

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

**WFS1-puudulikkusega roti piklikaju neurodegeneratsiooni
iseloomustus**

Magistritöö (30 EAP)

Kadri Seppa

Juhendaja PhD Anton Terasmaa

Kaasjuhendajad PhD Mario Plaas, PhD Tambet Tõnissoo

Tartu 2017

INFOLEHT

WFS1-puudulikkusega roti piklikaju neurodegeneratsiooni iseloomustus

Wolframi sündroomi (WS) põhjustab *WFS1* geeni bialleelne mutatsioon. WS-i iseloomustavad suhkurdiabeet, endokriinne väärtalitlus, optiline atroofia ning ajutüve progressiivne neurodegeneratsioon. Eelnevad uuringud on peamiselt keskendunud esimese sümptomina avalduva suhkurdiabeedi uurimisele ning sellest lähtuvalt on neurodegeneratsiooni uurimine jäänud tagaplaanile. Käesolevas töös uuriti WFS1-puudulikkusega roti piklikaju neurodegeneratsiooni. Uuringus nähti WFS1-puudulikel rottidel piklikaju ruumala vähenemist, ajast sõltuvat neuronaalset ER-i stressi ning WFS1 valgu ekspressiooni vähenemist oliivtuumade tasandil. Lisaks näidati esmakordselt WFS1 lokaliseerumist FOXP2 positiivsetes oliivtuuma neuronites. Töö tulemustest võib järeldada, et WFS1-puudulikel rottidel esineb WS-i patsientidega sarnane piklikaju neurodegeneratsiooni muster.

Märksõnad: Wolframi sündroom, ER-i stress, WFS1-puudulikkusega rott, oliivtuumad, neurodegeneratsioon

CERCS kood: B470 Neuroloogia, neuropsühholoogia, neurofüsioloogia

Characterization of medulla neurodegeneration in WFS1 deficient rats

Wolfram syndrome (WS) is characterized by diabetes mellitus, endocrine dysfunction and progressive neurologic degeneration of brainstem and is caused by biallelic mutations of the *WFS1* gene. Since previous studies have mainly focused on investigation of diabetes mellitus, the aim of the present study was to examine neurodegeneration of medulla in WFS1 deficient rats. WFS1 deficient rats showed decrease in volume of the medulla, age-dependent neuronal ER stress and decreased expression of WFS1 protein at the level of the inferior olive. In addition, WFS1 localization in FOXP2 positive neurons was shown for the first time. Thus, the pattern of neurodegeneration of the medulla appears to be similar in WFS1 deficient rats and in human WS patients.

Keywords: Wolfram syndrome, ER stress, WFS1 deficient rat, inferior olive, neurodegeneration

CERCS code: B640 Neurology, neuropsychology, neurophysiology

Sisukord

KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	7
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	8
1.1 Wolframi sündroom.....	8
1.2 Wolframi sündroomist põhjustatud ajutüve neurodegeneratsioon	8
1.3 <i>WFS1</i> geen ja valk	10
1.3.1 Mutatsioonid <i>WFS1</i> geenis.....	12
1.3.2 <i>WFS1</i> ekspressioon ja funktsioon	12
1.4 Loommudelid WS-i uurimiseks.....	15
2 EKSPERIMENTAALOSA	18
2.1 Uurimistöö eesmärgid.....	18
2.2 Materjal ja meetodika	19
2.2.1 Katseloomad	19
2.3 Immunohistokeemia.....	19
2.4 <i>In vivo</i> magnetresonantstomograafia	20
2.5 Kvantitatiivne reaalka PCR.....	21
2.6 Andmete analüüs.....	22
2.7 Tulemused.....	23
2.7.1 Piklikaju ruumala on vähenenud <i>Wfs1</i> -ex5-KO232 rotil	23
2.7.2 <i>WFS1</i> valk on ekspresseeritud ajutüves	26

2.7.3	WFS1 valk on ekspresseeritud oliivtuumade neuronites.....	27
2.7.4	<i>Wfs1</i> ja <i>Foxp2</i> mRNA ekspressioon ventraalses piklikajus	29
2.7.5	Ventraalses piklikajus esineb ER-i stress	30
KOKKUVÕTE		34
Characterization of medulla neurodegeneration in <i>Wfs1</i> deficient rats		36
KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU		38
LIHTLITSENTS.....		43

KASUTATUD LÜHENDID

ANOVA	dispersioonanalüüs (ingl <i>analysis of variance</i>)
ATF6	aktiveeriv transkriptsioonifaktor 6
CA1	hipokampuse <i>Cornu Ammonis</i> ala 1
cDNA	komplementaarne DNA (ingl <i>complementary DNA</i>)
DIDMOAD	ingl <i>Diabetes Insipidus, Diabetes Mellitus, Optic Atrophy, Deafness</i>
ER	endoplasmaatiline retiikulum
IRE1	inositool-sõltuv ensüüm
KO	ingl <i>knock-out</i>
LI	lineaartuum
OT	oliivtuumad
PERK	kaheahelaline RNA aktiveeritud proteiin – kinaasi-sarnane ER-i kinaas
SEM	keskväärtuse standardviga (ingl <i>standard error of the mean</i>)
SERCA	sarko(endoplasmaatilise) retiikulumi kaltsiumi ATPaas
ZFN	tsinksõrmede nukleasid (ingl <i>zinc finger nucleases</i>)
WFS1	Wolframi sündroomi 1 valk inimesel
WS	Wolframi sündroom
WT	metsiktüüpi (ingl <i>wild-type</i>)
MRT	magnetresonantsomograafia
GABA	gamma-aminovõihape
FOXP2	ingl <i>forkhead box P2</i>
UPR	mittevoltunud valkude vastus (ingl <i>unfolded protein response</i>)

GRP78	glükoosi reguleeritud valk 78
XBP1	X-box-iga seonduv valk 1
IP3	inositool-trifosfaat-retseptor
eIF2 α	eukariootse initsiatsiooni faktor 2 alfa
V-H-ATPase	vakuolne prootonpump
SERCA	sarko(endo)plasmaatilise retiikulumi kaltsiumi ATPaas
Fisheri LSD	ingl <i>Fishers Least Significant Difference</i>

SISSEJUHATUS

Neurodegeneratiivsed haigused on mitmetegurilised närvisüsteemi häired, mis mõjutavad umbes 30 miljonit inimest maailmas. Üheks haruldaseks autosomaalse pärandumismustriga neurodegeneratiivseks häireks on Wolframi sündroom (WS). See on põhjustatud bialleelsest mutatsioonist Wolframi sündroomi 1 geenis (*WFS1*), mis kodeerib transmembraanset endoplasmaatilise retiikulumi membraanis paiknevat WFS1 valku. WS-i esimene sümptom on suhkurdiabeet, sellele järgnevad nägemisnärv atroofia, magediabeet ja neuroloogilised komplikatsioonid. Kuna WS-i tekkepõhjus on teadmata ning sel puudub ravi, surevad WS-i põdevad inimesed elu neljandal dekaadil ajutüve atroofiast põhjustatud hingamise seiskumisse. Ajutüvi koosneb ajusillast ja piklikajust ning kontrollib eluks vajalikke vegetatiivseid funktsioone, nagu hingamist, südametööd ja ainevahetust ning refleksseid mehhanisme, nagu neelamist ja köhimist. WS-i patsientidel esinev piklikaju degeneratsioon on laialdaselt kirjeldatud WS-i patoloogia, mis põhjustab ataksiat, unepnoed, düsfaagiat ning kuulmis- ja maitsmismeele kadu.

Selleks, et paremini mõista *WFS1* geeni mutatsioonist põhjustatud WS-i kujunemist, on Tartu Ülikooli bio- ja siirdemeditsiini instituudis loodud *Wfs1* transgeenne rott, kelle *Wfs1* geeni viies kodeeriv ekson on deleteeritud. Kuna eelnevad uuringud on peamiselt keskendunud esimese sümptomina avalduva suhkurdiabeedi uurimisele ning neurodegeneratsioon on jäänud uurimisfookusest välja, on käesoleva töö eesmärk kirjeldada WFS1-puudulikkusega roti piklikaju neurodegeneratsiooni. Töös kasutati magnetresonantsuuringut, immunohistoloogiat ning geeniekspressiooni uuringut, et välja selgitada, kas WFS1-puudulikel rottidel esineb WS-i patsientidega sarnane piklikaju neurodegeneratsiooni muster. Uuringute läbiviimiseks kasutati 93 roti aju. Enamik töös saadud tulemusi on avaldamisel ajakirjas Scientific Reports (Plaas *et al.*, 2017).

Töö koostati Tartu Ülikooli bio- ja siirdemeditsiini instituudi füsioloogia osakonnas.

1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Wolframi sündroom

Wolframi sündroom (WS) on haruldane autosomaalne retsessiivne haigus, mis on põhjustatud Wolframi sündroomi 1 geeni, *WFS1* mutatsioonidest (Inoue *et al.*, 1998, Strom *et al.*, 1998). Esimene kirjalik juhtum pärineb 1938. aastast, kui Wolfram ja Wagener kirjeldasid ühe perekonna neljal lapsel esinevat suhkurdiabeeti ja optilist atroofiat (Wolfram ja Wagener, 1938). WS on progressiivne neurodegeneratiivne häire, mille esmane sümptom on elu esimesel dekaadil avalduv suhkurdiabeet (*diabetes mellitus*) ning sellele järgneb optilisest atroofiast põhjustatud nägemise kadumine. Elu teisel dekaadil kujunevad välja magediabeet (*diabetes insipidus*) ja sensorineuraalne kurtus, kolmandal dekaadil avalduvad neerutrakti komplikatsioonid ning järgnevad neuroloogilised häired, sh ataksia, düsfaagia, psühhiaatrilised häired ja ajutüve atroofia. Kuna WS-il puudub ravi, siis enamasti surevad WS-i põdevad inimesed 30. eluaastatel ajutüve atroofiast põhjustatud hingamise seiskumisse. WS on tuntud ka sümptomitest koosneva akronüümiga DIDMOAD (ingl *Diabetes Insipidus, Diabetes Mellitus, Optic Atrophy, Deafness*). Minimaalsed sümptomid, mille järgi WS-i diagnoosida, on suhkurdiabeet ning optiline atroofia (Barrett *et al.*, 1995). WS-i esineb Suurbritannias ligikaudu 1 juhul 770 000-st, kus heterosügootsete mutatsioonide kandjaks on üks inimene 354-st (Barrett *et al.*, 1995) ning Põhja-Ameerikas 1 : 100 000 juhul, kus üks inimene 100-st võib olla heterosügootsete mutatsioonide kandjaks (Fraser ja Gunn, 1977). Heterosügootsetel *WFS1* kandjatel on näidatud 26 korda suuremat riski haigestuda psühhiaatrilistesse haigustesse, mis vajavad haiglaravi (Swift *et al.*, 1998). 62%-l patsientidest on WS-ist tulenevad neuroloogilised häired, millest enamlevinud on ataksia, lihas- ja silmatõmbused, tsentraalne uneapnoe, okserefleksi kadu, epilepsia, progressiivne sensoorsete funktsioonide kadu, sh kuulmis- ja maitsmismeele kadu ja lisaks ka psühhiaatrilised sümptomid, nagu ärevushäire, tujumuutused, paanikaatakid, depressioon ja psühhoos (Swift *et al.*, 1990, Barrett *et al.*, 1995, Medlej *et al.*, 2004, Urano, 2016).

