati jääl. Nii hüdrofiilse kui ka hüdrofoobse faasi uurimiseks kasutati Shimadzu Prominence LC20AD HPLC-d ühendatuna tandem-mass-spektromeetriga Q-TRAP 3200 (Applied Biosystems, USA). Mõlemaid faase analüüsiti nii positiivse kui ka negatiivse ionisatsiooni režiimis. Proovid sisestati aparati ja koostati vastav meetod, mille parameetrid on toodud lisa (Lisa 1, Tabel 1).



Joonis 5. Hüdrofiilse metanooli/vee ja hüdrofoobse kloroformi faasi jaotumine tuubis pärast tsentrifuugimist.

Mass-spektromeetrist saadud massi ja laengu suhte intensiivsuste väärtusi kõigepealt grupeeriti (*binning* – ingl. k) selliselt, et ühe daltoni piiresse jäävad m/z väärtused keskmistati. Tulemusi analüüsiti vabavaralise statistilise programmiga R 2.15.2. Teostati peakomponentanalüüs, mis võimaldab grupeerida suurimate muutujate (komponentide) alusel erineva genotüübiga *Wfs1* hiiri. Gruppide vahelist varieeruvust vaadeldi korraga kõikide analüüsimeetoditega nii, et iga grupp sisaldas 4 hiirt (v.a uriin) ning nende negatiivse ja positiivse ionisatsiooni režiimiga hüdrofiilset ja hüdrofoobset faasi (kokku 5100 m/z väärtust vahemikus 50-1500 Da). Sellele järgnevalt, leidmaks millised metaboliidid erinevad antud gruppide vahel kõige enam, teostati programmiga R dispersioonanalüüs (*one-way analysis of variance*).

Leitud metaboliitide m/z väärtuste tuvastamiseks viidi läbi nende fragmenteerimine kindlatel parameetritel ning tulemusi võrreldi andmebaasides leiduvate metaboliitidega (<http://www.hmdb.ca>, <http://metlin.scripps.edu/>).

2.3.3 Oksüdatiivse stressi markerite kvantitatiivne määramine

2.3.3.1 Totaalse ja oksüdeeritud glutatiooni taseme määramine

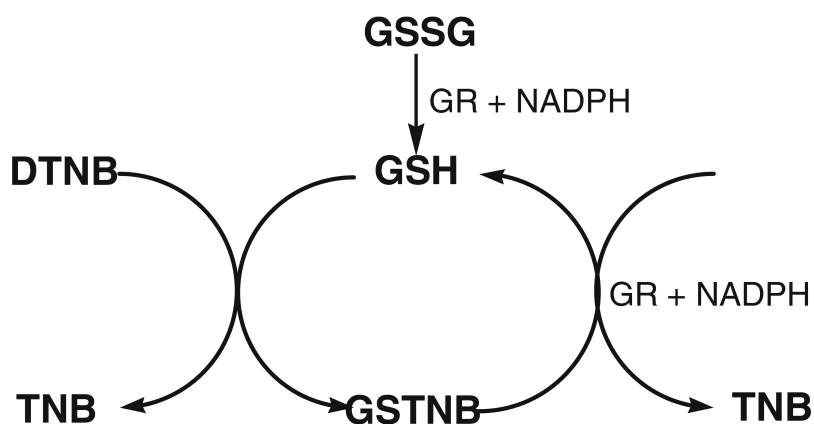
Esmalt valmistati ette tahketest kudedest homogenaat 0,1 M fosfaatpuhvris (1:10 v/v, pH 7,4) kasutades Eurostar IKA mikserit. Seejärel homogenaadid tsentrifugeeriti 15 minutit 4 °C juures 10000 × g (Hettich Zentrifugen, rootor 1689-L) ja eraldati supernatant. Supernatant jaotati vastavalt valgu, tGSH kontsentratsiooni ning ensüümide GR-i ja GPx-i aktiivsuse määramise jaoks. Totaalse glutatiooni taseme määramiseks sadestati valgud 10%-lise metafosforhappega (1:1 v/v), tsentrifugeeriti pärast 5 minutist inkubatsiooni 5 minutit 4 °C juures 5000 × g (Hettich Zentrifugen, rootor 1689-L) ning eraldati supernatant. Kõik analüüsitavad proovid säilitati -80 °C juures.

Kõigepealt mõõdeti valgu kontsentratsioon südame, maksa ja neerude homogenaatide proovides kasutades kolorimeetrilist Bio-Radi valgu testi, mis põhineb Lowry meetodil (Lowry 1951). Kommertsiaalse testi eelised seisnevad eelkõige kiires värvimuutuses ja kõrges stabiilsuses.

Lowry meetodil valgu kontsentratsiooni määramiseks lahjendati kudede homogenaate 25 korda. Standardlahusena kasutati 2 mg/ml veise seerumi albumiini. Lahuste optiline tihedus mõõdeti lainepikkusel 700 nm Sunrise ELISA plaadilugejaga.

GSSG ja tGSH sisaldust erinevates kudedes mõõdeti samuti spektrofotomeetriliselt, kasutades Sunrise ELISA plaadilugejat. Totaalse glutatiooni taseme määramise meetod põhineb glutatiooni (GSH) sulfhüdruülrühma reageerimisel DTNB-ga [(5,5-ditio-bis(2-nitrobensoehappega)], mille käigus tekib nende ühendite redutseeritud konjugaat (GSTNB) ja kollase värvusega 5-tio-2-nitrobensoehape (TNB). Järgnevalt toimub tekkinud konjugaadi redutseerimine ensüümi GR-i poolt ning saadusteks on uuesti GSH ja TNB. Reaktsiooni käigus mõõdetakse 405 nm juures neelduva TNB moodustumise taset, mis on otseselt proportsionaalne mõõtmise alguses oleva GSH hulgaga (vt. Joonis 6). GSSG taseme mõõtmiseks tuleb GSH eemaldada reaktsioonist GSTNB konjugaadiga kasutades 2-vinüülpüridiini. GSSG ja tGSH sisalduse määramiseks proovis konstrueeriti standardgraafikud, kasutades andmetöötlusprogrammi GraphPad Prism 5. Tulemused

normaliseeriti eelnevalt mõõdetud valgu kontsentratsioonile vastavates proovides ning statistiliseks analüüsiks kasutati Studenti t-testi. GSH kontsentratsiooni määramiseks lahutati GSSG kontsentratsioon tGSH kontsentratsioonist.

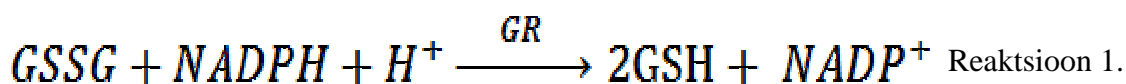


Joonis 6. Skemaatiline joonis totaalse glutatiooni (GSH+GSSG) kontsentratsiooni määramisest, kus mõõdetakse 5-tio-2-nitrobensoehappe (TNB) aniooni tekkimise taset (Tietze 1969). GR – glutatiooni reduktaas, GSSG – oksüdeeritud glutatioon, GSH – redutseeritud glutatioon, DTNB - 5,5-ditio-bis(2-nitrobensoehape), GSTNB – DNTB ja GSH konjugaat.

2.3.3.2 Glutatiooni reduktaasi ja peroksüdaasi aktiivsuse määramine

Glutatiooni reduktaas on ensüüm, mis katalüüsib NADPH-st sõltuvalt GSSG redutseerimist tagasi GSH-ks (vt. Reaktsioon 1). See ensüüm on vajalik GSH kontsentratsiooni normaalses koguses hoidmiseks, mis on omakorda oluline GSH/GSSG suhte säilimisel (Carlberg ja Mannervik 1985).

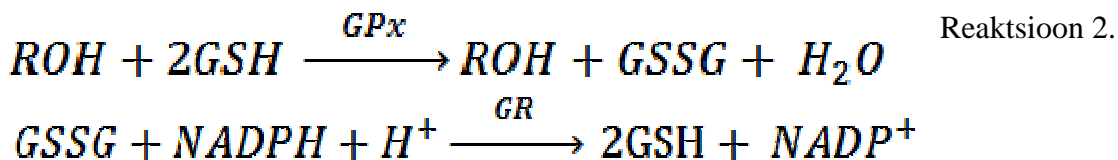
GR-i aktiivsuse määramise testkomplekt mõõdab NADPH oksüdeerumist $NADP^+$ -ks (vt. Reaktsioon 1), mille neeldumise langus ajas on otseselt proportsionaalne GR-i aktiivsusega analüüsitavas proovis.



Glutatiooni peroksüdaas (GPx) on tetrameerne ensüüm, mis katalüüsib vesinikperoksiidide redutseerimist, et kaitsta rakke oksüdatiivse stressi eest. GPx-i iga subühik sisaldab aktiivtsentris seleenotsüsteiini, mis osaleb otseselt peroksiidide redutseerimises. Seleenotsüsteiini redutseeritud vormi taastamiseks kasutatakse elektroni doonorina GSH-d (Ursini jt., 1985).

GPx-i aktiivsuse määramise testkomplekt mõõdab GPx-i aktiivsust kaudselt, sest reaktsioon toimub üle GR-i. Kui GPx redutseerib vesinikperoksiide, siis tekib GSSG, mis omakorda

taastatakse GSH-ks läbi GR-i ja NADPH. Põhimõtteliselt mõõdetakse sarnaselt GR-i aktiivsuse määramise testkomplektile ka siin NADPH oksüdeerumist NADP⁺-ks (vt. Reaktsioon 2), mille neeldumise langus ajas on otseselt proportsionaalne GPx-i aktiivsusega analüüsitavas proovis.

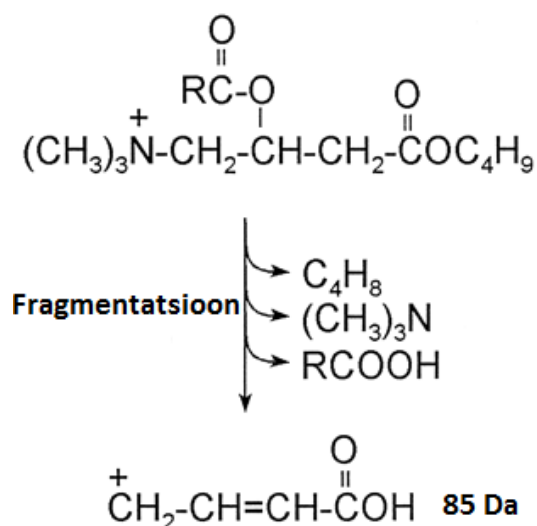


GR-i ja GPx-i spektrofotomeetriline analüüs teostati 340 nm juures 3,5 minuti jooksul 30 sekundiliste mõõtmisvahemikega kasutades Sunrise ELISA plaadilugejat. Aktiivsuse määramiseks konstrueeriti standardgraafikud kasutades andmetöötlusprogrammi GraphPad Prism 5. Tulemused normaliseeriti eelnevalt mõõdetud valgu kontsentratsioonile vastavates proovides.

2.3.4 Aminohapete ja karnitiinide kvantitatiivne määramine

Kvantitatiivseks aminohapete ja karnitiinide kontsentratsiooni määramiseks kasutati Matern jt. poolt välja töötatud LC-MS/MS metoodikat, kus kasutatakse analüütide happe-katalüüsitud butanooliga derivatiseerimist butüülestriteks (Smith ja Matern 2010). Esmalt koostati analüüsitavatest aminohapetest ja karnitiinidest standardgraafikud (3,33 - 1000 µM), kasutades puhastatud kommertsiaalseid aminohappeid ja karnitiine ning isotoop-märgistatud sisestandardeid.