1.2 Wolframi sündroomist põhjustatud ajutüve neurodegeneratsioon

Peaaju posterioorses osas paiknev ajutüvi koosneb keskajust, ajusillast ja piklikajust ning on peaaju evolutsiooniliselt vanim ja olulisim osa, kuna kontrollib eluks vajalikke vegetatiivseid funktsioone, nagu hingamist, vereringet, südame tööd, vererõhku ja ainevahetust. Lisaks kontrollib ajutüvi refleksseid mehhanisme, nagu neelamine, köhimine ja oksendamine, ning

osaleb sensoorse informatsiooni töötlemises (Kuhlenbeck, 1975). WS-i patsientidel esinevad sümptomid ataksia, uneapnoe, düsfaagia ning kuulmis- ja maitsmismeelse kadu on põhjustatud ajutüve atroofiast, seetõttu võib pidada progressiivset neurodegeneratsiooni WS-i levinud tunnuseks. WS-i patsientide surmapõhjuseks on enamasti ajutüve atroofiast põhjustatud hingamise seiskumine (Barrett *et al.*, 1997, Hilson *et al.*, 2009, Urano, 2016).

Ajutüve atroofia kindlakstegemiseks on eelneva 20 aasta jooksul kasutatud nii magnetresonantstomograafiat (MRT) kui ka *post mortem*'i makroskoopilist uuringut. MRT uuringuga on näidatud täiskasvanud WS-i patsientidel esinevat väikeaju, piklikaju ja ajusilla atroofiat ning optilise närvi signaali nõrgenemist (Hardy *et al.*, 1999). MRT uuringut on läbi viidud ka noorel (5–25-aastastel) WS-i patsientidel ning leitud, et juba noortel WS-i patsientidel on keskaju, ajusilla ja piklikaju ruumala vähenenud, mis annab alust hüpoteesile, et WS-i puhul on tegemist nii häiritud neuronaalse arengu kui ka hilisema neurodegeneratsiooniga (Hershey *et al.*, 2012). 2016. aastal suurima kohordiga läbiviidud MRT uuringus analüüsiti 21 WS-i põdeva lapse ja noore täiskasvanu (vanuses 6–26 aastat) andmeid ning täheldati samuti nii ventraalse kui ka dorsaalse ajusilla, väikeaju ja piklikaju ruumala vähenemist juba noores eas (Lugar *et al.*, 2016). Lisaks inimuuringutele on ka *Wfs1* mutantsel hiirel *ex vivo* MR-i kuvamisega näidatud *Wfs1* KO-hiirtel esinevat ajutüve ruumala vähenemist (Cagalinec *et al.*, 2016).

Samuti on kasutatud *post mortem*'i makroskoopilist uuringut ning näidatud 45-aastaselt WS-i patsiendil ulatuslikku nii optilise närvi, kiasmi, trakti kui ka piklikaju, ajusilla ja väikeaju atroofiat (Barrett *et al.*, 1997). Täiendavalt on kirjeldatud 24-aastase WS-i patsiendi haiguslugu, kelle MRT analüüsis tuvastati patsiendil nõrk ajukoore ja väikeaju atroofia, lisaks märgati ka kergeid atroofilisi muutusi ajusillas ja optilises närvis. Hiljem läbiviidud *post mortem*'i uuringus näidati sellel patsiendil selgelt piklikaju ja ajusilla kahanemist, kuigi väikeaju oli suuresti jäänud mõjutamata. Eelnevalt kirjeldatud struktuuride suuruse vähenemine tuleneb neuronite degeneratsioonist. Neuronite kadu ja gliosis on kirjeldatud lisaks mediaalses vestibulaartuumas, piklikaju retikulaarses formatsioonis, ajusilla ventraalses osas ja oliivtuumades (Hilson *et al.*, 2009). Samuti on hiire piklikajus näidatud WFS1 lokalisatsiooni pea kõigis ajutüve sensoorsetes ja mootorsetes tuumades, sh mediaalses ja lateraalses vestibulaartuumas, retikulaarses formatsioonis ning oliivtuumades (Luuk *et al.*, 2008). Piklikaju ventraalses osas paiknevate oliivtuumade neuronite kadu on kirjeldatud WS-i patsiendil ning lisaks on hiiremudelil näidatud WFS1 lokalisatsiooni oliivtuumades. Sellest

võib järeldada, et oliivtuumadel võib olla oluline, kuid seni teadmata funktsioon WS-i väljakujunemises ning progresseerumisel.

Oliivtuumi seostatakse tasakaalureflekside ja koordineerimise reguleerimisega ning sisekõrvast saabuvatest helidest tekitatud närviimpulsside töötlemisega, lisaks on oliivtuumad olulised peenmotoorika väljundi moduleerimises (Campbell *et al.*, 2009). Oliivtuumad koosnevad mitmest alamtuumast, mis sisaldavad nii eksitatorseid neuroneid, mis projekteerivad väikeajusse ronivate jätketena (ingl *climbing fibers*) kui ka vähesel hulgal GABAergilisi mitteprojekteerivaid neuroneid (Fredette *et al.*, 1992). On näidatud, et rotil, hiirel ja kanal on transkriptsioonifaktor FOXP2 (ingl *forkhead box P2*) lokaliseeritud nähtavalt kõikides oliivtuumade neuronites kogu arengu vältel. Kuna FOXP2 lokaliseerimine liikide vahel oli oliivtuumades sama, võib FOXP2 pidada oliivtuumade neuronite molekulaarseks markeriks (Fujita ja Sugihara, 2012). Lisaks on FOXP2 ekspressiooni lokaliseerimise eesajajaks ja keskajaks seostatud kõne ja vokaalse kommunikatsiooniga inimestel ning lindudel (Lai *et al.*, 2003). Lähtudes kirjandusest, saab FOXP2 kasutada piklikaju oliivtuumade neurodegeneratsiooni hindamiseks.

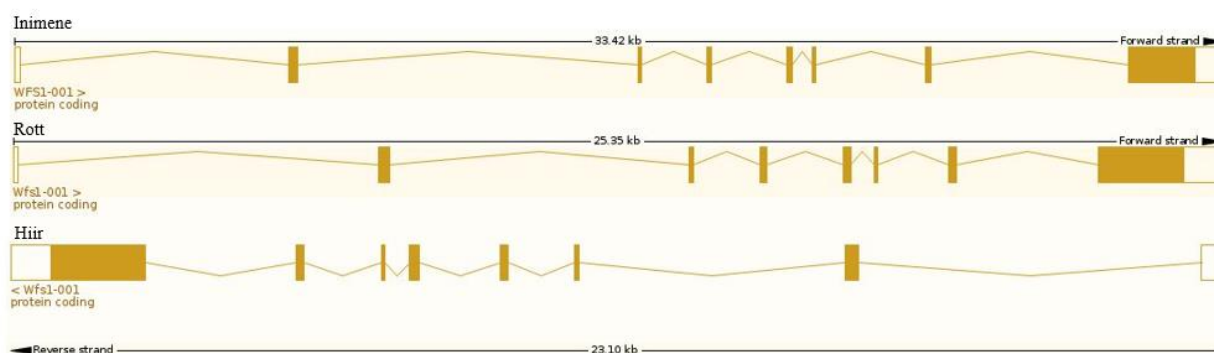
1.3 WFS1 geen ja valk

WS-i põhjustava geeni WFS1 identifitseerisid geneetilise kaardistamise käigus 1998. aastal kaks sõltumatut töögruppi (Inoue *et al.*, 1998, Strom *et al.*, 1998). Inimese WFS1 geenil on 6 alternatiivset splaissimise varianti: WFS1-001, WFS1-008, WFS1-007, WFS1-004, WFS1-005, WFS1-006, millest kolm on valku kodeerivad: WFS1-001, WFS1-008, WFS1-007, kuid ainult ühe valku kodeeriva transkript-WFS1-001 on The Wellcome Trust Sanger instituudi HAVANA grupp manuaalselt anoteerinud – see on 33,42 kb suur, asub inimesel neljanda kromosoomi väikese öla 16.1 alas ning koosneb kaheksast eksonist, millest esimene on mittekodeeriv (<http://vega.sanger.ac.uk/>). Translatsioon algab teisest eksonist ning tulemuseks on WFS1 valk, mis koosneb 890 aminohappest molekulmassiga 100 kDa (joonis 1) (Ensembl 2017).

Roti *Wfs1* geenil on vaid üks transkript *Wfs1-001*, see on 25,35 kb suurune, asub rotil 14. kromosoomi suure öla 21 alas ning sarnaselt inimesega koosneb kaheksast eksonist, millest seitse on kodeerivad, tulemuseks on samuti 890 aminohappest koosnev valk molekulmassiga 100 kDa. Inimese ja roti WFS1/Wfs1 geen on 86,40% konserveerunud (joonis 1) (Ensembl 2017).

Hiire *Wfs1* geenil on kolm transkripti: *Wfs1-001*, *Wfs1-002* ja *Wfs1-003*. Neist ainult *Wfs1-001* on The Wellcome Trust Sanger instituudi HAVANA grupil manuaalselt annoteeritud valku kodeeriv transkript, mis on 23,10 kb suur. See asub hiire viienda kromosoomi *reverse strand*'i B3 alas, koosneb kaheksast eksonist, millest seitse on kodeerivad. Tulemuseks on sarnaselt inimese ja rotiga 890 aminohappesest koosnev valk, mille molekulmass on 100 kDa (joonis 1). Hiire ja roti *Wfs1* geen on omavahel 97,19% ning hiire ja inimese geen 87,08% konserveerunud (Ensembl 2017).

Inimese ja hiire puhul viitab kolme valku kodeeriva transkripti olemasolu alternatiivsele splaissingule, mis aga ei esine rotil. *Wfs1-001* transkriptilt kodeeritud WFS1 valk on hüdrofoobne ja tetrameerne valk, millel on ennustatavalt üheksa transmembraanset segmenti (joonis 2) ning nii karboksüül- kui aminoterminaalsetes otstes hüdrofiilsed regioonid (Rigoli *et al.*, 2011).



Joonis 1. *WFS1/Wfs1* transkriptid inimesel, rotil ja hiirel. *WFS1/Wfs1* geen koosneb kaheksast eksonist, esimene ekson on valku mittekodeeriv ja translatsioon algab teisest eksonist (Ensembl 2017).

1.3.1 Mutatsioonid *WFS1* geenis

Mutatsioonid *WFS1* valgu kodeerivas geenis põhjustavad kliinilisi komplikatsioone ning raskemal juhul Wolframi sündroomi. Ühes ulatuslikumas uuringus analüüsiti 412 *WS*-i patsiendi andmeid alates 1998. aastast, et välja selgitada *WFS1* mutatsioonide roll *WS*-i väljakujunemisel. *WFS1* geenis leiti 178 võimalikku mutatsiooni, mis esinesid 337-l patsiendil 412-st. Need mutatsioonid on jaotunud ühtlaselt üle kogu valgu, mitte ainult kaheksandasse eksonisse, nagu varem arvatud (Inoue *et al.*, 1998, Strom *et al.*, 1998). Mutatsioonide heterogeensus raskendab genotüübi-fenotüübi korrelatsioonide loomist. Küll aga jagati andmete paremaks visualiseerimiseks esinevad mutatsioonid kolme gruppi ning leiti, et 5,62%-l patsientidest esines esimest tüüpi mutatsioon, mis viis *WFS1* valgu vähenemisele *nonsense*'i vahendatud mRNA lagundamise tõttu, sh on *nonsense*'i ja raaminihke mutatsioonid, mis loovad stoppkoodoni enne kaheksandat eksonit. 55,61%-l patsientidest kirjeldati teist tüüpi mutatsiooni esinemist, mis viib täieliku *WFS1* valgu degradatsioonini, jättes alles vaid funktsionaalse dregoni, mis on mittevoltunud *WFS1* valgu degradatsiooni sihtmärk ning asub 671–700 aminohappe vahel (Guo *et al.*, 2011). Kolmandat tüüpi mutatsiooni kandmist kirjeldati 38,20%-l patsientidest, see mutatsioon põhjustas defektse või lühema *WFS1* valgu ekspressiooni. Siia gruppi kuuluvad *nonsense*'i mutatsioonid, mis lisavad stoppkoodoni pärast kaheksandat eksonit ja enne p.Trp700; raaminihke mutatsioonid, mis lisavad stoppkoodoni pärast kaheksandat eksonit, ning *missense*'i mutatsioonid aminohapetes vahemikus 671–700 (de Heredia *et al.*, 2013). Kokkuvõtvalt põhjustavad mutatsioonid *WFS1* geenis vähenenud või puuduliku *WFS1* valgu funktsiooni, mis viib *WS*-i kujunemiseni (Rigoli *et al.*, 2011).