Analüüsiks lisati 10 µl vastava koe homogenaadile 50 µl isotoop-märgistatud aminohapete ja karnitiinide segalahust metanoolis (50 × lahjendatud) ning inkubeeriti toatemperatuuril 15 minutit. Seejärel proovid tsentrifuugiti 15 minutit 22 °C juures 21250 × g (Hettich Zentrifugen, rootor 1689-L) ja supernatant kuivatati lämmastiku joa all. Kuivatatud proovile lisati derivatiseerimiseks 60 µl 3 M HCl/butanooli lahust ja inkubeeriti 65 °C juures 15 minutit. Proovid kuivatati uuesti lämmastiku joa all, lisati 50 µl atseetonitriili (AcN)/vee/sipelghappe lahust (vastavalt 50:50:0,0025) ja analüüsiti tandem-mass-spektromeetriga QTRAP 3200. Tekkinud aminohapete ja karnitiinide butüülestrite kontsentratsiooni määramiseks kasutati positiivse ionisatsiooni režiimiga eellasioonide skaneeringut, mis võimaldab tuvastada fragmenteerimisel tekkinud 85 Da fragmentide põhjal kindlaid aminohappeid ja karnitiine (vt Joonis 7). Meetodi parameetrid on toodud lisas (Lisa 1, Tabel 2).



Joonis 7. Skemaatiline näide 85 Da fragmendi tekkimisest. Eellasiooni skaneeringul analüüsitakse ainult neid ühendeid, mis tekitavad positiivselt laetud 85 Da fragmendi (Chace jt., 1997).

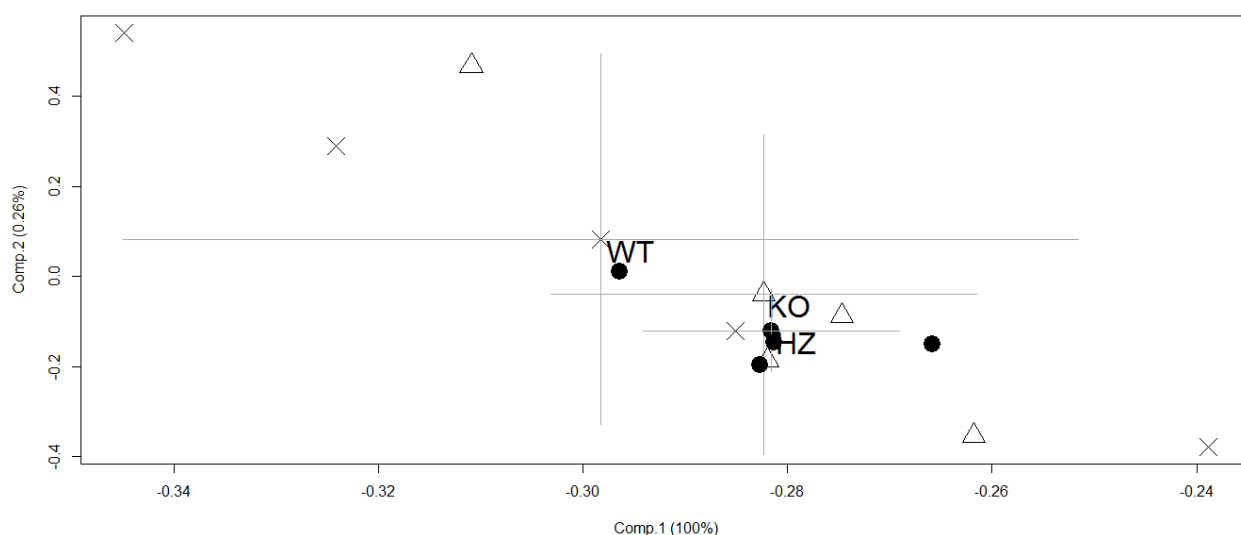
2.3.5 Puriinide ja pürimidiinide kvantitatiivne määramine

Puriinide ja pürimidiinide kontsentratsiooni määramiseks kasutati la Marca jt. poolt disainitud LC-MS/MS meetodit, mis võimaldab tuvastada ja kvantifitseerida ligikaudu 30 erinevat puriini ja pürimidiini (la Marca jt., 2006). Erinevatest kommertsiaalsetest puhastatud puriinidest ja pürimidiinidest koostati standardgraafikud (1-1000 μM) ning kvantifitseerimiseks kasutati vastavaid sisestandardeid (vt. reagentid ja tarvikud). Katse teostamiseks lisati 40 μl analüüsivale koele/biovedelikule 20 μl sisestandardite (50 \times lahjendatud) vesilahust, tsentrifuugiti 4 $^\circ\text{C}$ juures 15 \times minutit 21250 \times g (Hettich Zentrifugen, rootor 1689-L) ja supernatanti analüüsiti LC-MS/MS-iga, mille meetoodika parameetrid on toodud lisa (Lisa 1, Tabel 3). Maksa, neerude ja südame puriinide ja pürimidiinide kontsentratsioonid normaliseeriti valgu kontsentratsioonile.

2.4 Tulemused ja arutelu

2.4.1 Erinevate kudede suunamata LC-MS analüüs

Vedelikkromatograaf-tandem-mass-spektromeetriga teostatud suunamata analüüsil eristusid *Wfs1* hiiregrupid mitmetes kudedes. Maksa proovide alusel eristusid *Wfs1*^{+/+} hiirte parameetrid *Wfs1*^{-/-} ja *Wfs1*^{+/-} katseloomadest (Joonis 8). Sellest on võimalik järeldada, et *Wfs1*^{-/-} ja *Wfs1*^{+/-} hiirte maksa metabooloomid on omavahel sarnased, kuid erinevad *Wfs1*^{+/+} hiirest. Antud tulemuste põhjusteks võib olla see, et kui WS-iga inimestel esineb krooniline suhkrutõbi, siis kujunevad patsiendil välja mitmed erinevad maksahaigused (Ferrannini jt., 1990; Levinthal ja Tavill 1999). Kuna *WFS1* heterosügootsetel inimestel esineb samuti sagedasti suhkrutõbi (Swift ja Swift 2000), siis on saadud tulemused vastavuses kirjanduses leiduvate andmetega.



Joonis 8. Maksa metaboliitide suunamata analüüsi peakomponentanalüüs. Iga sümbol vastab erineva analüüsitud hiire metabooloomi jaotusele vastavast *Wfs1* genotüübist. Esitatud on ka gruppide keskmised ja standardvead (lisasümbol), iga genotüübi korral n=4. Δ -*Wfs1*^{-/-}(KO); ●- *Wfs1*^{+/-}(HZ); ×- *Wfs1*^{+/+}(WT).

Südame metabooloomi PCA analüüsil eristusid teistest *Wfs1*^{-/-} hiired ning omavahel olid sarnasemad *Wfs1*^{+/+} ja *Wfs1*^{+/-} hiired (vt Lisa 3, Joonis 2A). Eristumine näitab, et *Wfs1*^{-/-} hiire südame metabooloom erineb *Wfs1*^{+/-} ja *Wfs1*^{+/+} genotüüpidega hiirte metabooloomist. Diabeediga inimestel ja katseloomadel on kirjeldatud diabeetilist kardiomiopaatiat, millega kaasnevad mitmed südame kahjustused, halvenenud kaltsiumi transport ja adeniini metabolismi häired (Fein ja Sonnenblick 1994). Vastavalt saadud tulemustele ei esine *Wfs1*^{+/-} hiirtel võrreldes *Wfs1*^{-/-} hiirtega südames suuremaid muutuseid.

Neerudes ja täisveres oli lahknemine kõikide gruppide vahel. Suurim eristumine oli neerudes *Wfs1*^{+/+} ning *Wfs1*^{+/-} gruppide ja täisveres *Wfs1*^{+/+} ja *Wfs1*^{-/-} hiirte vahel (vt Lisa 3, Joonis 2B

ja 2C). Tulemuste põhjal võib öelda, et muutused $WfsI^{-/-}$ ja $WfsI^{+/-}$ neerude ja täisvere metabooloomis erinevad nii omavahel kui ka $WfsI^{+/+}$ hiirest. Uriini metabooloomi suunamata analüüsil eristus $WfsI^{+/-}$ teistest gruppidest ning $WfsI^{-/-}$ ja $WfsI^{+/+}$ olid sarnased (vt Lisa 3, Joonis 1).

Järgnevalt keskenduti gruppidevahelisi lahkemisi põhjustavate metaboliitide tuvastamisel biomarkerite leidmisele, mis muutuvad erineva $WfsI$ genotüübiga hiirtel mitmes koes üheaegselt. Dispersioonanalüüsil tuvastati 8 võimalikku süsteemset markerit, mis põhjustavad erinevusi rohkemas kui ühes koes (vt Tabel 2). Nende hulgas identifitseeriti positiivse ionisatsiooni režiimiga hüdofiilses faasis metaboliit m/z väärtusega 308, mis vastab GSH-le. M/z väärtuse 308 fragmenteerimisel tekkinud 3 põhilist fragmenti (m/z 76, 162, 179) vastavad täpselt andmebaasis leiduvale GSH fragmentspektrile (<http://metlin.scripps.edu/>). GSH identifitseerimise järel määrati kudedes ja täisveres tGSH ja GSSG kontsentratsioon ning ensüümide GR-i ja GPx-i aktiivsus. Võimalik, et teistest tuvastatud markeritest m/z väärtus 105 vastab glütseraadile ja m/z 348 adenosiinmonofosfaadile (AMP-ile), kuid antud järeldused vajavad lisauuringuid.

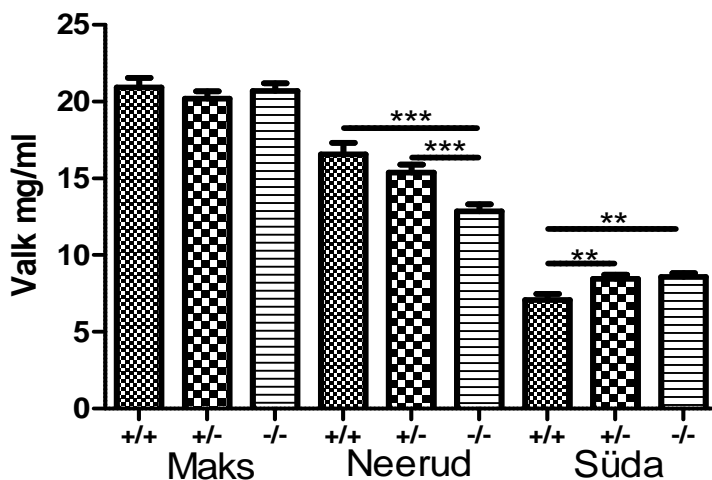
Tabel 2. Dispersioonanalüüsil tuvastatud süsteemsed markerid, mis eristusid mitmes koes üheaegselt. $P < 0,05$

m/z väärtus	Analüüsimeetod
105	Hüdofiilne faas, negatiivne ioniseerimine
211	Hüdrofoobne faas, negatiivne ioniseerimine
308	Hüdofiilne faas, positiivne ioniseerimine
348	Hüdofiilne faas, positiivne ioniseerimine
420	Hüdofiilne faas, negatiivne ioniseerimine
482	Hüdofiilne faas, negatiivne ioniseerimine
618	Hüdofiilne faas, negatiivne ioniseerimine
693	Hüdofiilne faas, negatiivne ioniseerimine

2.4.2 Totaalse valgu kontsentratsiooni määramine

Tahketes kudedes määrati kogu valgu kontsentratsioon, võimaldamaks mõõdetud metaboliitide taseme normaliseerimist valgu kontsentratsiooni alusel. Valgu kontsentratsioon on täpsemini mõõdetav ja normaliseerimiseks usaldusväärsem kui koe kaal. Samas selgus, et südames ja neerudes on valgu kontsentratsioon koe kaalu suhtes statistiliselt oluliselt erinev $WfsI^{+/+}$ ja $WfsI^{-/-}$ hiirtel (Joonis 9). Valgu kontsentratsioon oli neerudes $WfsI^{-/-}$ hiirtel madalam ning südames $WfsI^{-/-}$ ja $WfsI^{+/-}$ hiirtel kõrgem. $WfsI$ defektsus põhjustab ER stressi ja valkude kokkupakkimise häireid ning ei saa välistada, et totaalse valgu kontsentratsiooni

põhjal normaliseerimine ei vii süstemaatilise veani. Seetõttu analüüsid, kus sõltuvalt normaliseerimise aluseks võetud parameetrist ilmnevad erinevad tendentsid, on lisaks valgu kontsentratsioonile normaliseeritud tulemustele toodud ka koe kaalule normaliseeritud tulemused.



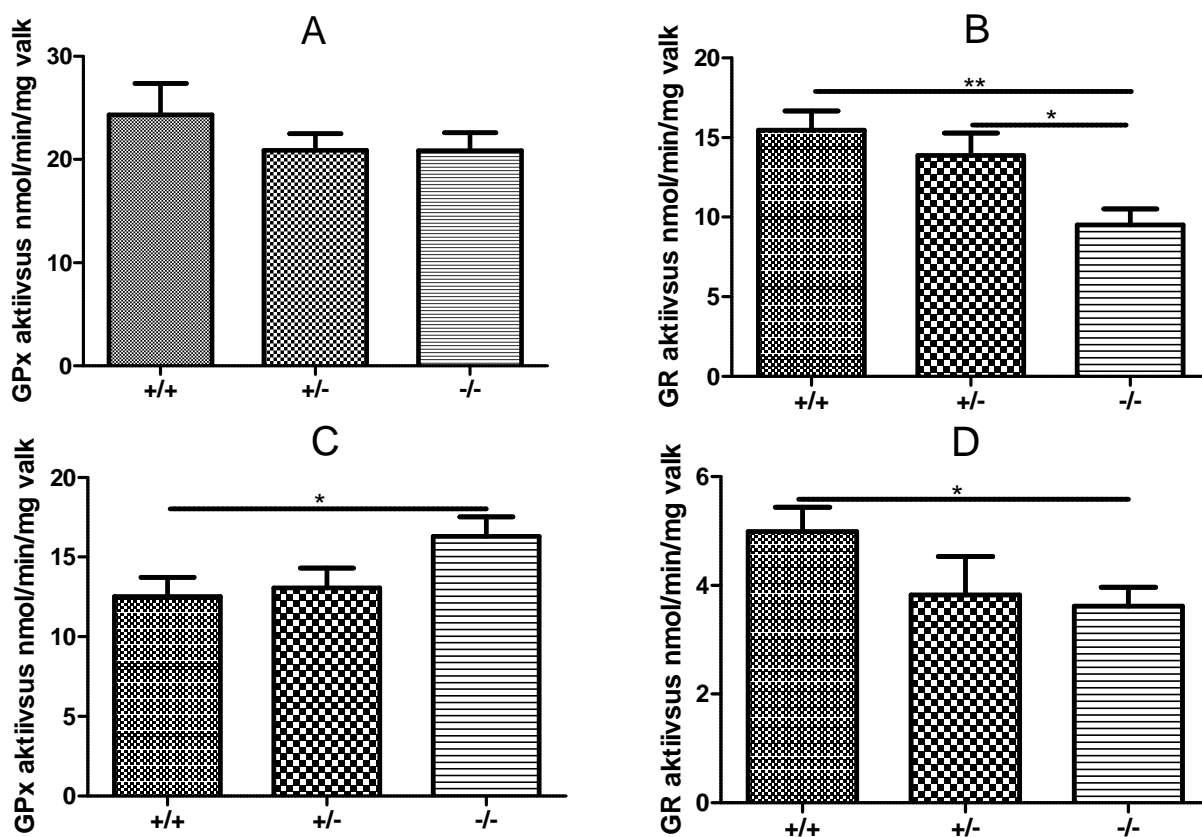
Joonis 9. Valku kontsentratsioon erinevates kudedes *Wfs1* metsiktüüpi (+/+), heterosügootse (+/-) ja geeni defektiga (-/-) hiirtel, n=12-24. ** p<0,01, *** p<0,001

2.4.3 Glutatiooni süsteemi iseloomustamine

Maksast, südamest, neerudest ja täisverest mõõdetud tGSH ning GSSG tase ja ensüümide GR-i ja GPx-i aktiivsus varieerusid erinevate kudede vahel märgatavalt, kuigi maksas ja südames olid erinevused tGSH, GSSG, GSH kontsentratsioonides ja GSSG/GSH väärtuses sarnased (vt Tabel 3). *Wfs1*^{-/-} hiirte GSSG tase maksas oli võrreldes *Wfs1*^{+/+} ja *Wfs1*^{+/-} hiirtega kõrgem. *Wfs1*^{-/-} hiirte GSSG kõrgem tase viib ka GSSG/GSH kõrgema suhteni ning võib viidata suuremale oksüdatiivsele stressile (vt Tabel 3). *Wfs1*^{-/-} hiirtel suurenenud GSSG hulgaga on kooskõlas GR-i madalam aktiivsus maksas (Joonis 10B). GSSG kõrgem tase ning GR-i madalam aktiivsus näitavad, et GSSG-d ei redutseerita tagasi GSH-ks piisaval hulgal ning GSSG tase püsib kõrge. Maksas GPx-i aktiivsuses genotüüpide vahel statistiliselt olulisi erinevusi ei esinenud. Südames oli *Wfs1*^{-/-} hiirte GR-i aktiivsus samuti madalam kui *Wfs1*^{+/-} ja *Wfs1*^{+/+} hiirtel (Joonis 10D), kuid see ei tõstnud GSSG kontsentratsiooni (vt Tabel 3). GPx-i kõrgem aktiivsus *Wfs1*^{-/-} hiirtel näitab, et vesinikperoksiidide redutseerimine toimub aktiivsemalt kui *Wfs1*^{+/-} ja *Wfs1*^{+/+} hiirtel (Joonis 10C).

Tabel 3. Totaalse glutatiooni (tGSH), oksüdeeritud glutatiooni (GSSG) ja redutseeritud glutatiooni (GSH) kontsentratsioon ja glutatiooni redokssuhe (GSSG/GSH) erineva *Wfs1* genotüübiga hiirte maksas ja südames, iga genotüübi korral n=4. * *Wfs1*^{-/-} vs *Wfs1*^{+/+}, p<0,05

	+/+	+/-	-/-
MAKS			
tGSH (nmol/mg valk)	53.00 ± 4.68	69.85 ± 9.88	53.76 ± 5.89
GSSG (nmol/mg valk)	3.89 ± 0.16	3.73 ± 1.04	5.39 ± 0.56*
GSH (nmol/mg valk)	49.12 ± 4.75	66.12 ± 9.43	48.37 ± 6.44
GSSG/GSH	0.08 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.13 ± 0.04
SÜDA			
tGSH (nmol/mg valk)	14.07 ± 1.21	18.76 ± 1.84	14.79 ± 1.87
GSSG (nmol/mg valk)	0.83 ± 0.06	0.88 ± 0.23	0.90 ± 0.17
GSH (nmol/mg valk)	13.23 ± 1.18	17.88 ± 1.74	13.90 ± 1.70
GSSG/GSH	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.01

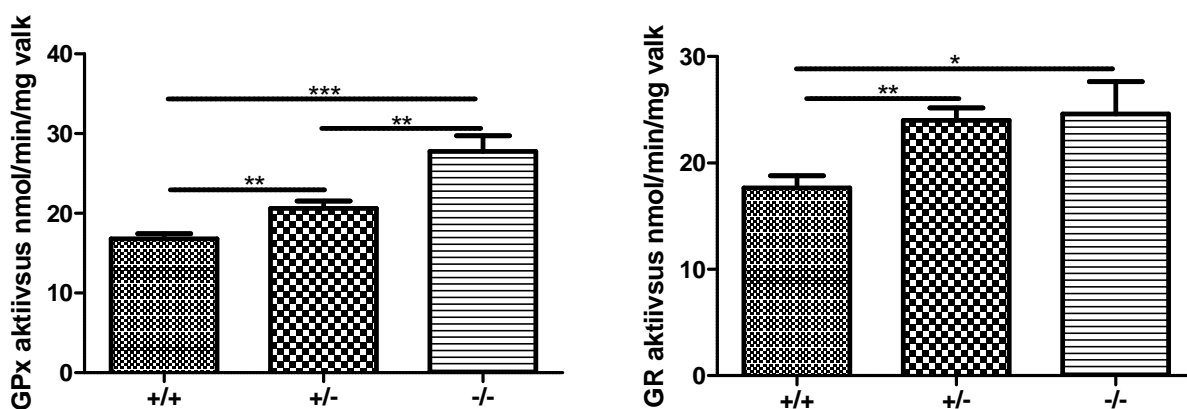


Joonis 10. Glutatiooni peroksüdaasi (GPx-i) ja glutatiooni reduktaasi (GR-i) aktiivsus maksas (vastavalt A ja B) ja südames (vastavalt C ja D) *Wfs1* metsiktüüpi (+/+), heterosügootse (+/-) ja geeni defektiga (-/-) hiirtel, iga genotüübi korral n=4. * p<0,05

Neerudes ja täisveres erinesid *WfsI*^{-/-}, *WfsI*^{+/-} ja *WfsI*^{+/+} hiired omavahel eelkõige tGSH kontsentratsiooni poolest (Tabel 4). Neerudes oli tGSH tase *WfsI*^{-/-} hiirtel madalam kui *WfsI*^{+/+} ja *WfsI*^{+/-} hiirtel, kuid täisveres oli *WfsI*^{-/-} hiirtel tGSH-d rohkem kui *WfsI*^{+/+} hiirtel, sest nende GSH kontsentratsioon oli kõrgem. Neerudes oli GSSG tase alla kasutatud testkomplekti määramispiiri ning seetõttu ei olnud võimalik neerude GSSG kontsentratsiooni mõõta ega GSH taset ja GSSG/GSH redokssuhet arvutada. Vastupidiselt maksale oli neerude GR-i ja GPx-i aktiivsus *WfsI*^{-/-} ja *WfsI*^{+/-} hiires kõrgem kui *WfsI*^{+/+} hiires, mis näitab, et üldiselt on *WfsI*^{-/-} hiirte neerudes oksüdatiivne stress suurem, kuid tänu GR-i kõrgele aktiivsusele toimub GSSG redutseerimine tagasi GSH-ks (Joonis 11).