1.3.2 *WFS1* ekspressioon ja funktsioon

WFS1 valk ekspresseerub paljudes kudedes, kus inimestel on kõrge ekspressioon – südames, pankreases, ajus, kopsus ja platsentas (Inoue *et al.*, 1998). Kesknärvisüsteemis on näidatud kõrget *WFS1* ekspressiooni roti amügdalas, hipokampuse CA1 alas, haistesibulates ja piriform-korteksi pindmises kihis (Luuk *et al.*, 2008, Luuk *et al.*, 2009). Samuti on kirjeldatud kõrget *WFS1* ekspressiooni hiire aju ventraalses striatumis, hüpotalamuses, prefrontaalkorteksis ning pea kõigis ajutüve sensoortes ja motoorsetes tuumades, sh mediaalses ja lateraalses vestibulaartuumas, retikulaarses formatsioonis ja auditoorses rajas: oliivtuumades, *inferior colliculus*'es ning auditoorses korteksis (Luuk *et al.*, 2008).

Rakusiseselt paikneb WFS1 valk endoplasmaatilise retiikulumi (ER) membraanis. WFS1 valgul on oluline osa ER-i normaalsel funktsioneerimisel ja kaltsiumi regulatsioonis (Takeda *et al.*, 2001, Takei *et al.*, 2006). Kuna ER on põhiline kaltsiumi ionide hoiustamise koht rakus, siis häired ER-is põhjustavad ka häireid kaltsiumi homöostaasis (Koch, 1990). ER-il on palju ülesandeid, kuhu alla kuuluvad posttranslatsioonilised modifikatsioonid, värskelt sünteesitud valkude voltimine ning kokkupakkimine. On näidatud, et WFS1 valgu puudumine põhjustab häireid ER-i funktsioneerimisel, mis võib viia valesi volditud valkude kuhjumiseni ning seeläbi ER-i stressi tekkeni. ER-i stress on omakorda hoiatussignaal, mis aktiveerib mittevoltunud valkude vastuse (UPR) (Fonseca *et al.*, 2010). UPR-i põhieesmärk on taastada ER-i funktsioneerimine, vähendades valkude hulka, mida on vaja voltida ja protsessida ER-i luumenis. Mitmel ensüümil ja transkriptsioonifaktoril on oluline roll UPR-i protsessis, neist võib välja tuua kolm põhilist: kaheaheelaline RNA aktiveeritud proteiin – kinaasi-sarnane ER-i kinaas (PERK), aktiveeriv transkriptsioonifaktor 6 (ATF6) ja inositol-sõltuv ensüüm (IRE1). Füsioloogilises olekus on PERK, ATF6 ja IRE1 aktiivsus supresseeritud, kuna nad on seotud glükoosi reguleeritud valguga 78 (GRP78). ER-i stressi korral mittevoltunud valgud akumulerevad ER-i luumenis, mis põhjustab GRP78 dissotseerumise PERK-lt, ATF6-lt ja IRE1-lt. GRP78 dissotseerumine PERK-lt ja IRE1-lt põhjustab nende aktiveerumist, oligomeriseerumist ja autofosforüleerimist. Pärast aktiveerimist PERK fosforüleerib eukarüootse initsiatsiooni faktor 2 alfa ($eIF2\alpha$) alamühiku, mille tulemusel lülitatakse välja üldine valkude süntees. Sealjuures muutub IRE1 endonukleasiks, mis lõikab *Xbp1* mRNA kodeerivast järjestusest 26 alust välja. Splaissitud *Xbp1* mRNA transleeritakse uueks 54 kDa suuruseks XBP1 valguks, mis translokeerub seejärel tuuma ja funktsioneerib kui transkriptsioonifaktor, mis on valkude voltumise ja protsessimisega seotud geenide spetsiifiline. Pärast GRP78 dissotseerumist ATF6-lt translokeerub ATF6 Golgi kompleksi, kus proteaasid ta poolitavad. Pärast poolitamist muutub ATF6 transkriptsioonifaktor aktiivseks, suundub tuuma ning indutseerib ER-i stressi vastusega seotud geenide ekspressiooni, sh *GRP78*, *CHOP* ja *XBPI*. UPR-i aktivatsioon on oluline ER-i stressiga toimetulekuks. Kui aga ER-i stress on liiga intensiivne ning pikaajaline, siis indutseeritakse apoptoos. UPR-i on leitud ka aju eri patoloogiate, nagu isheemia, ning degeneratiivsete haiguste – Alzheimeri, Parkinsoni, Huntingtoni tõve – korral, kus ER-i funktsioneerimise häire võib kulmineeruda neuronalse rakusurmaga (Harding *et al.*, 1999, Shen *et al.*, 2001, Yoshida *et al.*, 2001, Paschen ja Mengesdorf, 2005). Lisaks on näidatud, et *Wfs1* geeni puudulikkus viib neuronites ER-i stressi kaskaadini, mis häirib IP3 retseptori funktsiooni ning viib seeläbi kaltsiumi homöostaasi muutuseni (Caglinec *et al.*, 2016). Kokkuvõtvalt on kirjanduses näidatud degeneratiivsete

haiguste korral ER-i stressist tingitud neurodegeneratsiooni, kuid selle lõplikud tekkemehhanismid on siiani selgusetud.

Lisaks ER-ile on WFS1 valku leitud ka pankrease beeta-rakkude sekretoorsetes graanulites, kus WFS1 valgu puudumine põhjustas graanulite hapestumise häireid (Hatanaka *et al.*, 2011). Graanulid hapestatakse vakuoolse prootonpumba abil (V-H-ATPase) (Barg *et al.*, 2001, Schoonderwoert ja Martens, 2001). Sekretoorsete graanulite madal pH on oluline proinsuliini protsessimiseks ning. See leid võib osaliselt seletada, miks WFS1-puudulikel hiirtel on glükoosi indutseeritud insuliini sekretsioon pankrease beeta-rakkudes häiritud (Barg *et al.*, 2001).

WFS1 valgu funktsioon on siiani teadmata, küll aga arvatakse, et WFS1 võib olla kanal/transporter või selle funktsionaalne regulaator (Osman *et al.*, 2003). On otsitud WFS1 valguga interakteeruvaid molekulaarseid partnereid ning leitud, et WFS1 valk seondub Na/K ATPaasi $\beta 1$ alamühikuga. Arvatakse, et selline interaktsiooni häirumine põhjustab WS-i patoloogiat, kuna pankrease beeta-rakkudes langeb Na pumba $\alpha 1$ ja $\beta 1$ alaühiku ekspressiooni tase (Zatyka *et al.*, 2015). Veel on näidatud, et WFS1 on kalmoduliiniga (CaM) seonduv valk, CaM võimaldab kaltsiumi vahendatud signaali ülekannet (Xia ja Storm, 2005). WFS1 valgul on oluline roll ka sarko(end)plasmaatilise retiikulumi kaltsiumi ATPaasi (SERCA) ekspressioonis, olles SERCA negatiivne regulaator (Zatyka *et al.*, 2015). Lisaks on näidatud, et WFS1 valk on ka transkriptsiooni faktori 6α (ATF6) negatiivne regulaator ubiquitiini-proteasoomi raja kaudu (Fonseca *et al.*, 2010). WS-i korral rakusurmani viiv põhiline molekulaarne sündmus on ER-ist kaltsiumi lekkimine tsütosooli ja järgnev kaltsiumist-sõltuv proteaas kalpaliin 2 aktivatsioon (Lu *et al.*, 2014).

WS-i kliiniline pilt võib sarnaneda ka mitokondriaalsete haiguste sümptomitega, nagu kurtus, optiline atroofia ja psühhiaatrilised häired. Lisaks on WS-ist enim mõjutatud kudedel ja organitel suur metaboolne vajadus ja enamik kliinilistest nähtudest võib olla põhjustatud energia metabolismi defektist, mis annab alust hüpoteesile, et WS-i võib põhjustada mitokondriaalne funktsioonihäire (Kanki ja Klionsky, 2009). Nii on näidatud WFS1-puudulikes neuronites ulatuslikke muutusi mitokondri dünaamikas, mille tõttu toodetakse vähem ATP-d ning see omakorda inhibeerib neuronite arengut (Cagalinec *et al.*, 2016).

1.4 Loomudelid WS-i uurimiseks

Selleks, et paremini mõista WFS1 valgu rolli WS-i kujunemisel, on sõltumatud uurimisgruppid loonud neli WFS1-puuduliku hiireliini.

Esimese WFS1-puuduliku hiiremudeli lõi Ishihara töögrupp 2004. aastal. Nende hiiremudelil on *Wfs1* geeni teine ekson täielikult deleteeritud, mis viis glükoosi stimuleeritud insuliini sekretsiooni vähenemisele ja suurendas beeta-rakkude kadu tulenevalt apoptoosist ja ER-i stressist (Ishihara *et al.*, 2004). Sama hiireliini on kasutatud ka käitumiskatsete läbiviimiseks, milles leiti, et homosügootsetel WFS1-puudulikel hiirtel esines vähesem sotsiaalne interaktsioon (Kato *et al.*, 2008).

Teine mudel loodi 2005. aastal California Ülikoolis. See mudel on konditsionaalne pankreasespetsiifiline *Wfs1* kaheksanda eksoni *knock-out*-hiireliin, kellel on kirjeldatud neljakuuselt avalduvat progressiivset glükoositalumatust, insuliinipuudulikkust ning teist tüüpi suhkurdiabeediga sarnanevaid sümptomeid. Lisaks kirjeldati pankrease beeta-rakkude massi vähenemist, mis tulenes suurenenud apoptoosist ja ER-i stressist (Riggs *et al.*, 2005).

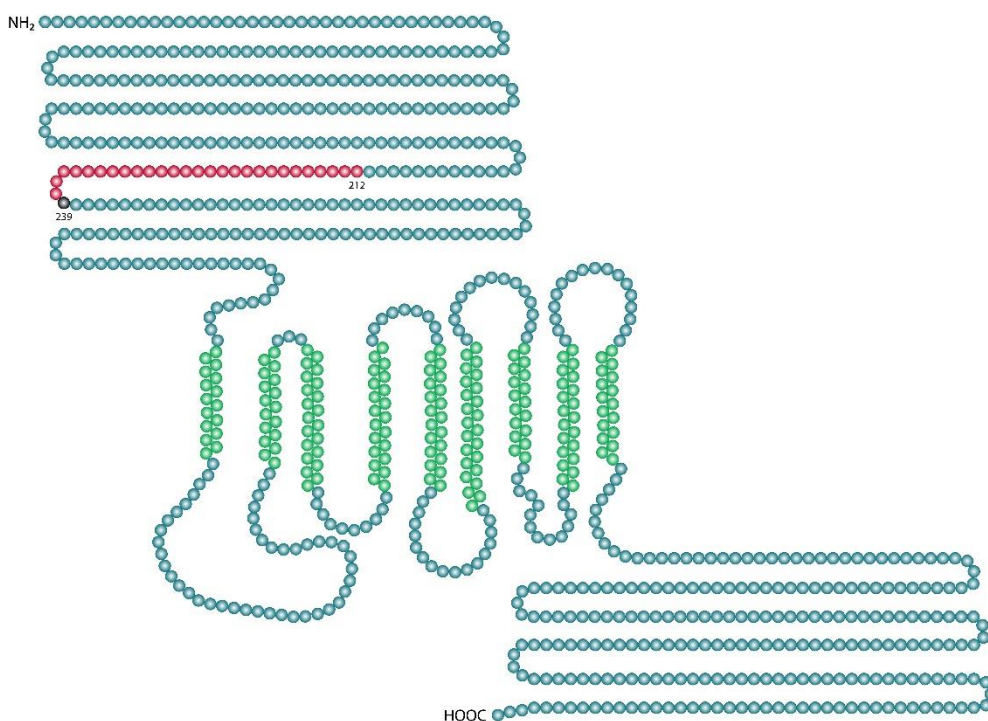
Kolmas WFS1-puudulik hiiremudel loodi Tartu Ülikoolis 2005. aastal. Hiire *Wfs1* geeni kaheksas ekson asendati *in-frame*-NLSLacZNeo kassetiga, mille tulemusena deleteerusid WFS1 valgu aminohapped vahemikus 360–890 (Luuk *et al.*, 2008). Seda hiireliini on kasutatud ajus *Wfs1* geeni detailse ekspressiooni kirjeldamiseks ning käitumiskatseteks. Transgeensetel hiirtel on kirjeldatud glükoositalumatust, madalamat insuliinitaset ning lisaks kaalusid transgeensed hiired oluliselt vähem kui metsiktüüpi (Noormets *et al.*, 2011, Terasmaa *et al.*, 2011).