Tabel 4. Totaalse glutatiooni (tGSH), oksüdeeritud glutatiooni (GSSG) ja redutseeritud glutatiooni (GSH) kontsentratsioon ja glutatiooni redokssuhe (GSSG/GSH) erineva *WfsI* genotüübiga hiirte neerudes ja rümbaveres, iga genotüübi korral n=4. * *WfsI*^{-/-} vs *WfsI*^{+/+} p<0,05; † *WfsI*^{-/-} vs *WfsI*^{+/-} p<0,05

	+/+	+/-	-/-
NEERUD			
tGSH (nmol/mg valk)	1.32 ± 0.25	1.08 ± 0.11	0.71 ± 0.06 *†
RÜMBAVERI (TÄISVERI)			
tGSH (nmol/mg valk)	763.31 ± 81.32	1207.27 ± 45.30	1264.02 ± 147.02 *†
GSSG (nmol/mg valk)	92.25 ± 15.61	109.11 ± 8.48	127.60 ± 11.30
GSH (nmol/mg valk)	671.06 ± 69.50	1098.16 ± 44.39	1136.41 ± 142.78 *†
GSSG/GSH	0.14 ± 0.02	0.09 ± 0.008	0.12 ± 0.01



Joonis 11. Glutatiooni peroksüdaasi (GPx-i) ja glutatiooni reduktaasi (GR-i) aktiivsus neerudes *WfsI* metsiktüüpi (+/+), heterosügootse (+/-) ja geeni defektiga (-/-) hiirtel, iga genotüübi korral n=4. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001

2.4.4 Aminohapete ja karnitiinide kvantitatiivne määramine

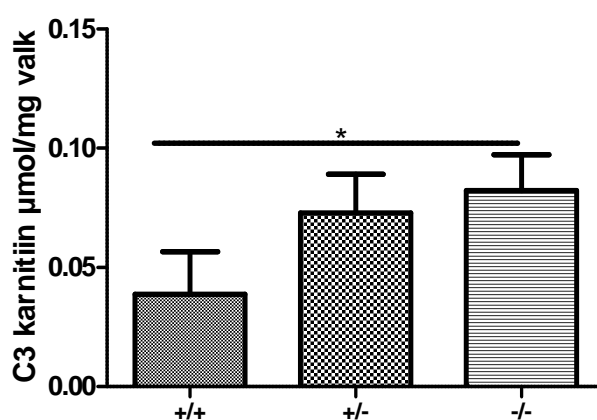
Aminohapete kontsentratsioon (mmol/mg valgu kohta) $WfsI^{-/-}$ hiirtel võrrelduna $WfsI^{+/+}$ hiirtega muutus erinevates kudedes ja biovedelikes alljärgnevalt (Tabel 5). Maksas, südames ja täisveres oli enamike aminohapete tase 1,2 kuni 2,9 korda madalam. Erandiks oli arginiini tase maksas, mis oli 1,9 korda kõrgem. Vastupidiselt teistele kudedele aga neerudes statistiliselt oluliselt muutunud aminohapete tase oli 1,1 kuni 1,4 korda kõrgem. Uriinis oli aminohapete tasemes mõlemasuunalisi erinevusi, kuid enamik neist esinesid $WfsI^{+/+}$ hiirtel, mis on kooskõlas ka uriini suunamata analüüsi tulemustega (Lisa 3, Joonis 1).

Kui arvestada aminohapete kontsentratsiooni koe kaalu kohta, siis südames olid muutused väiksemad kui tabelis 5 ning neerudes oli analoogselt teiste kudedega aminohapete tase $WfsI^{-/-}$ hiirtel madalam kui $WfsI^{+/+}$ hiirtel (vt Lisa 4, Tabel 1). See tähendab, et koe massi kohta on $WfsI^{-/-}$ hiirtel aminohapete kontsentratsioon sõltumata koest madalam. Vabade aminohapete ja valgu suhe on kudedes erinev, mis viitab eri kudede erinevale ER stressi taluvusele või ER stressi eri ulatusele nendes kudedes.

Tabel 5. Aminohapete kontsentratsioonide erinevused $WfsI^{-/-}$ hiirel võrrelduna $WfsI^{+/+}$ hiirega, n=12-24. *Samasuunaline muutus ka $WfsI^{+/-}$ vs $WfsI^{+/+}$; ↑/↓' muutus ainult $WfsI^{+/-}$ vs $WfsI^{+/+}$; p<0,05. Tühi lahter – statistiliselt olulist muutust ei esinenud.

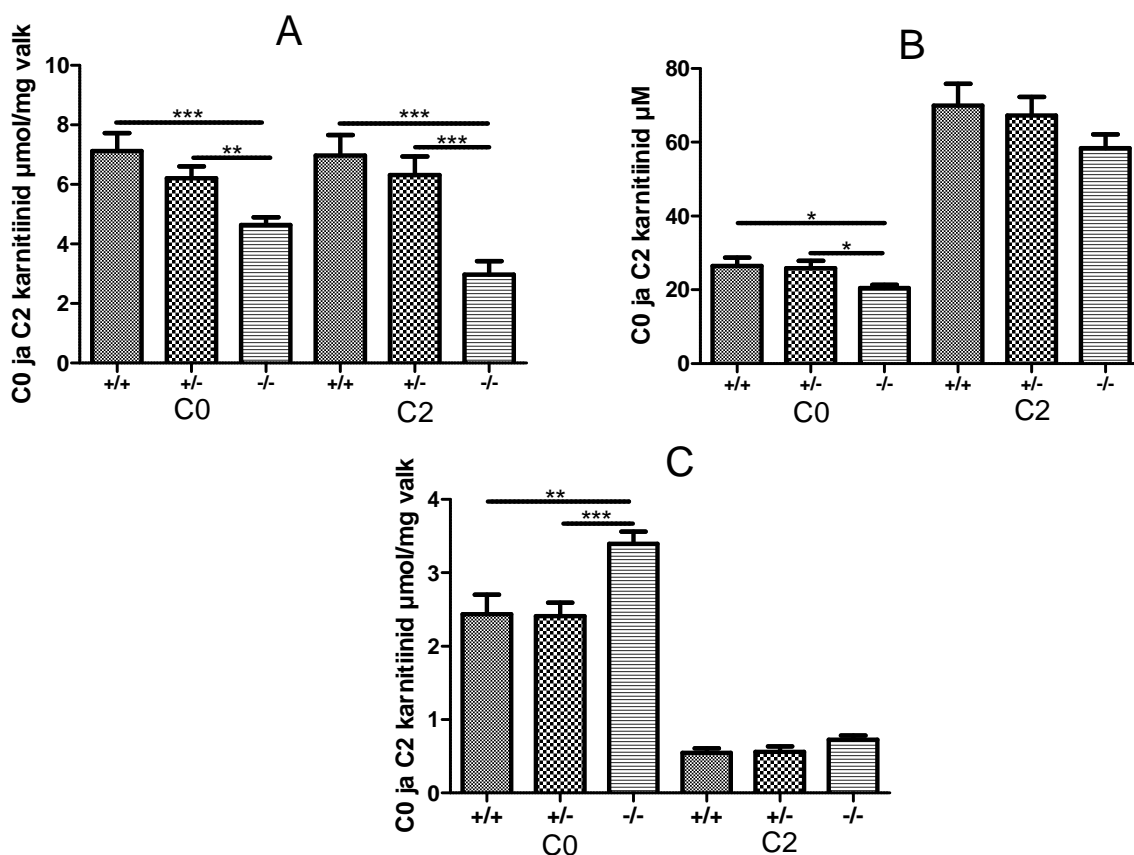
Aminohape	Maks	Süda	Neerud	Täisveri	Uriin
Alaniin	↓*	↓*	↑		
Arginiin	↑		↑	↓	
Asparagiin	↓*				
Asparagiinhape		↓		↓	
Glutamiin	↓*	↓			
Glutamiinhape		↓		↓	
Glütsiin	↓*	↓		↓*	
Histidiin		↓	↑	↓*	↑'
Leutsiin	↓*	↓*	↑*	↓	
Lüsiin			↑		
Metioniin	↓*	↓			
Hüdroksüproliin	↓*	↓*		↓	
Ornitiin	↓*		↑		↑*
Fenüülalaniin	↓*	↓	↑		↓'
Seriin	↓*				
Türosiin	↓*	↓			↓'
Valiin	↓*	↓		↓	

Karnitiinidest oli võimalik määrata ainult vaba karnitiini (C0), atsetüül- (C2), propionüül- (C3) ja butüüülkarnitiini (C4) kontsentratsiooni. Isovalerüül- (C5) kuni stearoüülkarnitiinide (C18) estrite kontsentratsioon jäi alla detekteerimismäära (nM), mis on rasvhapete beeta-oksüdatsiooni ja karnitiinide radade normaalse funktsioneerimise korral ootuspärane tulemus. Mõõdetud karnitiinide kontsentratsiooni muutuste suund erinevates kudedes *Wfs1*^{-/-} hiirtel varieerus võrreldes *Wfs1*^{+/+} hiirtega. Maksas C0 ja C2 kontsentratsioonides erinevate genotüüpide vahel olulisi erinevusi ei olnud (vt Lisa 2, Joonis 1A), kuid C3 ja C4 tase oli märgatavalt kõrgem *Wfs1*^{-/-} ja *Wfs1*^{+/-} hiirtel (vt Joonis 12 ja Lisa 2, Joonis 1B). Kirjanduses leidub diabeediga rottidel tehtud katsetest erinevaid tulemusi, kus C0 ja C2 tase võrreldes kontrollgrupiga ei muutu (Akisu jt., 2002) või langeb (Xia jt., 2011).



Joonis 12. Propionüülkarnitiini (C3) kontsentratsioon *Wfs1* metsiktüüpi (+/+), heterosügootse (+/-) ja geeni defektiga (-/-) hiirte maksas, iga genotüübi korral n=5-10, *p<0,05.

Südames ja täisveres on C0 ja C2 kontsentratsioon oluliselt madalam *Wfs1*^{-/-} hiirtel võrrelduna *Wfs1*^{+/-} ja *Wfs1*^{+/+} hiirtega, kuid neerudes on C0 taseme erinevus vastupidine (vt Joonis 13). C0 madalamat taset südames on varem näidatud diabeediga rottidel (Akisu jt., 2002) ning inimestel on täheldatud plasmas ja seerumis C0 ja C2 kontsentratsiooni langust tüüp 1 ja tüüp 2 diabeedi puhul (Mihalik jt., 2012; Bene jt., 2013). Nii nagu maksas, on ka neerudes ja südames C3 tase *Wfs1*^{-/-} hiirtel kõrgem võrreldes *Wfs1*^{+/+} hiirtega (vt Lisa 2, Joonis 1C ja 1D). Uriinis olulisi erinevusi karnitiinide tasemes ei olnud.



Joonis 13. Vaba karnitiini (C0) ja atsetüülkarnitiini (C2) kontsentratsioon *Wfs1* metsiktüüpi (+/+), heterosügootse (+/-) ja geeni defektiga (-/-) hiirte südames (A), täisveres (B) ja neerudes (C), n=11-22, *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001.

2.4.5 Puriinide ja pürimidiinide kvantitatiivne määramine

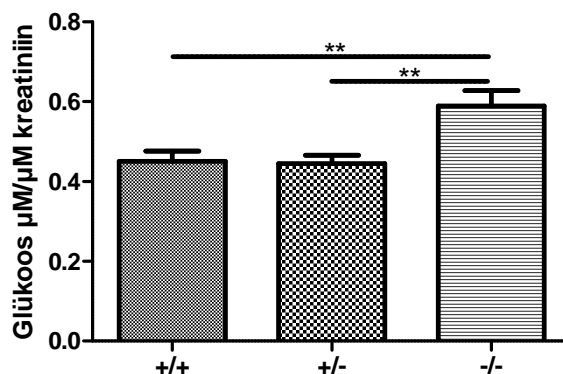
Kõikide analüüsitavaate puriinide ja pürimidiinide kontsentratsiooni ei saanud määrata, sest osades kudedes jäi vastavate ainete kontsentratsioon alla detekteerimismäära (Tabel 6). Maksas, neerudes ja täisveres enamiku statistiliselt oluliselt erinenud puriinide ja pürimidiinide kontsentratsioon (normaliseeritud valgu kontsentratsioonile) on *Wfs1*^{-/-} hiirtel võrrelduna *Wfs1*^{+/+} liigikaaslastega 1,3 kuni 5,2 korda kõrgem, välja arvatud dihidrotümiini tase, mis on 1,8 korda madalam. Südames enamike puriinide ja pürimidiinide tase oli 2 kuni 4 korda madalam (v.a ksantiini tase oli 1,5 korda kõrgem). Uriinis oli puriinide ja pürimidiinide taseme varieeruvus suurem ning nende erinevus jäi vahemikku 1,2 kuni 2 korda. Näiteks adensiini puhul on näidatud, et diabeediga rottidel on adensiini fosforüleerimine AMP-ks häiritud (adensiini kinaasi madal ekspressioon) ning seetõttu adensiini, inosiini ja hüpoksantiini kontsentratsioon on kõrgem (Pawelczyk jt., 2002). Koe kaalu kohta normaliseeritud tulemused ei erinenud oluliselt valgu kontsentratsioonile normaliseeritud tulemustest. Erandina oli *Wfs1*^{-/-} hiirte adensiini tase kõrgem südames ning inosiini ja tümiini tase neerudes oluliselt ei erinenud *Wfs1*^{+/+} hiirtega võrreldes.

Tabel 6. Puriinide ja pürimidiinide kontsentratsioonide erinevused *WfsI*^{-/-} võrreldes *WfsI*^{+/+} hiirega, n=6-23. *Samasuunaline erinevus ka *WfsI*^{+/-} vs *WfsI*^{+/+}, ↑/↓ erinevus ainult *WfsI*^{+/-} vs *WfsI*^{+/+}, p<0,05. Tühi lahter – alla detekteerimismäära; -- statistiliselt olulist erinevust ei tuvastatud.

Puriin/ Pürimidiin	Maks	Süda	Neerud	Täisveri	Uriin
Adeniin	↑	—	↑	—	—
Adenosiin		↓	↑	—	↑
Deoksüadenosiin					↓
S-adenosüülmetioniin					↑
Guaniin					—
Guanosiin				—	—
Deoksüguanosiin					
Inosiin	↑*	—	↑	—	↓
Deoksüinosiin	—				
Hüpoksantiin	↑	↓*	—	↑	—
Ksantiin		↑		↑	—
Kusihape					
Tümiin		↓*	↑	↑	↓
Tümidiin		—	↑*	—	↓
Dihüdrotümiin	↑	↓*	↓	↑*	—
Tsütosiin					
Tsütidiin					
Uratsiil	—	↓*	↑*	—	↑
Dihüdrouratsiil					
Uridiin		↓*		—	
Deoksüuridiin				—	↑
Pseudouridiin					
Tsütidiin		↓*		↑	
Oroothape					↓*

2.4.6 Glükoosi kontsentratsiooni määramine uriinis

Glükoosi kontsentratsioon uriinis on *WfsI*^{-/-} hiirtel võrreldes *WfsI*^{+/-} ja *WfsI*^{+/+} hiirtega märgatavalt kõrgem (Joonis 14). Selles töös kasutatud hiiremudeliga on sarnaseid tulemusi näidatud ka varem (Terasmaa jt., 2011), kuid siis kasutati 6 kuu vanuseid hiiri, mistõttu oli *WfsI*^{-/-} hiirtel glükoosi taseme erinevus võrreldes *WfsI*^{+/+} hiirtega selgemalt eristunud.



Joonis 14. Glükoosi kontsentratsioon *WfsI* metsiktüüpi (+/+), heterosügootse (+/-) ja geeni defektiga (-/-) hiirtel, n=16-18, **p<0,01.

2.5 Tulevikuplaanid

Antud magistritöö kuulub suuremasse projekti, kus on plaanis teostada Wolframi sündroom 1 geeni (*Wfs1*) defektiga hiire metabooloomi kirjeldusele lisauuringuid ning analüüsida alljärgnevat aspekte:

- Teostada orgaaniliste hapete analüüs erinevate genotüüpidega hiirte kudedest ja biovedelikest eesmärgiga uurida muutusi tsitraaditsükli vaheühendite kontsentratsioonides.
- Analüüsida hiire vanusest ja haiguse progressist sõltuvaid muutusi erinevate kudede metabolismis, eesmärgiga leida WS-i ja diabeedi varajasi biomarkereid.
- Analüüsida erinevate antioksüdantide (N-atsetüültsüsteiini jt.), TÜ Arstiteaduskonna biokeemia instituudis disainitud ja sünteesitud antioksüdantsete peptiidide (UPF1, UPF6, UPF17, UPF19) ning ka uute glutatiooni analoogide (näiteks UPF peptiidid seleenotsüsteiiniga, rakku ja mitokondrisse penetreeruvad analoogid jne) mõju nii *Wfs1* geeni puudulikkusega kui ka metsiktüüpi hiirte metabolismile. Lisaks selgitada välja antioksüdantse süsteemi protekteeriv.
- Uurida kõrge suhkrusisaldusega dieedi mõju *Wfs1* geeni defektiga hiire ning metsiktüüpi hiire metabooloomile, eesmärgiga täpsustada WS-i erinevusi tüüp 2 diabeedist.

KOKKUVÕTE

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli kirjeldada Wolframi sündroom 1 (*Wfs1*) geeni defektiga (*Wfs1^{-/-}*) hiire metabooloomi. Töö käigus analüüsiti erinevate metaboliitide sisaldust hiire maksa-, südame ja neerukoos, uriinis ning rümbaveres (täisveres). Kõiki saadud tulemusi võrreldi antud geeni suhtes heterosügootse (*Wfs1^{+/-}*) ja metsiktüüpi (*Wfs1^{+/+}*) hiirega.

Esmalt teostati kõikidest kudedest vedelikkromatograaf-tandem-mass-spektromeetriga suunamata analüüs. Analüüsil lahkesid *Wfs1^{-/-}*, *Wfs1^{+/-}* ja *Wfs1^{+/+}* hiirte parameetrid erinevalt. Maksas eristusid *Wfs1^{+/+}*, südames *Wfs1^{-/-}* ja uriinis *Wfs1^{+/-}* hiired teistest *Wfs1* genotüüpidest. Neerudes ja täisveres eraldusid üksteisest kõik grupid. Järgneval dispersioonanalüüsil leiti 8 süsteemset biomarkerit, mis eristusid mitmes koes üheaegselt. Kasutades erinevaid metabooloomika andmebaase ja fragmentatsioonanalüüsi, identifitseeriti massi ja laengu suhte väärtus 308, mis vastab redutseeritud glutatioonile (GSH-le). Teiste massi ja laengu suhte väärtuste identifitseerimine vajab lisauuringuid.

Lähtuvalt glutatiooni tuvastamisest, mõõdeti kudedes totaalse glutatiooni (tGSH) ja oksüdeeritud glutatiooni (GSSG) tase ning ensüümide glutatiooni peroksüdaasi (GPx-i) ja glutatiooni reduktaasi (GR-i) aktiivsust. *Wfs1^{-/-}* hiirte maksas oli GSSG tase kõrgem ning GR-i aktiivsus madalam. Südames oli *Wfs1^{-/-}* hiirtel kõrgem GPx-i ja madalam GR-i aktiivsus. Neerukoos oli tGSH tase märgatavalt madalam ja nii GPx-i kui ka GR-i aktiivsus kõrgem. Täisveres oli tGSH tase kõrgem GSH taseme suurenemise arvelt. Lisaks oli *Wfs1^{-/-}* hiirtel ka glükoosi sisaldus uriinis kõrgem.

Lisaks analüüsiti mitmete aminohapete, karnitiinide, puriinide ja pürimidiinide sisaldust. Maksas, südames ja täisveres oli madalam enamiku mõõdetud aminohapete tase, neerudes aga vastupidiselt aminohapete tase kõrgem (sõltus normaliseerimisest) ning uriinis oli mõlemasuunalisi erinevusi. Karnitiinidest olid suurimad erinevused vaba karnitiini (C0), atsetüül- (C2), propionüül- (C3) ja butüüülkarnitiinide (C4) kontsentratsioonides. *Wfs1^{-/-}* hiirtel oli maksas kõrgem C3 ja C4 tase, südames ja täisveres madalam C0 ja C2 tase ning neerudes kõrgem C0 ja C3 tase. Mõõdetavate puriinide ja pürimidiinide tase maksas, neerudes ja täisveres oli kõrgem ning südames madalam. Uriinis olid erinevused mõlemasuunalised.

Antud magistritöö näitab, et *Wfs1^{-/-}* hiirtel esineb metabooloomis võrreldes *Wfs1^{+/+}* hiirtega mitmeid erinevusi, mis viitavad nii kõrgele oksüdatiivsele stressile kui erinevate ainevahetusradade häirumisele.

Metabolic profiling of Wolfram syndrome 1 gene deficient mouse

Rando Porosk

SUMMARY

Metabolomics is a powerful tool to assess the metabolite levels in different biofluids and tissues by untargeted and targeted analysis. Wolfram syndrome (also known as DIDMOAD) is a rare autosomal recessive neurodegenerative disease which causes diabetes, optic atrophy, deafness and other complications. Wolfram syndrome is caused by mutations in Wolfram syndrome 1 gene (*Wfs1*).

The aim of the present study was to analyse different metabolite concentrations of *Wfs1* deficient mice (*Wfs1*^{-/-}) (generated in the University of Tartu) and compare to heterozygous (*Wfs1*^{+/-}) and wild-type mice (*Wfs1*^{+/+}). To begin with, untargeted metabolomics of mice urine, trunk blood and liver, kidney and heart homogenates were analysed by liquid-chromatography tandem mass-spectrometry (LC-MS/MS). Principal component analysis showed significant separation of different *Wfs1* genotypes in almost every tissue or biofluid. Eight significant metabolites were discovered using one-way analysis of variance and identified by fragmentation of the metabolites. One of the discovered metabolite, mass-to-charge ratio 308 in positive ionization, was identified as reduced glutathione.

Total (tGSH) and oxidized glutathione (GSSG) level and glutathione peroxidase (GPx) and reductase (GR) activity were analysed by using commercially available assay kits. There were higher GSSG level and lower GR activity in liver, higher GPx and lower GR activity in heart, lower tGSH level and higher enzymes level in kidneys and higher tGSH level in trunk blood of *Wfs1*^{-/-} mice.

Finally, different amino acid, carnitine, purine and pyrimidine levels were measured using targeted analysis of LC-MS/MS. Certain amino acids concentrations were significantly lower in liver, heart and trunk blood samples and the levels were higher in kidneys (if normalized to total protein concentration). As for carnitines, only free carnitine (C0), acetyl-carnitine (C2), propionyl-carnitine (C3) and butyryl-carnitine (C4) were significantly different between the genotypes. C3 and C4 levels were higher in liver, C0 and C2 levels were lower in heart and trunk blood, C0 and C3 levels were higher in kidneys of *Wfs1*^{-/-} mice. Detected purine and pyrimidine level were mostly higher in liver, kidneys and whole blood, but lower in heart tissue of *Wfs1* deficient mice.