Neljanda mudeli lõi Urano töögrupp (Lu *et al.*, 2014). Tegemist on ainukese kirjeldatud ajuspetsiifilise WFS1-puuduliku hiiremudeliga. On leitud, et WFS1-puudulikel hiirtel oli kalpaliini aktivatsiooni tase kõrgem võrreldes metsiktüüpi hiirtega, kalpaliini aktivatsiooni on seotud tsütosooli kaltsiumi taseme reguleerimisega (Lu *et al.*, 2014).

Kõikidel eri laborites loodud *Wfs1* mutantsetel hiirtel on näidatud glükoositalumatust ja häiritud insuliini sekretsiooni, kuid täielikku beeta-rakkude hävinemist ja paastujärgset hüperglükeemiat pole eelnevatel loomudelitel kirjeldatud. Nähtavasti kujunevad transgeensetel hiirtel diabeet ja teised WS-i sümptomid vaid osaliselt välja. Hiired ei pruugi

olla alati parimad mudelloomad haiguse modelleerimiseks, kuna neil on piiratud veremaht ning moodsad kuvamistehnikad on tundlikumad suuremates loomades. Seetõttu oli meie uurimisgrupi eesmärk luua ja karakteriseerida *Wfs1* transgeenne rott, kes oleks sobiv WS-i uurimiseks.

Meie uurimisgrupp lõi tsinksõrmede tehnoloogiat kasutades kokku kolm *Wfs1* mutantset rotiliini. Lähtudes genoomsest järjestusest, esines kahel liinil (*Wfs1*-ex5-KO232 ja *Wfs1*-ex5-KO266) *Wfs1* geeni viienda eksoni deletsioon ning kolmandal liinil (*Wfs1*-ex5-INS244) esines *Wfs1* geeni viiendas eksonis asendus. Edaspidiseid uuringuid jätkati *Wfs1*-ex5-KO232 liini rottidega, kelle *Wfs1* geeni viienda eksoni järjestuses oli 27 aminohapet vahemikus 212 kuni 238 deleteeritud ning positsioonis 239 oli toimunud seriini asendusalaniiniga (joonis 2).



Joonis 2. WFS1 valgu hüpoteetiline struktuur, kus on kujutatud *Wfs1*-ex5-KO232 deletsiooni paiknemine. On näidatud 890 aminohappest koosneva WFS1 valgu *Wfs1*-ex5-KO232 deletsiooni paiknemine vahemikus 212 kuni 238 (punane) ning positsioonis 239 toimunud seriini asendusalaniiniga (must), lisaks on näidatud ennustatud transmembraanseid segmente (roheline). Modifitseeritud Hardy *et al.*, 1990 põhjal.

Meie uurimisgrupi avaldamata tulemused näitavad, et 3-kuuselt tekib *Wfs1*-ex5-KO232 rotil glükoositalumatus ning see süveneb vanusega. Umbes 10-kuuselt kujuneb *Wfs1*-ex5-KO232 rotil välja glükosuuria ja keskmiselt 12-kuuselt polüuuria ning suhkurdiabeet koos paastujärgse hüperglükeemiaga ja lisaks kaasneb arenguga kaalulangus. Alates 2. kuust väheneb mutantsete

rottide Langerhansi saarte pindala, millega kaasneb glükoosi stimuleeritud insuliini sekretsiooni vähenemine. 7-kuuste *Wfs1-ex5-KO232* rottide pankrease beeta-rakkudes esineb suurenenud ER-i stress. 15-kuustel *Wfs1-ex5-KO232* rottidel avalduvad reetina gliosis ja optilise närvi atroofia, lisaks näitas elektronmikroskoopia sama vanade loomade optilise närvi müeliini deorganiseerimist. Tegemist on esimese kirjeldatud *Wfs1* transgeense rotiga, kellel esinevad WS-i põhisümptomid ning seetõttu on võimalik sel transgeensel loomal uurida nii WS-i kui ka sellega kaasnevaid häireid (Plaas *et al.*, 2017).

2 EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Uurimistöö eesmärgid

Senised loomudelitel läbiviidud WS-i uuringud on peamiselt keskendunud endokrinoloogiliste häirete kirjeldamisele ning seetõttu on WS-iga kaasnevad neuroloogilised patoloogiad jäänud *in vivo* mudelites ilma suurema tähelepanuta. Seega on töö eesmärk iseloomustada *Wfs1-ex5-KO232* roti võimalikku neurodegeneratsiooni, kasutades MRT, immunohistoloogiat ja geeniekspressiooni meetodeid.

Uurimistöö eesmärgid:

1. Kasutades *in vivo* magnetresonantstomograafiat (MRT), mõõta 8-kuuste isaste ning 15-kuuste isaste ja emaste *Wfs1-ex5-KO232* rottide ning WT-pesakonnakaaslaste piklikaju ja ekstraparenhümaalse ala ruumala.
2. Kasutades immunohistoloogilist analüüsi, uurida WFS1 valgu lokalisatsiooni ajutüves.
3. Uurida võimaliku WFS1 ekspressiooni muutust vanusespetsiifiliselt *Wfs1-ex5-KO232* rottide ajutüves võrreldes WT-pesakonnakaaslastega.
4. Kasutades immunohistoloogilist analüüsi, uurida, millistes piklikaju rakkudes WFS1 paikneb.
5. Määrata kvantitatiivse reaalaaja-PCR-iga piklikaju neuronalse markeri mRNA ekspressioon.
6. Määrata kvantitatiivse reaalaaja-PCR-iga ER-i stressi markerite võimalik mRNA ekspressioon piklikaju oliivtuumades.

2.2 Materjal ja meetodika

2.2.1 Katseloomad

Aretus ja genotüpiseerimine viidi läbi Tartu Ülikooli Katseloomakeskuses. Selleks tööks kasutati Sprague-Dawley' (CrI: CD(SD) rats CD® IGS, Charles River Laboratories) nii isaseid kui emaseid homosügootsed WFS1-puudulikke rotte (*Wfs1-ex5-KO232*) ($n = 50$) ja kontrolliks metsiktüüpi (WT) pesakonnakaaslasi ($n = 43$). Rotte hoiti puurides kolme-nelja kaupa 12 h hele/pime tsükli, valge tsükkel algas kell 7.00 hommikul. Rottidel oli piiramatult ligipääs toidule ja veele, v.a katse ajal. Toiduks kasutati Sniffi universaalset hiire ja roti sööta (Sniff cat# V1534) ning pöördosmoosiga puhastatud vett. Katsed viidi läbi ajavahemikus 9.00–17.00. Kõik läbiviidud katsed tehti Eesti Vabariigi Põllumajandusministeeriumi välja antud loa alusel (nr. 54, välja antud 23. veebruaril 2015), mis on vastavuses Euroopa Parlamendi ja Euroopa Nõukogu 2010/63/EL-i direktiiviga.

2.3 Immunohistokeemia

Rotid anesteseeriti ketamiini (100 mg/kg) ja deksmedetomidini (20 mg/kg) intraperitonaalse süstiga ning seejärel perfuseeriti esmalt fosfaatpuhverdatud soolalahuses (PBS, Naxo) ning seejärel 4%-lise paraformaldehüüdiga (PFA, Sigma Aldrich) 0,1 M PBS-is. Anesteesia ja perfusiooni viis läbi A. Terasmaa, kes on kvalifitseeritud loomkatseid läbi viima. Aju dissekteeriti ja seejärel fikseeriti samas fiksaatoris üleöö 4 °C juures. Külmutuslõikude valmistamiseks krüoprotekteeriti ajusid üleöö 30%-lise sahharoos/0,1 M PBS lahuses kuni põhjavajumiseni ning seejärel säilitati kuni edasiste tööstlusteni külmutatult –80 °C juures. Piklikajud lõigati krüomikrotoomiga (Microm HM-560) –20 °C juures 40 µm paksusteks lõikudeks ning seejärel pesti ujuvlõigud 10 min PBS-is. Ajulõigud permeabiliseeriti 0,2% Triton-X100 (Naxo)/PBS-i lahuses 40 min. Selleks, et ei toimuks mittespetsiifilist antikeha sidumist, blokeeriti lõike tund aega blokeerimislahusega (5% eesli seerum/1% veise seerumi albumiin (BSA, Sigma Aldrich)/PBS). Primaarsed ja sekundaarsed antikehad lahjendati 0,1% Tween-20 (Sigma Aldrich)/1% BSA/PBS lahuses. Primaarse antikeha inkubatsioon viidi läbi 1 h toatemperatuuril loksutil ning seejärel 12 h +4 °C juures loksutil. Teisel päeval inkubeeriti lõike vastava sekundaarse antikehaga toatemperatuuril 2 h, sellele järgnes 1 h pesu PBS-is, misjärel DNA visualiseerimiseks lisati DAPI-t (4, 6-diamidino-2-fenüülindool, Sigma Aldrich) 1 : 2000 lahjenduses 0,1% Tween-20/PBS-is 15 min ja hiljem pesti PBS-is. Lõigud koguti alusklaasile (Superfrost Polysine Slides, Thermo Scientific) ja sulundati Vectrashieldi

sulundusvedelikus (Vector Laboratories Inc). Koelõikude pildistamiseks kasutati mikroskoopi Olympus BX51 ja kaamerat Olympus DP71. Pilte töödeldi arvutiprogrammiga Adobe Photoshop CS6 (Adobe Systems Incorporated).

Primaarse antikeha lahjendused olid küüliku anti-WFS1 (1 : 400, osakonnasisene, antikeha tootmine kirjeldatud Luuk *et al.*, 2008), kitse anti-WFS1 (1 : 200, Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-47936, RRID:AB_2216169) ja kitse anti-FOXP2 (1 : 400, Everest Biotech, Cat# EB05226, Lot # 160409).

Sekundaarsete antikehade lahjendused olid FITC AffiniPure kitse anti-küülik (1 : 2000, Jackson ImmunoResearch Lab., 711-095-152, RRID:AB_2315776). Rhodamine Red-X-AffiniPure küüliku anti-kitse (1 : 2000, Jackson ImmunoResearch Labs Cat# 305-297-003, RRID:AB_2339496).

Histoloogilisteks analüüsideks kasutati magnetresonantskuvamiseks 8-kuuseid (n = 3 WT, n = 3 KO), 13-kuuseid (n = 1 WT) ja 15-kuuseid (n = 6 WT, n = 6 KO) isaseid, kokku 19 looma.

2.4 *In vivo* magnetresonantstomograafia

Rotid anesteseeriti isofluraaniga (1,5–2,5% isofluraani 1,5l/min meditsiinilises hapnikus) ja hoiti soojendatud loomapadjal kogu magnetresonantsi (MR) protseduuri vältel. Kõik skaneeringud viidi läbi 9,4 T Bruker BioSpec 94/24 USR-i süsteemiga, mis oli ühendatud 1H tsirkulaarse polariseeritud transiivermähise ja ParaVision 6.0.1® tarkvaraga (Bruker BioSpin Group, Bruker Corporations, Germany). Hingamissagedust ja temperatuuri jälgiti, kasutades vastavalt hingamispatja ja rektaalsondi (SA Instruments Inc., Stony Brook, USA). Hingamissagedus hoiti vahemikus 35–70 hingamist minutis. Enne lõplikku skaneeringut viidi läbi kaks eri orientatsioonis pilootskaneeringut, et panna paika looma asend ja tuvastada anatoomilised pidepunktid. Lõplik T2-kaalutud Turbo RARE sekvents viidi läbi järgnevate parameetritega: kordusaeg (ingl *repetition time*, TR) 6803 ms, kaja aeg (ingl *echo time*, TE) 33 ms, pöördnurk (ingl *flip angle*) 90 kraadi, keskmiste arv 5, kuvamismaatriks 320 x 320 x 65, ruumiline resolutsioon 0,16 x 0,16 x 0,5 mm.

Ruumalad segmenteeris manuaalselt genotüüpide suhtes pimestatud vaateleja, kasutades ITK-SNAP tarkvara (V3.6.0) (Yushkevich *et al.*, 2006). Piklikaju jaoks algas segmenteerimine peale

inferior colliculus't ning lõppes väikeaju lõpus, umbes bregma tasemel –9,48 kuni –15,48 mm (Paxinos ja Watson, 2014).

Magnetresonantskuvamiseks kasutati 8-kuuseid (n = 6 WT, n = 6 KO) ja 15-kuuseid (n = 6 WT, n = 7 KO) isaseid ning 15-kuuseid emaseid (n = 5 WT, n = 10 KO), kokku segmenteeriti 40 looma aju.

2.5 Kvantitatiivne reaalaaja PCR

Katseloomad surmati dekapiteerimise teel, ajud dissekteeriti, eemaldati piklikaju, mis külmutati kohe vedelas lämmastikus ja hoiti kuni edasiste analüüsideni –80 °C juures. RNA eraldamiseks kasutati Trizol® Reagenti (Invitrogen, USA) vastavalt tootja protokollile ning saadud RNA kontsentratsioon mõõdeti spektrofotomeetriga Nanodrop ND1000. Seejärel lagundati genoomne DNA RNA lahusest, kasutades DNase I (Thermo Scientific DNase I) vastavalt tootja protokollile. cDNA sünteesimiseks kasutati heksameerseid oligonukleotiide ja SuperScript™ III pöördrankriptaasi (Invitrogen, USA) vastavalt tootja protokollile. 10 µl reaktsiooni kohta võeti 1 µl (50 µg/ml) heksameerset praimerit (Applied Biosystems) ja 1 µl 10 mM dNTP segu (Thermo Scientific, #RO186). Kvantitatiivse reaalaaja PCR-i tegemiseks kasutati QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR-i süsteemi masinat (PE Applied Biosystems, USA) ja QuantStudio 12K Flex v1.2.2 tarkvara. Kasutatud praimerite/sondide järjestused on toodud tabelis 1. Kontroll-geenina kasutati hüpoksantiin-guaaniin fosforibosüültransferaasi (*Hprt*), mida on näidatud kui kõige efektiivsemalt ja stabiilsemalt ekspresseeruvat geeni (Raud *et al.*, 2009). Kõik reaktsioonid tehti kolmes korduses. Kõikide reaktsioonide lõppmaht oli 10 µl, kasutades 0,5 µg cDNA-d. Ekspressiooni analüüsimiseks kasutati $2^{-\Delta\Delta CT}$ meetodit (Livak ja Schmittgen, 2001).

Geeniekspressiooni analüüsideks kasutati 3-kuuseid (n = 8 WT, n = 8 KO) ja 6-kuuseid (n = 8 WT, n = 10 KO) isaseid loomi, kokku 34 looma.

Tabel 1. RT-PCR-i reaktsioonis kasutatud Taqmani praimer/sondid

Geen	Assay ID	Tootja
<i>Grp78</i>	Taqman Assay Rn00565250_m1	Thermo Fisher Scientific
<i>Chop</i>	Taqman Assay Rn00492098_g1	Thermo Fisher Scientific
<i>Hprt1</i>	Taqman Assay Rn01527840_m1	Thermo Fisher Scientific
<i>Foxp2</i>	Taqman Assay Rn01456150_m1	Thermo Fisher Scientific

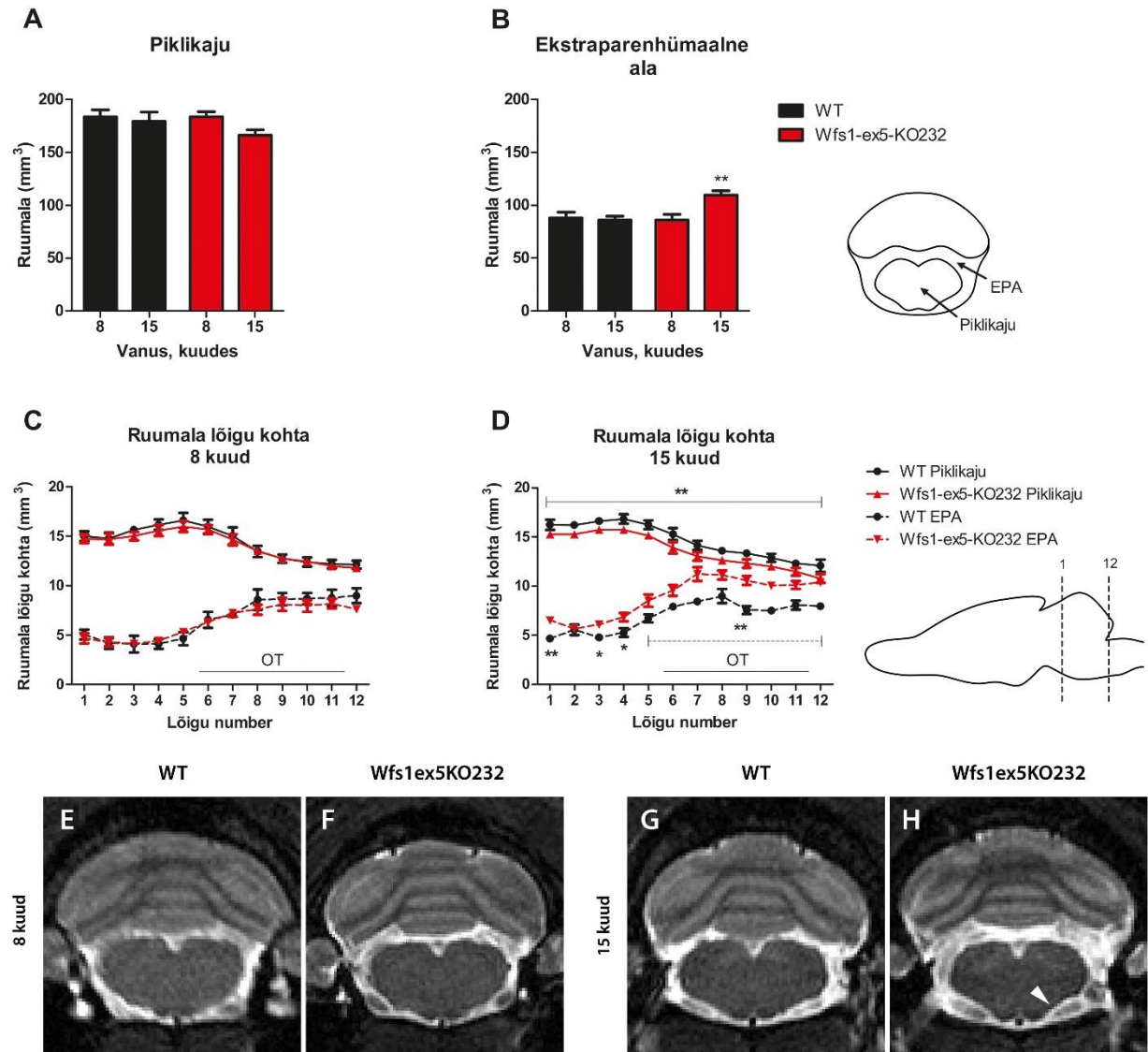
2.6 Andmete analüüs

Selle töö andmed on esitatud kujul keskmine \pm SEM ja on võrreldud kahesuunalise dispersioonanalüüsiga (ingl *analysis of variance*, ANOVA), kasutades vastavalt olukorrale korratud või täiesti randomeeritud ANOVA-t. Järgnesid Fisheri LSD *post-hoc*-testid. Graafikute loomiseks kasutati GraphPad Prismi versioon 5 tarkvara (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA.). p -väärtus $< 0,05$ loeti statistiliselt oluliseks.