Metabolic profiling of *Wfs1*^{-/-} mice show remarkable changes in metabolite concentrations compared to *Wfs1*^{+/-} and *Wfs1*^{+/+} mice, which refer to higher oxidative stress and disruptions of different metabolic pathways in *Wfs1*^{-/-} mice. Future perspectives are studying the effects in different tissues and biofluids of *Wfs1* mice by administration of antioxidants, their analogues and high carbohydrate diet. Also measuring the level of organic acids and analyse the metabolome alterations during aging and the progression of the disease.

KIRJANDUSE LOETELU

- Akisu, M., Kultursay, N., Coker, I. and Huseyinov, A. (2002). "Myocardial and hepatic free carnitine concentrations in pups of diabetic female rats." *Ann Nutr Metab* 461: 45-48.
- Bamba, T., Shimonishi, N., Matsubara, A., Hirata, K., Nakazawa, Y., Kobayashi, A. and Fukusaki, E. (2008). "High throughput and exhaustive analysis of diverse lipids by using supercritical fluid chromatography-mass spectrometry for metabolomics." *J Biosci Bioeng* 1055: 460-469.
- Barrett, T. G. and Bunday, S. E. (1997). "Wolfram (DIDMOAD) syndrome." *J Med Genet* 3410: 838-841.
- Barrett, T. G., Bunday, S. E. and Macleod, A. F. (1995). "Neurodegeneration and diabetes: UK nationwide study of Wolfram (DIDMOAD) syndrome." *Lancet* 3468988: 1458-1463.
- Beckonert, O., Keun, H. C., Ebbels, T. M., Bundy, J., Holmes, E., Lindon, J. C. and Nicholson, J. K. (2007). "Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts." *Nat Protoc* 211: 2692-2703.
- Bene, J., Marton, M., Mohas, M., Bagosi, Z., Bujtor, Z., Oroszlan, T., Gasztonyi, B., Wittmann, I. and Melegh, B. (2013). "Similarities in serum acylcarnitine patterns in type 1 and type 2 diabetes mellitus and in metabolic syndrome." *Ann Nutr Metab* 621: 80-85.
- Bictash, M., Ebbels, T. M., Chan, Q., Loo, R. L., Yap, I. K., Brown, I. J., de Iorio, M., Daviglus, M. L., Holmes, E., Stamler, J., Nicholson, J. K. and Elliott, P. (2010). "Opening up the "Black Box": metabolic phenotyping and metabolome-wide association studies in epidemiology." *J Clin Epidemiol* 639: 970-979.
- Blekherman, G., Laubenbacher, R., Cortes, D. F., Mendes, P., Torti, F. M., Akman, S., Torti, S. V. and Shulaev, V. (2011). "Bioinformatics tools for cancer metabolomics." *Metabolomics* 73: 329-343.
- Carlberg, I. and Mannervik, B. (1985). "Glutathione reductase." *Methods Enzymol* 113: 484-490.
- Chace, D. H., Hillman, S. L., Van Hove, J. L. and Naylor, E. W. (1997). "Rapid diagnosis of MCAD deficiency: quantitative analysis of octanoylcarnitine and other acylcarnitines in newborn blood spots by tandem mass spectrometry." *Clin Chem* 4311: 2106-2113.

- Chylla, R. A., Hu, K., Ellinger, J. J. and Markley, J. L. (2011). "Deconvolution of two-dimensional NMR spectra by fast maximum likelihood reconstruction: application to quantitative metabolomics." *Anal Chem* 8312: 4871-4880.
- De Falco, M., Manente, L., Lucariello, A., Baldi, G., Fiore, P., Laforgia, V., Baldi, A., Iannaccone, A. and De Luca, A. (2012). "Localization and distribution of wolframin in human tissues." *Front Biosci (Elite Ed)* 4: 1986-1998.
- Ellis, D. I., Dunn, W. B., Griffin, J. L., Allwood, J. W. and Goodacre, R. (2007). "Metabolic fingerprinting as a diagnostic tool." *Pharmacogenomics* 89: 1243-1266.
- Fein, F. S. and Sonnenblick, E. H. (1994). "Diabetic cardiomyopathy." *Cardiovasc Drugs Ther* 81: 65-73.
- Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F. and Whitehouse, C. M. (1989). "Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules." *Science* 2464926: 64-71.
- Ferrannini, E., Lanfranchi, A., Rohner-Jeanrenaud, F., Manfredini, G. and Van de Werve, G. (1990). "Influence of long-term diabetes on liver glycogen metabolism in the rat." *Metabolism* 3910: 1082-1088.
- Fonseca, S. G., Fukuma, M., Lipson, K. L., Nguyen, L. X., Allen, J. R., Oka, Y. and Urano, F. (2005). "WFS1 is a novel component of the unfolded protein response and maintains homeostasis of the endoplasmic reticulum in pancreatic beta-cells." *J Biol Chem* 28047: 39609-39615.
- Fonseca, S. G., Urano, F., Weir, G. C., Gromada, J. and Burcin, M. (2012). "Wolfram syndrome 1 and adenylyl cyclase 8 interact at the plasma membrane to regulate insulin production and secretion." *Nat Cell Biol* 1410: 1105-1112.
- Fraser, F. C. and Gunn, T. (1977). "Diabetes mellitus, diabetes insipidus, and optic atrophy. An autosomal recessive syndrome?" *J Med Genet* 143: 190-193.
- Giavalisco, P., Hummel, J., Lisec, J., Inostroza, A. C., Catchpole, G. and Willmitzer, L. (2008). "High-resolution direct infusion-based mass spectrometry in combination with whole ¹³C metabolome isotope labeling allows unambiguous assignment of chemical sum formulas." *Anal Chem* 8024: 9417-9425.
- Grebe, S. K. and Singh, R. J. (2011). "LC-MS/MS in the Clinical Laboratory - Where to From Here?" *Clin Biochem Rev* 321: 5-31.
- Hofmann, S., Philbrook, C., Gerbitz, K. D. and Bauer, M. F. (2003). "Wolfram syndrome: structural and functional analyses of mutant and wild-type wolframin, the WFS1 gene product." *Hum Mol Genet* 1216: 2003-2012.

- Ikonomou, M. G., Blades, A. T. and Kebarle, P. (1990). "Investigations of the electrospray interface for liquid chromatography/mass spectrometry." *Anal Chem* 629: 957-967.
- Inoue, H., Tanizawa, Y., Wasson, J., Behn, P., Kalidas, K., Bernal-Mizrachi, E., Mueckler, M., Marshall, H., Donis-Keller, H., Crock, P., Rogers, D., Mikuni, M., Kumashiro, H., Higashi, K., Sobue, G., Oka, Y. and Permutt, M. A. (1998). "A gene encoding a transmembrane protein is mutated in patients with diabetes mellitus and optic atrophy (Wolfram syndrome)." *Nat Genet* 202: 143-148.
- Ishihara, H., Takeda, S., Tamura, A., Takahashi, R., Yamaguchi, S., Takei, D., Yamada, T., Inoue, H., Soga, H., Katagiri, H., Tanizawa, Y. and Oka, Y. (2004). "Disruption of the WFS1 gene in mice causes progressive beta-cell loss and impaired stimulus-secretion coupling in insulin secretion." *Hum Mol Genet* 1311: 1159-1170.
- Karasik, A., O'Hara, C., Srikanta, S., Swift, M., Soeldner, J. S., Kahn, C. R. and Herskowitz, R. D. (1989). "Genetically programmed selective islet beta-cell loss in diabetic subjects with Wolfram's syndrome." *Diabetes Care* 122: 135-138.
- Kato, T., Ishiwata, M., Yamada, K., Kasahara, T., Kakiuchi, C., Iwamoto, K., Kawamura, K., Ishihara, H. and Oka, Y. (2008). "Behavioral and gene expression analyses of Wfs1 knockout mice as a possible animal model of mood disorder." *Neurosci Res* 612: 143-158.
- Köks, S., Soomets, U., Paya-Cano, J. L., Fernandes, C., Luuk, H., Plaas, M., Terasmaa, A., Tillmann, V., Noormets, K., Vasar, E. and Schalkwyk, L. C. (2009). "Wfs1 gene deletion causes growth retardation in mice and interferes with the growth hormone pathway." *Physiol Genomics* 373: 249-259.
- Köks, S., Soomets, U., Plaas, M., Terasmaa, A., Noormets, K., Tillmann, V., Vasar, E., Fernandes, C. and Schalkwyk, L. C. (2011). "Hypothalamic gene expression profile indicates a reduction in G protein signaling in the Wfs1 mutant mice." *Physiol Genomics* 424: 1351-1358.
- la Marca, G., Casetta, B., Malvagia, S., Pasquini, E., Innocenti, M., Donati, M. A. and Zammarchi, E. (2006). "Implementing tandem mass spectrometry as a routine tool for characterizing the complete purine and pyrimidine metabolic profile in urine samples." *J Mass Spectrom* 4111: 1442-1452.
- Lee, A., Bartle, K. and Lewis, A. (2001). "A model of peak amplitude enhancement in orthogonal two-dimensional gas chromatography." *Anal Chem* 736: 1330-1335.
- Levinthal, G. N. and Tavill, A. S. (1999). "Liver Disease and Diabetes Mellitus." *Clinical Diabetes* 172.

- Lu, J., Xie, G., Jia, W. and Jia, W. (2013). "Metabolomics in human type 2 diabetes research." *Front Med* 71: 4-13.
- Luuk, H., Kõks, S., Plaas, M., Hannibal, J., Rehfeld, J. F. and Vasar, E. (2008). "Distribution of Wfs1 protein in the central nervous system of the mouse and its relation to clinical symptoms of the Wolfram syndrome." *J Comp Neurol* 5096: 642-660.
- Luuk, H., Plaas, M., Raud, S., Innos, J., Sutt, S., Lasner, H., Abramov, U., Kurrikoff, K., Kõks, S. and Vasar, E. (2009). "Wfs1-deficient mice display impaired behavioural adaptation in stressful environment." *Behav Brain Res* 1982: 334-345.
- Maki, T. and Ishida, K. (2007). "Photocleavable molecule for laser desorption ionization mass spectrometry." *J Org Chem* 7217: 6427-6433.
- Medlej, R., Wasson, J., Baz, P., Azar, S., Salti, I., Loiselet, J., Permutt, A. and Halaby, G. (2004). "Diabetes mellitus and optic atrophy: a study of Wolfram syndrome in the Lebanese population." *J Clin Endocrinol Metab* 894: 1656-1661.
- Mendes, P. (2002). "Emerging bioinformatics for the metabolome." *Brief Bioinform* 32: 134-145.
- Mihalik, S. J., Michalyszyn, S. F., de las Heras, J., Bacha, F., Lee, S., Chace, D. H., DeJesus, V. R., Vockley, J. and Arslanian, S. A. (2012). "Metabolomic profiling of fatty acid and amino acid metabolism in youth with obesity and type 2 diabetes: evidence for enhanced mitochondrial oxidation." *Diabetes Care* 353: 605-611.
- Milne, S. B., Mathews, T. P., Myers, D. S., Ivanova, P. T. and Brown, H. A. (2013). "Sum of the Parts: Mass Spectrometry-Based Metabolomics." *Biochemistry*.
- Noormets, K., Kõks, S., Muldmaa, M., Muring, L., Vasar, E. and Tillmann, V. (2011). "Sex differences in the development of diabetes in mice with deleted wolframin (Wfs1) gene." *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1195: 271-275.
- Noormets, K., Kõks, S., Kavak, A., Arend, A., Aunapuu, M., Keldrimaa, A., Vasar, E. and Tillmann, V. (2009). "Male mice with deleted Wolframin (Wfs1) gene have reduced fertility." *Reprod Biol Endocrinol* 7: 82.
- Osman, A. A., Saito, M., Makepeace, C., Permutt, M. A., Schlesinger, P. and Mueckler, M. (2003). "Wolframin expression induces novel ion channel activity in endoplasmic reticulum membranes and increases intracellular calcium." *J Biol Chem* 27852: 52755-52762.
- Ott, K. H. and Aranibar, N. (2007). "Nuclear magnetic resonance metabolomics: methods for drug discovery and development." *Methods Mol Biol* 358: 247-271.
- Pawelczyk, T., Podgorska, M. and Sakowicz, M. (2003). "The effect of insulin on expression level of nucleosides transporters in diabetic rats." *Mol Pharm* 63: 81-88.

- Pongsuwan, W., Fukusaki, E., Bamba, T., Yonetani, T., Yamahara, T. and Kobayashi, A. (2007). "Prediction of Japanese green tea ranking by gas chromatography/mass spectrometry-based hydrophilic metabolite fingerprinting." *J Agric Food Chem* 552: 231-236.
- Putri, S. P., Yamamoto, S., Tsugawa, H. and Fukusaki, E. (2012). "Current metabolomics: Technological advances." *J Biosci Bioeng*.
- Raamsdonk, L. M., Teusink, B., Broadhurst, D., Zhang, N., Hayes, A., Walsh, M. C., Berden, J. A., Brindle, K. M., Kell, D. B., Rowland, J. J., Westerhoff, H. V., van Dam, K. and Oliver, S. G. (2001). "A functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations." *Nat Biotechnol* 191: 45-50.
- Raud, S., Sutt, S., Luuk, H., Plaas, M., Innos, J., Kõks, S. and Vasar, E. (2009). "Relation between increased anxiety and reduced expression of alpha1 and alpha2 subunits of GABA(A) receptors in Wfs1-deficient mice." *Neurosci Lett* 4602: 138-142.
- Riggs, A. C., Bernal-Mizrachi, E., Ohsugi, M., Wasson, J., Fatrai, S., Welling, C., Murray, J., Schmidt, R. E., Herrera, P. L. and Permutt, M. A. (2005). "Mice conditionally lacking the Wolfram gene in pancreatic islet beta cells exhibit diabetes as a result of enhanced endoplasmic reticulum stress and apoptosis." *Diabetologia* 4811: 2313-2321.
- Rigoli, L., Lombardo, F. and Di Bella, C. (2011). "Wolfram syndrome and WFS1 gene." *Clin Genet* 792: 103-117.
- Rochfort, S. (2005). "Metabolomics reviewed: a new "omics" platform technology for systems biology and implications for natural products research." *J Nat Prod* 6812: 1813-1820.
- Rosenling, T., Slim, C. L., Christin, C., Coulier, L., Shi, S., Stoop, M. P., Bosman, J., Suits, F., Horvatovich, P. L., Stockhofe-Zurwieden, N., Vreeken, R., Hankemeier, T., van Gool, A. J., Luider, T. M. and Bischoff, R. (2009). "The effect of preanalytical factors on stability of the proteome and selected metabolites in cerebrospinal fluid (CSF)." *J Proteome Res* 812: 5511-5522.
- Shortreed, M. R., Lamos, S. M., Frey, B. L., Phillips, M. F., Patel, M., Belshaw, P. J. and Smith, L. M. (2006). "Ionizable isotopic labeling reagent for relative quantification of amine metabolites by mass spectrometry." *Anal Chem* 7818: 6398-6403.
- Shulaev, V. (2006). "Metabolomics technology and bioinformatics." *Brief Bioinform* 72: 128-139.
- Smith, E. H. and Matern, D. (2010). "Acylcarnitine analysis by tandem mass spectrometry." *Curr Protoc Hum Genet Chapter 17: Unit 17 18 11-20*.

- Smolinska, A., Blanchet, L., Buydens, L. M. and Wijmenga, S. S. (2012). "NMR and pattern recognition methods in metabolomics: from data acquisition to biomarker discovery: a review." *Anal Chim Acta* 750: 82-97.
- Soga, T. and Heiger, D. N. (2000). "Amino acid analysis by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry." *Anal Chem* 726: 1236-1241.
- Strom, T. M., Hortnagel, K., Hofmann, S., Gekeler, F., Scharfe, C., Rabl, W., Gerbitz, K. D. and Meitinger, T. (1998). "Diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy and deafness (DIDMOAD) caused by mutations in a novel gene (wolframin) coding for a predicted transmembrane protein." *Hum Mol Genet* 713: 2021-2028.
- Sun, G., Yang, K., Zhao, Z., Guan, S., Han, X. and Gross, R. W. (2007). "Shotgun metabolomics approach for the analysis of negatively charged water-soluble cellular metabolites from mouse heart tissue." *Anal Chem* 7917: 6629-6640.
- Swift, M. and Swift, R. G. (2000). "Psychiatric disorders and mutations at the Wolfram syndrome locus." *Biol Psychiatry* 479: 787-793.
- Swift, R. G., Perkins, D. O., Chase, C. L., Sadler, D. B. and Swift, M. (1991). "Psychiatric disorders in 36 families with Wolfram syndrome." *Am J Psychiatry* 1486: 775-779.
- Swift, R. G., Polymeropoulos, M. H., Torres, R. and Swift, M. (1998). "Predisposition of Wolfram syndrome heterozygotes to psychiatric illness." *Mol Psychiatry* 31: 86-91.
- Swift, R. G., Sadler, D. B. and Swift, M. (1990). "Psychiatric findings in Wolfram syndrome homozygotes." *Lancet* 3368716: 667-669.
- Zatyka, M., Ricketts, C., da Silva Xavier, G., Minton, J., Fenton, S., Hofmann-Thiel, S., Rutter, G. A. and Barrett, T. G. (2008). "Sodium-potassium ATPase 1 subunit is a molecular partner of Wolframin, an endoplasmic reticulum protein involved in ER stress." *Hum Mol Genet* 172: 190-200.
- Zhang, Q., Wang, G., Du, Y., Zhu, L. and Jiye, A. (2007). "GC/MS analysis of the rat urine for metabonomic research." *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 8541-2: 20-25.
- Takeda, K., Inoue, H., Tanizawa, Y., Matsuzaki, Y., Oba, J., Watanabe, Y., Shinoda, K. and Oka, Y. (2001). "WFS1 (Wolfram syndrome 1) gene product: predominant subcellular localization to endoplasmic reticulum in cultured cells and neuronal expression in rat brain." *Hum Mol Genet* 105: 477-484.
- Terasmaa, A., Soomets, U., Oflijan, J., Punapart, M., Hansen, M., Matto, V., Ehrlich, K., Must, A., Kõks, S. and Vasar, E. (2011). "Wfs1 mutation makes mice sensitive to insulin-like effect of acute valproic acid and resistant to streptozocin." *J Physiol Biochem* 673: 381-390.

- Tietze, F. (1969). "Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues." *Anal Biochem* 273: 502-522.
- Ursini, F., Maiorino, M. and Gregolin, C. (1985). "The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase." *Biochim Biophys Acta* 8391: 62-70.
- Vaidyanathan, S., Gaskell, S. and Goodacre, R. (2006). "Matrix-suppressed laser desorption/ionisation mass spectrometry and its suitability for metabolome analyses." *Rapid Commun Mass Spectrom* 208: 1192-1198.
- Wolfram, D. J., Wagener, H. P. (1938). "Diabetes mellitus and simple optic atrophy among siblings: report of four cases." *Mayo Clinic proceedings* 13: 715-718.
- Xia, Z. and Storm, D. R. (2005). "The role of calmodulin as a signal integrator for synaptic plasticity." *Nat Rev Neurosci* 64: 267-276.
- Xia, Y., Li, Q., Zhong, W., Dong, J., Wang, Z. and Wang, C. (2011). "L-carnitine ameliorated fatty liver in high-calorie diet/STZ-induced type 2 diabetic mice by improving mitochondrial function." *Diabetol Metab Syndr* 3: 31.
- Yamada, T., Ishihara, H., Tamura, A., Takahashi, R., Yamaguchi, S., Takei, D., Tokita, A., Satake, C., Tashiro, F., Katagiri, H., Aburatani, H., Miyazaki, J. and Oka, Y. (2006). "WFS1-deficiency increases endoplasmic reticulum stress, impairs cell cycle progression and triggers the apoptotic pathway specifically in pancreatic beta-cells." *Hum Mol Genet* 1510: 1600-1609.
- Yurimoto, S., Hatano, N., Tsuchiya, M., Kato, K., Fujimoto, T., Masaki, T., Kobayashi, R. and Tokumitsu, H. (2009). "Identification and characterization of wolframin, the product of the wolfram syndrome gene (WFS1), as a novel calmodulin-binding protein." *Biochemistry* 4818: 3946-3955.

KASUTATUD VEEBIAADDRESSID

<http://www.hmdb.ca>

<http://metlin.scripps.edu>

LISAD

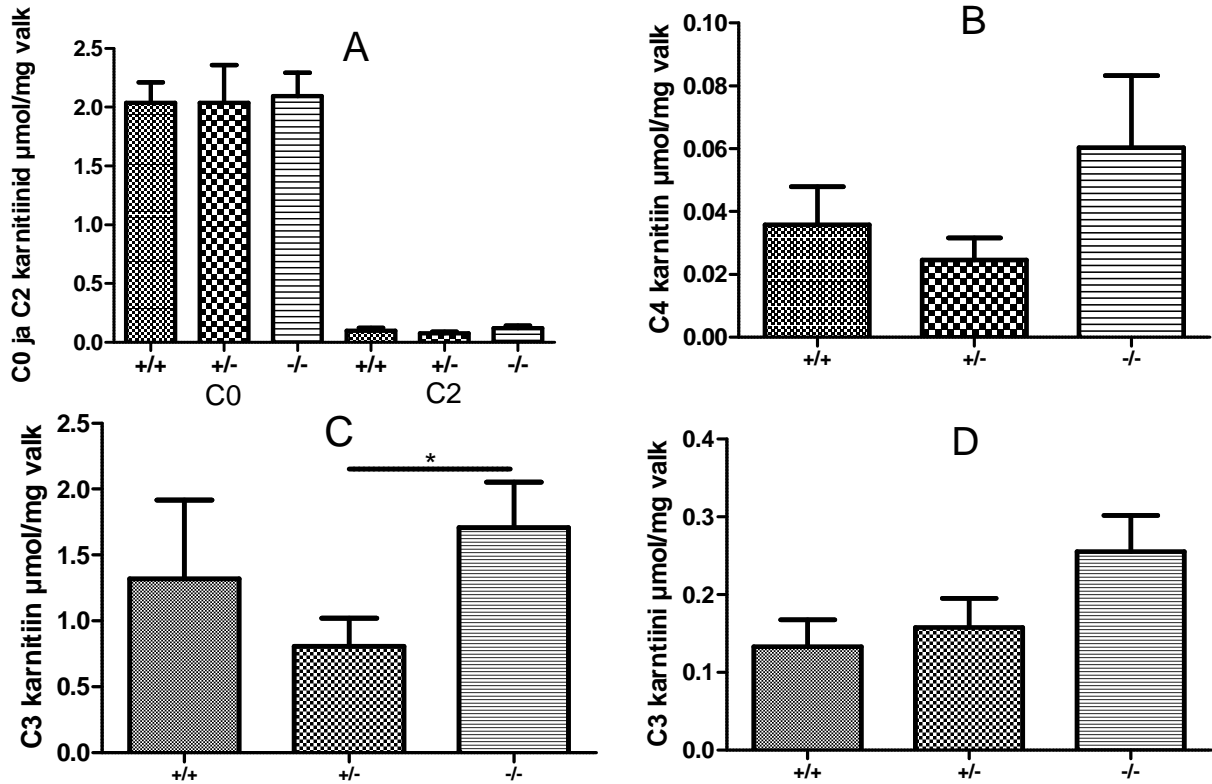
Lisa 1. Vedelikkromatograaf-tandem-mass-spektromeetria suunamata analüüsi (A), aminohapete ja karnitiinide (B) ning puriinide ja pürimidiinide (C) taseme määramise meetodika parameetrid.