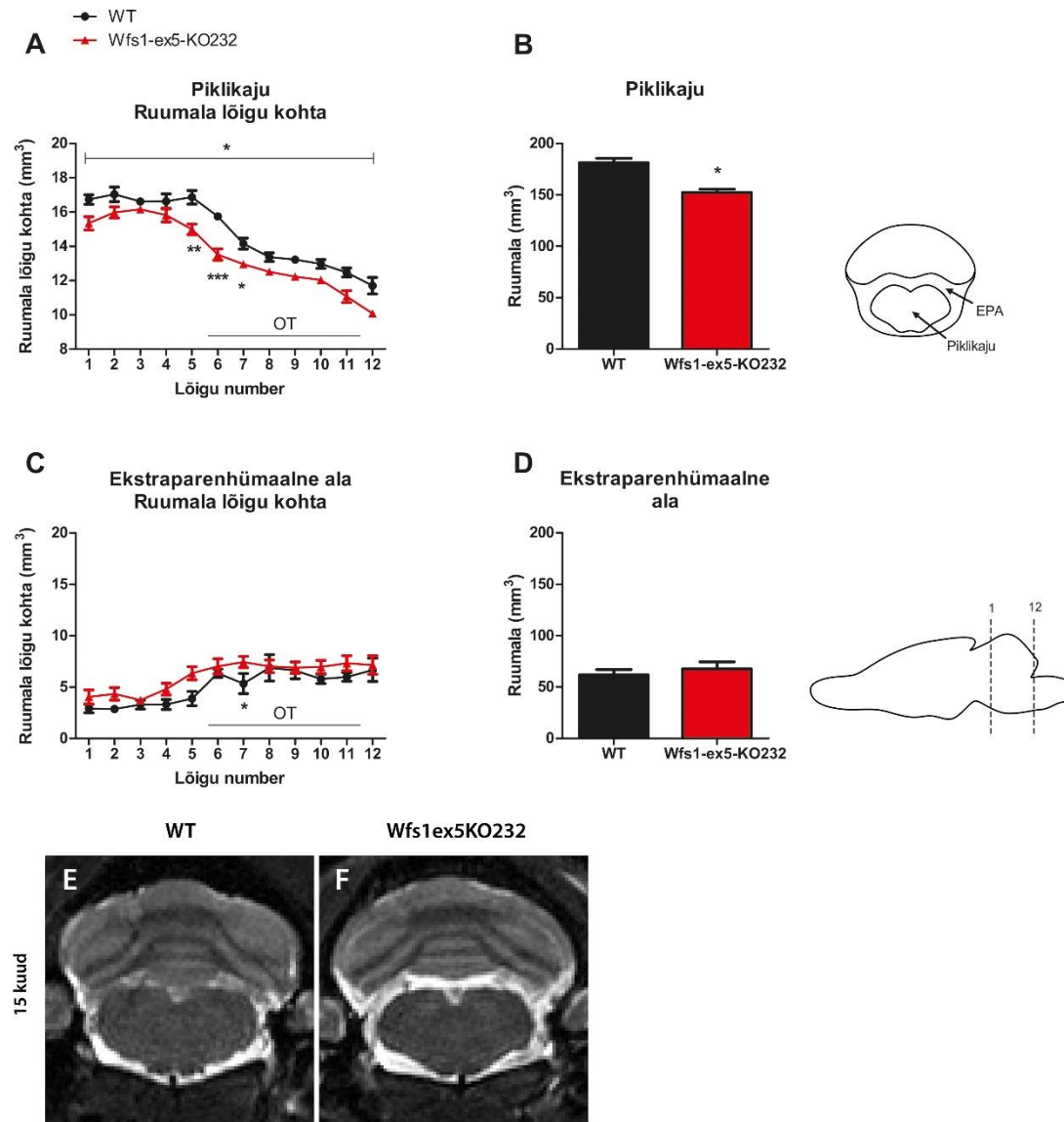
2.7 Tulemused

2.7.1 Piklikaju ruumala on vähenenud *Wfs1-ex5-KO232* rottil

8-kuuste isaste *in vivo* magnetresonantstomograafia (MRT) kvantitatiivne analüüs näitas, et *Wfs1-ex5-KO232* rottide ja WT-pesakonnakaaslaste vahel ei esinenud uuritavas vanuses erinevusi. 15-kuuste isaste MR-kuvamise kvantitatiivne analüüs näitas, et piklikaju koguruumala oli *Wfs1-ex5-KO232* rottidel vähenenud, kuigi see ei jõudnud statistilise erinevuseni (joonis 3 A). ($F(1, 143) = 4,08, p = 0,0684, ns$ (genotüüp)). Läbiviidud Fisheri LSD *post-hoc*-test näitas aga, et piklikaju ruumala lõigu kohta on väiksem 15 kuustel *Wfs1-ex5-KO232* rottidel, võrreldes WT-loomadega (joonis 3 D). Lisaks oli 15-kuustel *Wfs1-ex5-KO232* rottidel ekstraparenhümaalse ala (EPA) ruumala piklikaju ümber suurenenud, võrreldes WT-loomadega (joonis 3 B) ($F(1, 21) = 5,57, p < 0,05$ (genotüüp); $F(1, 21) = 5,4, p < 0,05$ (vanus); $F(1, 21) = 8,003, p < 0,01$ (genotüüp \times vanus)). Lisaks oli ka 15-kuustel isastel *Wfs1-ex5-KO232* rottidel ekstraparenhümaalse ala ruumala lõigu kohta vähenenud, võrreldes WT-loomadega (joonis 3 D) ($F(1, 143) = 29,76, p < 0,001$ (genotüüp); $F(11, 143) = 32,035, p < 0,0001$ (lõik); $F(11, 143) = 2,305, p < 0,05$ (genotüüp \times lõik)). MR-kuvamise kvantitatiivne analüüs näitas, et 15-kuuste emaste piklikaju koguruumala oli *Wfs1-ex5-KO232* rottidel vähenenud (joonis 4 B). ($F(1, 6) = 8,888, p < 0,05$ (genotüüp)). Fisheri LSD *post-hoc*-test näitas lisaks, et piklikaju ruumala lõigu kohta on väiksem *Wfs1-ex5-KO232* rottidel, võrreldes WT-loomadega (joonis 4 A). *In vivo* MRT kvantitatiivne analüüs näitas 15-kuustel *Wfs1-ex5-KO232* emas- ja isasloomadel kõige intensiivsemat piklikaju ruumala vähenemist ja ekstraparenhümaalse ala ruumala suurenemist just oliivtuumade tasandis (bregma $-12,00$ kuni $-14,76$ mm) (joonis 3 C ja D, joonis 4 A ja C). Et paremini visualiseerida toimunud muutusi, on nii 8- ja 15-kuustel isasloomadel kui ka 15-kuustel emasloomadel MRT kujutis võetud just seitsmendalt lõigult (joonis 3 E-H, joonis 4 E ja F), mis on oliivtuumade alguspunkt (bregma $-12,00$ mm). 8-kuustel isasloomadel ei esinenud 7. lõigul visuaalseid erinevusi genotüüpide vahel (joonis 3 E ja F). 15-kuustel isasloomadel on kujutiselt näha silmnähtav erinevus *Wfs1-ex5-KO232* ja WT-pesakonnakaaslaste vahel (joonis 3 G ja H). Sarnane on olukord ka 15-kuuste emasloomadega, kelle piklikaju seitsmendal lõigul on ruumala lõigu kohta nähtavalt vähenenud ning ekstraparenhümaalse ala ruumala lõigu kohta suurenenud (joonis 4 A, C ja F).



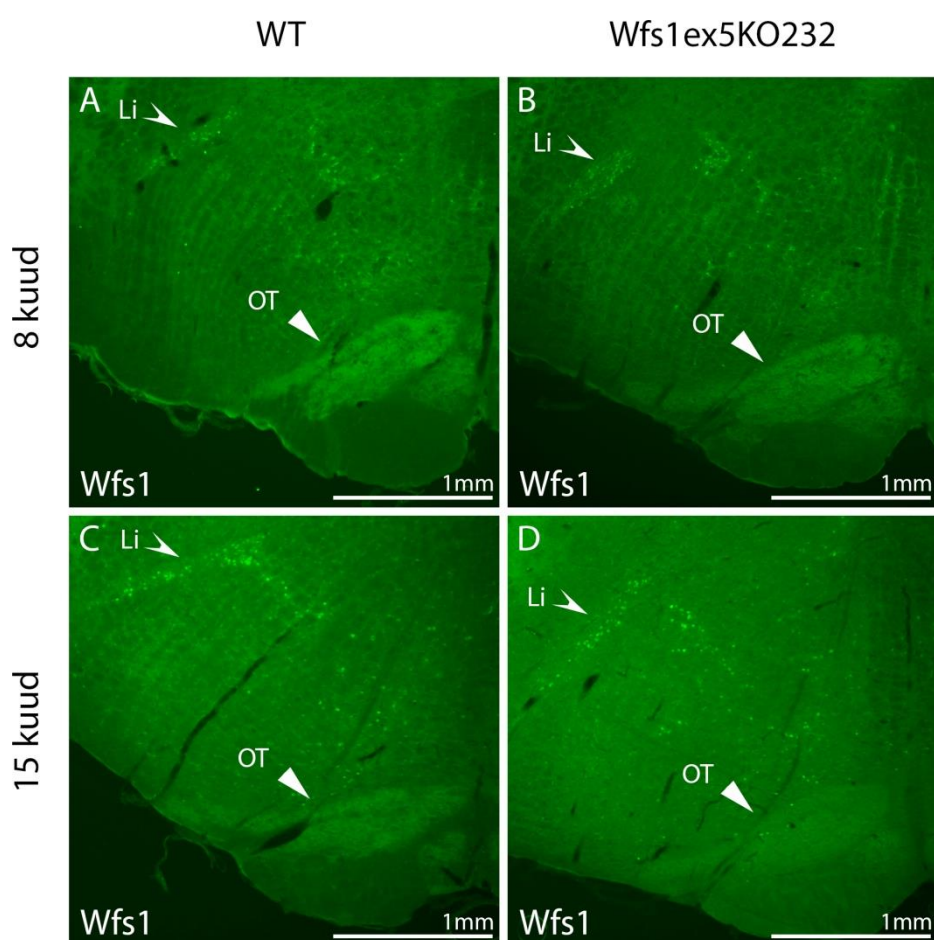
Joonis 3. Isasloomade kvantitatiivne piklikaju MR-kuvamise analüüs. Piklikaju segmenteeris manuaalselt T2 kujutistelt genotüüpide suhtes pimestatud vaateleja, kasutades ITK-SNAP-i tarkvara. Struktuuride ruumalad on mõõdetud lõigu kohta bregma vahemikus umbes $-9,48$ kuni $-15,48$. Piklikaju kogu ruumala (A), ekstraparenhümaalse ala ruumala (B). Piklikaju ruumala lõigu kohta 8-kuustel (C) ja 15-kuustel (D) rottidel. Alumine pidevjoon näitab oliivtuumade lokaliseerimise ventraalses piklikajus (OT, bregma $-12,00$ kuni $-14,76$ mm). Isaste WT- ja *Wfs1-ex5-KO232* rottide T2 kaalutud MR kuvandid 7. lõigul (bregma $-12,63$ mm) (E-H). 8-kuustel pole olulisi muutusi piklikajus (E, F), seevastu 15-kuustel *Wfs1-ex5-KO232* rottidel on piklikaju ruumala väiksem, ventraalne pind (valge noolepea) rohkem nõgus ning EPA on ümber piklikaju suurenenud, võrreldes WT loomadega (G, H). Andmeid võrreldi, kasutades kahe-suunalist ANOVA-t, millele järgnes Fisheri LSD test, * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ genotüüpide vahel. Andmed on esitatud keskmise \pm SEM, kasutati 8-kuuseid ($n = 6$ WT, $n = 6$ KO) ja 15-kuuseid ($n = 6$ WT, $n = 7$ KO) isaseid.



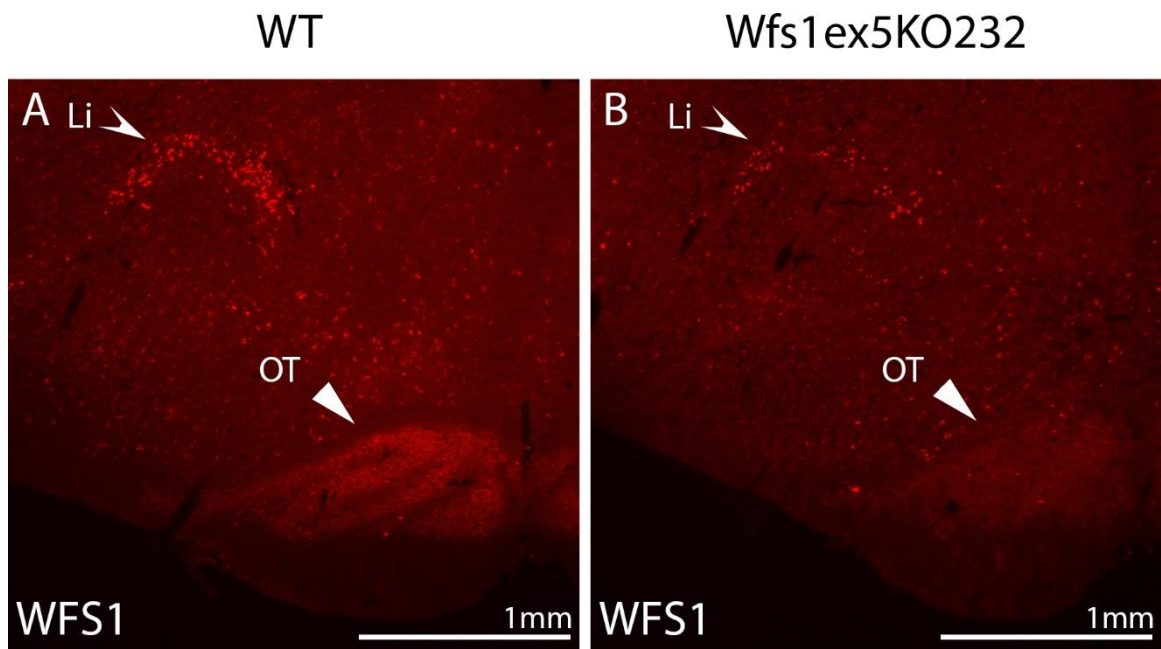
Joonis 4. 15-kuuste emasloomade kvantitatiivne piklikaju MR-kuvamise analüüs. Piklikaju segmenteeris manuaalselt T2 kujutistelt genotüüpide suhtes pimestatud vaatleja, kasutades ITK-SNAP-i tarkvara. Struktuuride ruumalad on mõõdetud lõigu kohta bregma vahemikus $-9,48$ kuni $-15,48$. Piklikaju ruumala lõigu kohta (**A**), piklikaju kogu ruumala (**B**), ekstraparenhümaalse ala (EPA) ruumala lõigu kohta (**C**), ekstraparenhümaalse ala ruumala (**D**). Alumine pidevjoon näitab oliivtuumade lokaliseerimist ventraalses piklikajus (OT, bregma $-12,00$ kuni $-14,76$ mm). Emaste WT- ja *Wfs1-ex5-KO232* rottide T2 kaalutud magnetresonantskuvandid (**E**, **F**). MR-kujutised on võetud oliivtuumade tasemelt (umbes bregma $-12,63$ mm). 15-kuustel *Wfs1-ex5-KO232* on piklikaju ruumala väiksem ja ekstraparenhümaalne ala on suurenenud ümber piklikaju, võrreldes metsiktüüpi loomadega. Andmeid võrreldi, kasutades kahe-suunalist ANOVA-t, millele järgnes Fisheri LSD test, * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ genotüüpide vahel. Andmed on esitatud keskmise \pm SEM ($n = 5$ WT, $n = 10$ KO).

2.7.2 WFS1 valk on ekspresseeritud ajutüves

Piklikaju immunohistoloogiline analüüs näitas WFS1 valgu lokalisatsiooni nii 8-kuuste kui 15-kuuste rottide aju lineaartuumas ja oliivtuumades. 8-kuustel *Wfs1*-ex5-KO232 rottidel oli *Wfs1* värvingu intensiivsus madalam kui WT-pesakonnakaaslastel (joonis 7 A), samuti oli 15-kuustel *Wfs1*-ex5-KO232 rottidel WFS1 värvingu intensiivsus madalam kui WT-pesakonnakaaslastel, sealjuures 15-kuustel loomadel oli genotüüpide vaheline erinevus suurem kui 8-kuustel (joonis 7 C ja D; joonis 8 A ja B). Immunohistoloogia reaktsioon viidi kõikide vanuse- ja genotüübigruppidega läbi paralleelselt samades tingimustes, samuti on pildistamiseks kasutatud sama resolutsiooni ja säriaega.



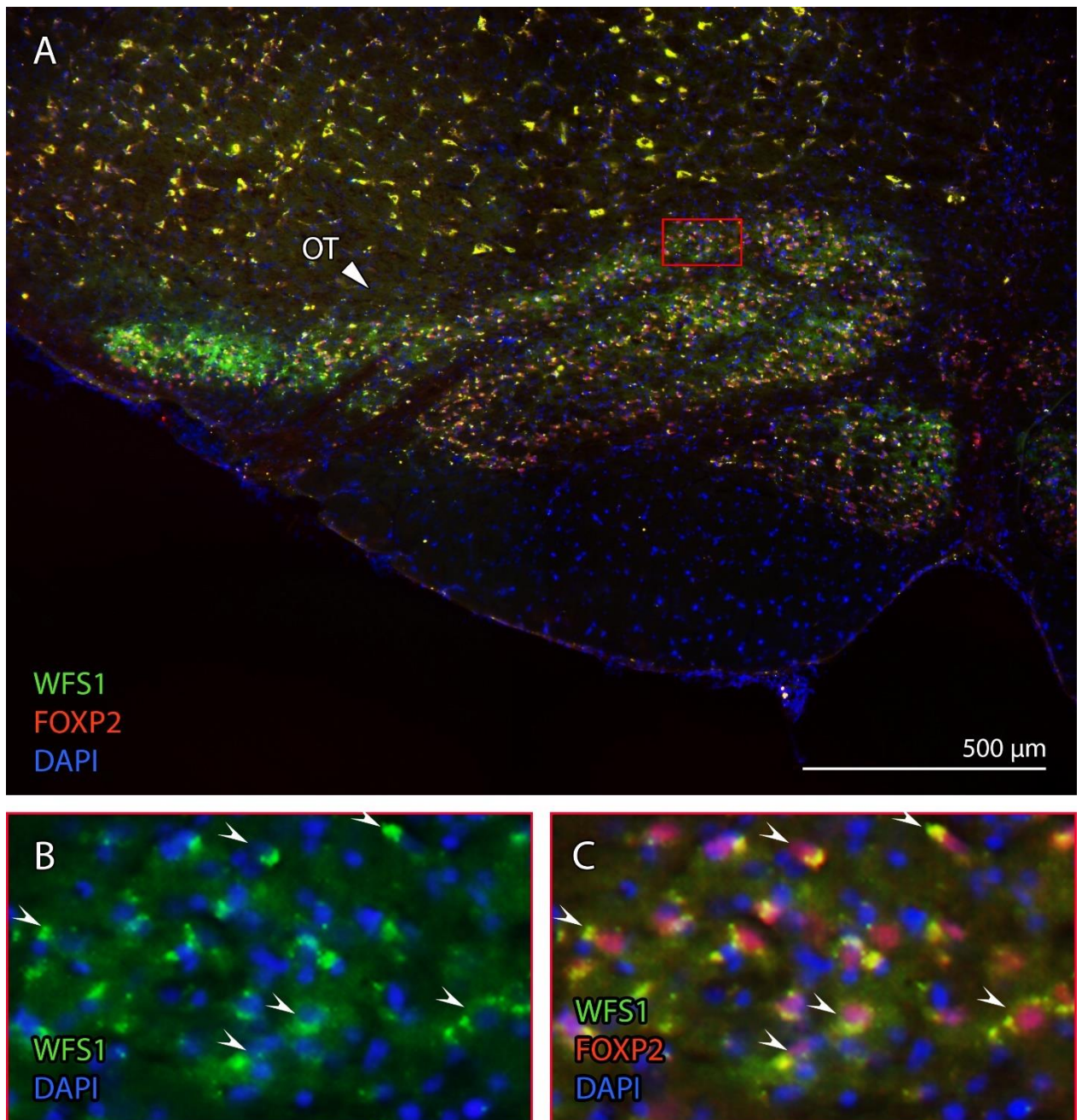
Joonis 7. WFS1 valgu lokalisatsioon 8- ja 15-kuuste isaste rottide piklikajus. Piklikaju koronaallõigud oliivtuumade tasemel (bregma -12,60), mis on värvitud küüliku anti-WFS1 antikehaga. WFS1 paikneb peamiselt lineaartuumas (Li) ja oliivtuumades (OT) (A-D). WFS1 värvingus ei esinenud 8 kuustel genotüübivahelisi erinevusi (A, B) WFS1 värving on vähem intensiivne 15-kuustel *Wfs1*-ex5-KO232 rottidel (D) võrreldes WT-ga (C).



Joonis 8. **WFS1 valgu lokalisatsioon 15-kuuste isaste rottide piklikajus.** Piklikaju koronaallõigud oliivtuumade tasemel (bregma $-12,60$), mis on värvitud kitse anti-WFS1 antikehaga. WFS1 paikneb peamiselt lineaartuumas (Li) ja oliivtuumades (OT) (**A, B**). WFS1 värving on vähem intensiivne 15-kuustel *Wfs1*-ex5-KO232 rottidel (**B**) võrreldes WT-ga (**A**).

2.7.3 WFS1 valk on ekspresseeritud oliivtuumade neuronites

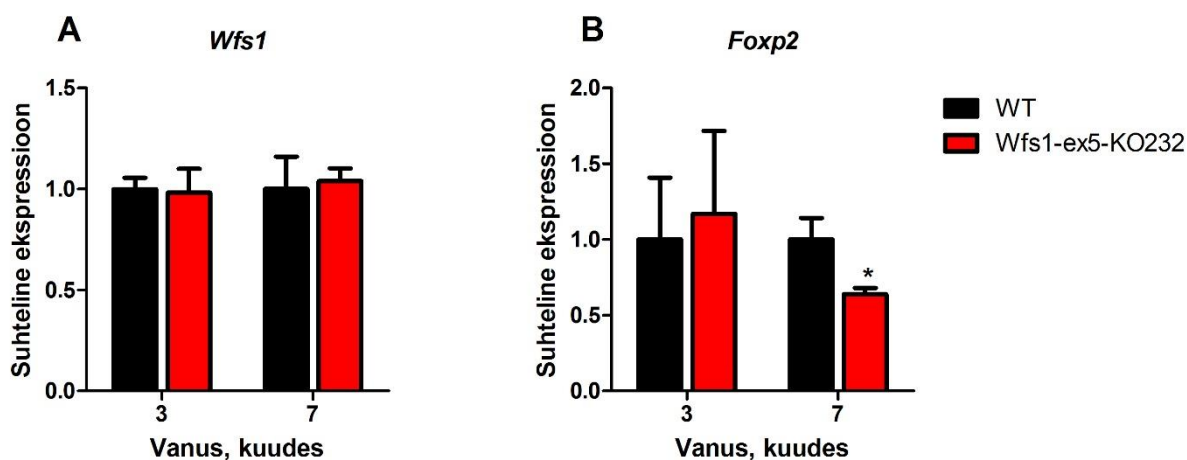
Selleks, et välja selgitada, millistes oliivtuumade rakkudes on WFS1 ekspresseeritud, viidi läbi FOXP2 värving. Oliivtuumade immunohistoloogiline analüüs näitas WFS1 lokalisatsiooni FOXP2 positiivsetes neuronites (joonis 9). See on esmakordne, kui näidatakse WFS1 ja FOXP2 koekspressiooni oliivtuumades.



Joonis 9. **WFS1 ja FOXP2 lokalisatsioon 13-kuuse isase roti piklikaju oliivtuumades.** Piklikaju koronaallõigud oliivtuumade tasemel (bregma $-12,60$), mis on värvitud küüliku anti-WFS1 antikehaga ning kitse anti-FOXP2 antikehaga ning DNA värving DAPI-ga (A-C). WFS1 ja FOXP2 värving on oliivtuuma spetsiifiline (A). Suurendatud pilt paneelil A nädatud punasest ristkülikust erinevate filtritega (B, C). WFS1 paiknemine oliivtuumade rakkude tsütosoolis, kus WFS1 on roheline ja DAPI sinine (B). WFS1 (roheline) paikneb eranditult FOXP2 (punane) positiivsetes oliivtuumade (OT) neuronites, nooltega on viidatud vaid mõnele neuronile, et vältida segadust (C).

2.7.4 *Wfs1* ja *Foxp2* mRNA ekspressioon ventraalses piklikajus

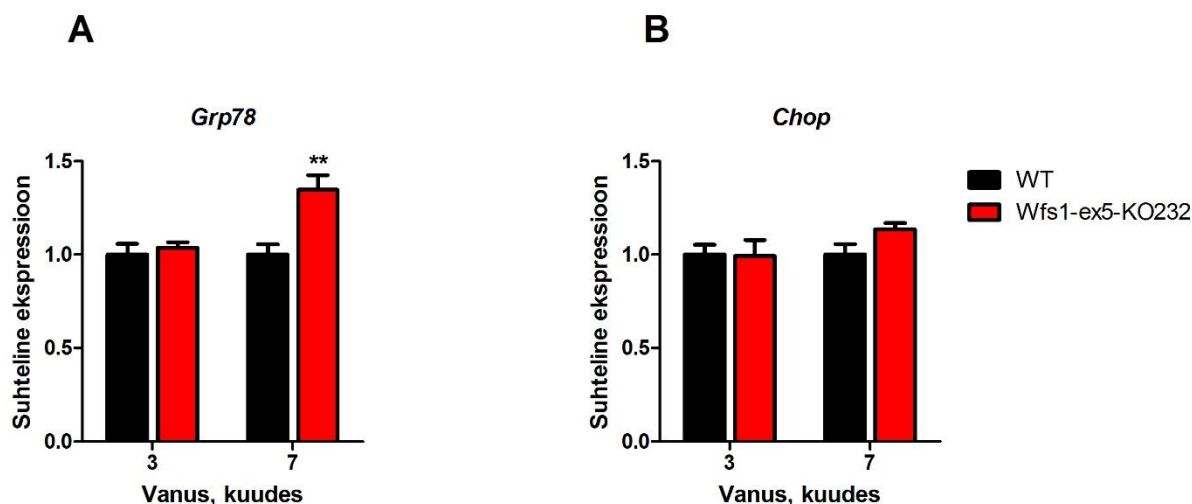
Selleks, et kvantifitseerida 3- ja 6-kuuste *Wfs1*-ex5-KO232 rottide *Wfs1* ja *Foxp2* mRNA ekspressiooni ventraalses piklikajus, viidi läbi kvantitatiivne reaalaaja PCR piklikaju oliivtuumades. Tulemustest selgus, et 3-kuuste *Wfs1*-ex5-KO232 rottide *Foxp2* mRNA tase ei erinenud WT-loomade omast ($F(1, 7) = 0,08$, $p = 0,791$, ns (genotüüp)) (joonis 10 B), kuid 6-kuuste *Wfs1*-ex5-KO232 rottidel oli *Foxp2* ekspressioonitase vähenenud ($F(1, 7) = 6,07$, $p < 0,05$ (genotüüp)) (joonis 10 B). Seevastu *Wfs1* ekspressioon jäi ajas muutumatuks (joonis 10 A).