A	Hüdrofiilne faas	Hüdrofoobne faas
Süstitud ruumala (µl)	10	10
HPLC mobiilne faas A	0,1% metaanhape metanoolis	0,1% metaanhape metanoolis
HPLC mobiilne faas B	0,1% metaanhape vees	0,1% metaanhape vees
A + B gradient (min)	5	5
Voolukiirus (ml/min)	0,1 – 3,0 min: A 0,025 B 0,025 3,1 – 5,0 min: B 0,05	B 0,05
<i>m/z</i> vahemik (Da)	50 - 1500	50 - 1500
Elektropihustuse temperatuur (°C)	25	300

B	Aminohapped	Karnitiinid
Süstitud ruumala (µl)	15	15
HPLC mobiilne faas A	0,1% metaanhape AcN-is	0,1% metaanhape AcN-is
HPLC mobiilne faas B	0,1% metaanhape vees	0,1% metaanhape vees
A + B gradient (min)	5	5
Voolukiirus (ml/min)	A 0,05 B 0,05	0,1-0,5 min: A 0,05 B 0,05 0,5- 2,0 min: A 0,05-0,01 B 0,05-0,09 2,0-5,0 min: A 0,01 B 0,09
Elektropihustuse temperatuur (°C)	400	400
Kapillaari pinge (V)	5500	5500

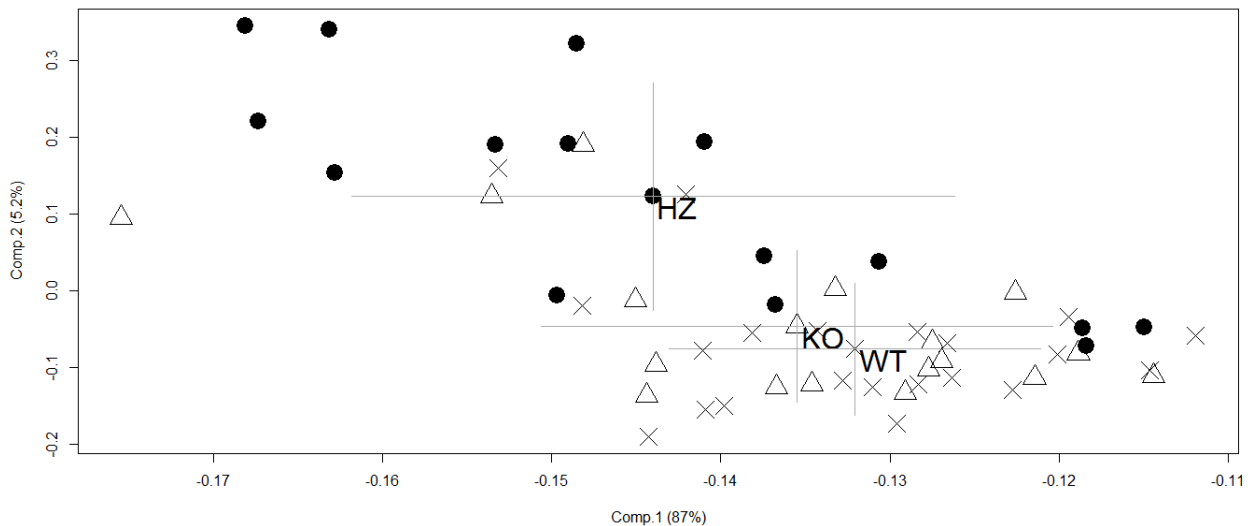
C	
Süstitud ruumala (µl)	20
HPLC mobiilne faas A	5 mM ammooniumatsetaat vees
HPLC mobiilne faas B	5 mM ammooniumatsetaat metanoolis
A + B gradient (min)	2,7 + 7,3
Voolukiirus (ml/min)	0,1-1,0 min: A 0,34 B 0,06 1,0-6,0 min: A 0,34-0,20 B 0,06-0,20 6,0-10,0 min: A 0,20 B 0,20
Elektropihustuse temperatuur (°C)	300
Kapillaari pinge (V)	5000
Kolonni temperatuur (°C)	55

Lisa 2. Karnitiinide kontsentratsioon erinevates kudedes.

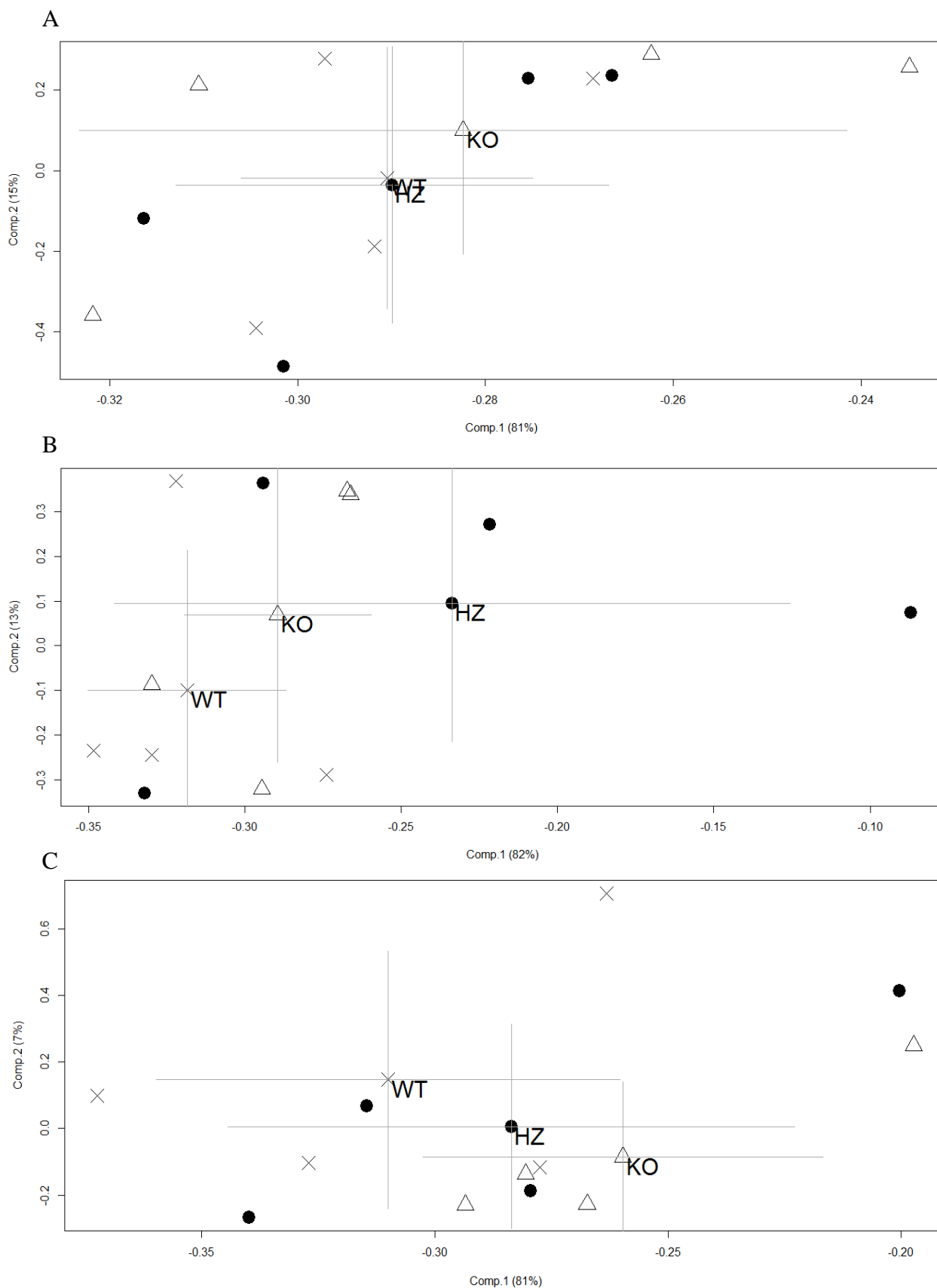


Joonis 1. Maksa vaba karnitiini (C0), atsetüül- (C2) (A) ja butüüülkarnitiini (C4) (B) ning neerude (C) ja südamel (D) propionüülkarnitiini (C3) kontsentratsioon *Wfs1* metsiktüüpi (+/+), heterosügootse (+/-) ja geeni defektiga (+/-) hiirtel, n=4-22.

Lisa 3. Suunamata analüüsi peakomponentanalüüsi joonised.



Joonis 1. Uriini metaboliitide suunamata analüüsi peakomponentanalüüs. Iga sümbol vastab erineva analüüsitud hiire metaboloomi jaotusele vastavast *Wfs1* genotüübist. Esitatud on ka gruppide keskmised ja standardvead (lissasümbol), n=15-21. Δ -*Wfs1*^{-/-} (KO); •- *Wfs1*^{+/-} (HZ); x- *Wfs1*^{+/+} (WT).



Joonis 2. Südame (A), neerude (B) ja täisvere (C) metaboliitide suunamata analüüsi peakomponentanalüüs. Iga sümbol vastab erineva analüüsitud hiire metaboloomi jaotusele vastavast *Wfs1* genotüübist. Esitatud on ka gruppide keskmised ja standardvead, iga genotüübi korral n=4. Δ -*Wfs1*^{-/-}(KO); ●- *Wfs1*^{+/-}(HZ); ×- *Wfs1*^{+/+}(WT).

Lisa 4. Koe kaalule ja valgule normaliseerimise erinevused.

Tabel 1. Aminohapete kontsentratsioonide erinevused *WfsI^{-/-}* hiirel võrrelduna *WfsI^{+/+}* hiirega, n=12-24. *Samasuunaline muutus ka *WfsI^{+/-}* vs *WfsI^{+/+}*; ↑/↓' muutus ainult *WfsI^{+/-}* vs *WfsI^{+/+}*; p<0,05. Tühi lahter – statistiliselt olulist muutust ei esinenud.

Aminohape	Normaliseeritud valgu kontsentratsioonile		Normaliseeritud koe kaalule	
	Süda	Neerud	Süda	Neerud
Alaniin	↓*	↑	↓	
Arginiin		↑		
Asparagiin				
Asparagiinhape	↓			↓*
Glutamiin	↓			↓
Glutamiinhape	↓		↓	↓*
Glütsiin	↓			↓*
Histidiin	↓	↑	↓	
Leutsiin	↓*	↑*	↓	↓'
Lüsiin		↑		↓'
Metioniin	↓			
Hüdroksüproliin	↓*		↓	
Ornitiin		↑		
Fenüülalaniin	↓	↑		
Seriin				
Türosiin	↓			
Valiin	↓			

LIHTLITSENTS

Mina, **Rando Porosk (26.09.1988)**,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „**Wolframi sündroom 1 geeni defektiga hiire metabooloomi kirjeldus**“, mille juhendajad on **Kalle Kilk PhD, Riina Mahlapuu PhD ja Margus Pooga PhD**,
 - 1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **01.01.2016** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 27.05.2013