Joonis 10. *Wfs1* ja *Foxp2* mRNA ekspressioon 3- ja 6-kuuste *Wfs1*-ex5-KO232 ja WT-rottide ventraalses piklikajus. *Wfs1* ekspressioon ei erinenud genotüüpide vahel 3-kuustel ja 6-kuustel rottidel (A). 3-kuustel rottidel ei esinenud genotüübivahelisi erinevusi, kuid 6-kuustel *Wfs1*-ex5-KO232 rottidel oli *Foxp2* ekspressioonitase vähenenud (B). Andmeid võrreldi, kasutades kahe-suunalist ANOVA-t, millele järgnes Fisheri LSD test, * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ genotüüpide vahel. Andmed on esitatud keskmine \pm SEM, $n = 8$ kuni 10 grupi kohta.

2.7.5 Ventraalses piklikajus esineb ER-i stress

Selleks, et näha, kas *Wfs1*-ex5-KO232 rottide piklikaju neurodegeneratsioon võib olla põhjustatud neuronaaalsest ER-i stressist, viidi läbi kvantitatiivne reaalaja PCR ER-i stressi markerite *Chop*-i ja *Grp78*-ga. Tulemustest selgus, et 3-kuustel rottidel ei esinenud genotüübivahelisi erinevusi *Chop* ($F(1, 6) = 0,02, p = 0,882$ (genotüüp)), *Grp78* ($F(1, 7) = 0,589, p = 0,589$ (genotüüp)) (joonis 11 A ja B). 6-kuustel *Wfs1*-ex5-KO232 rottidel on *Grp78* ekspressiooni tase tõusnud, võrreldes WT-loomadega ($F(1, 7) = 22,55, p < 0,01$ (genotüüp)) (joonis 11A). Samuti on *Chop*i ekspressiooni tase tõusnud, kuid pole statistiliselt oluline ($F(1, 7) = 2,27, p = 0,175, ns$ (genotüüp)) (joonis 11 B). Tulemused näitavad, et *Wfs1*-ex5-KO232 rottidel on piklikaju ventraalses osas paiknevates neuronites tekkinud 6. elukuuks ER-i stress.



Joonis 11. ER-i stressi markerite *Chop*i ja *Grp78* mRNA ekspressioon 3- ja 6-kuuste *Wfs1*-ex5-KO232 ja WT-rottide ventraalses piklikajus. 3-kuustel rottidel ei esinenud genotüübivahelisi erinevusi, kuid 6-kuustel *Wfs1*-ex5-KO232 rottidel oli *Grp78* ekspressioonitase tõusnud (A). *Chop*i ekspressioon ei erinenud genotüüpide ja vanuse vahel (B). Andmeid võrreldi, kasutades kahesuunalist ANOVA-t, millele järgnes Fisheri LSD test, * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ genotüüpide vahel. Andmed on esitatud keskmine \pm SEM, $n = 8$ kuni 10 grupi kohta.

ARUTELU

Töö eesmärk oli kirjeldada WFS1-puuduliku roti võimalikku neurodegeneratsiooni piklikajus. Töös kasutati esmakordselt *Wfs1-ex5-KO232* rottidel *in vivo* MRT uuringut ning tulemuste kvantitatiivne analüüs näitas 15-kuustel *Wfs1-ex5-KO232* emas- ja isasloomadel kõige intensiivsemat piklikaju ruumala vähenemist ja ekstraparenhümaalse ala ruumala suurenemist just oliivtuumade tasandis, võrreldes WT-loomadega (bregma –12,00 kuni –14,76 mm) (joonis 3 C ja D, joonis 4 A ja C), mida võib seostada antud piirkonna neurodegeneratsiooniga. 15-kuuste isaste piklikaju koguruumala oli *Wfs1-ex5-KO232* rottidel vähenenud, ekstraparenhümaalse ala (EPA) ruumala piklikaju ümber oli suurenenud (joonis 3 A ja B) ning ventraalne piklikaju rohkem nõgus (joonis 3 H) võrreldes WT-loomadega. Sarnaselt isasloomadega oli ka 15-kuuste emaste piklikaju koguruumala *Wfs1-ex5-KO232* rottidel vähenenud (joonis 4 B). Isas- ja emasloomade neurodegeneratsioon näib olevat üldjoontes sarnane. Töö tulemused kattuvad läbiviidud inimuuringutega, kus WS-i patsientidel on aju MR-kuvamisega näidatud ajutüves piklikaju ja ajusilla, väikeaju ja optilise närvi ruumala vähenemist. Sealjuures polnud ka uuritud patsientidel soost tingitud erinevusi (Hardy *et al.*, 1999, Hilson *et al.*, 2009, Hershey *et al.*, 2012, Lugar *et al.*, 2016). Lisaks on mitme WS-i patsiendi *post mortem*'i makroskoopilise uuringuga näidatud ulatuslikku nii optilise närvi, kiasmi ja trakti kui ka piklikaju, ajusilla ning väikeaju atroofiat (Barrett *et al.*, 1997, Hilson *et al.*, 2009). Sellest võib järeldada, et kliinilistes uuringutes leitud WS-i patsientidel esinevad muutused kattuvad siinses töös uuritud *Wfs1-ex5-KO232* rottide tulemustega. Lisaks inimuuringutele on ka *Wfs1* KO-hiire *ex vivo* MR-kuvamisega näidatud, et ka *Wfs1* KO-hiirtel esineb ajutüve ruumala vähenemine (Caglinec *et al.*, 2016). See kattub *Wfs1-ex5-KO232* rottide uuringu tulemusega, kuid siinse töö uudsus seisneb selles, et kasutati esmakordselt *in vivo* MR-kuvamist, mis on loomudelil neurodegeneratsiooni hindamiseks mitteinvasiivne meetod. *In vivo* uuring võimaldab mõõtmisi korduvalt läbi viia ning vähendab loomade arvu katses. Ajutüve degeneratsioonist põhjustatud piklikaju ruumala vähenemine võib põhjustada rottidel hingamiskeskuse aktiivsuse langemist. See võib olla põhjus, miks vanemad *Wfs1-ex5-KO232* rotid vajasisid MR-kuvamise ajal väiksemas kontsentratsioonis isofluraani normaalse hingamissageduse säilitamiseks. Samuti võib piklikaju degeneratsioon põhjustada neelamisrefleksi kadu, mis võib seletada asjaolu, et paljud vanemad *Wfs1-ex5-KO232* rotid vajasisid hammaste lõikamist, kuid WT-loomad ei esinenud sarnast nähtust. WS-i patsientidel on kirjeldatud düsfaagiat (Zmyslowska *et al.*, 2014, Urano, 2016) ning hammaste lõikamise vajadus võib rottidel olla sarnase probleemi indikaator. Ajutüve funktsionaalsus on nii rotil kui

ka inimesel häiritud ning kindlasti tuleks läbi viia edasisi uuringuid, et hinnata ajutüve funktsiooni *Wfs1-ex5-KO232* rottidel.

Selleks, et täpsemalt uurida WFS1 lokalisatsiooni piklikajus, viidi läbi *Wfs1-ex5-KO232* ja WT-loomade ajutüve immunohistoloogiline analüüs, millest selgus, et WFS1 on lokaliseeritud piklikaju lineaartuumas ja oliivtuumades (joonis 7 ja 8). Lisaks võis näha nõrka WFS1 värvingu intensiivsuse langust ja 15-kuustel *Wfs1-ex5-KO232* rottidel, võrreldes WT-loomadega. Antikeha reaktsiooni võib pidada spetsiifiliseks, kuna nii küüliku anti-WFS1 antikeha värving (joonis 7) kui ka kitse anti-WFS1 antikeha värving (joonis 8) näitavad sama ekspresioonimustrit. WFS1 lokalisatsioon roti oliivtuumades on sarnane varem kirjeldatud WFS1 ekspresioonimustriga hiire piklikajus, kus hiirtel näidati WFS1 ekspresiooni pea kõigis ajutüve sensorsetes ja mootorsetes tuumades, sh mediaalses ja lateraalses vestibulaartuumas, retikulaarses formatsioonis ning oliivtuumades (Luuk *et al.*, 2008). Rottide immunohistoloogilise uuringu tulemusena leiti, et *Wfs1-ex5-KO232* rottide piklikaju oliivtuumade tasandil esineb arvatavasti WFS1 positiivsete rakkude kadu, millest omakorda võib olla tingitud ka piklikaju ruumala vähenemine *Wfs1-ex5-KO232* rottidel. Neuronite kadu ja gliooosi on näidatud ka WS-i patsiendi *post mortem*'i uuringus mediaalses vestibulaartuumas, piklikaju retikulaarses formatsioonis, ventraalses ajusillas ja oliivtuumades.

Selgitamaks välja, millistes oliivtuumade rakkudes WFS1 paikneb, viidi töös läbi WFS1 ja FOXP2 immunohistoloogia koekspressiooni analüüs ning selgus, et WFS1 näib olevat ekspresseeritud eranditult FOXP2 positiivsetes neuronites (joonis 9). Esmakordselt kirjeldati WFS1 paiknemist oliivtuumade neuronites ning täpsemalt FOXP2 positiivsetes neuronites, seega saab FOXP2 kasutada neurodegeneratsiooni molekulaarse markerina uuritava roti loomudelisel ja võib-olla ka laialdasemalt.

On laialdaselt näidatud, et WFS1-puudulikkus põhjustab pankrease beeta-rakkudes ER-i stressi ja hilisemat rakusurma, kuid vähem on uuritud WFS1-puudulikkusest tingitud ER-i stressi tekkimist neuronites (Fonseca *et al.*, 2005, Fonseca *et al.*, 2010, Caglinec *et al.*, 2016). Töö eesmärk oli uurida piklikaju neurodegeneratsiooni võimalikke tagamaid ning selleks kasutati kvantitatiivset reaalaja PCR-i, et vaadata ER-i stressi markerite *Chop1* ja *Grp78* ekspresiooni 3- ja 6-kuuste *Wfs1-ex5-KO232* ning WT-rottide ventraalses piklikajus. Läbiviidud katsete tulemused näitasid, et 3-kuustel rottidel ei esinenud genotüübivahelisi erinevusi (joonis 11 A ja B). 6-kuustel *Wfs1-ex5-KO232* rottidel on *Grp78* ekspresiooni tase tõusnud (joonis 11 A),

võrreldes WT-loomadega, lisaks on ka *Chopi* ekspressiooni tase tõusnud, kuid muutus polnud statistiliselt oluline (joonis 11 B). Tulemused näitavad, et *Wfs1-ex5-KO232* rottidel on tekkinud 6. elukuuks oliivtuumade rakkudes ER-i stress. Samuti on eelnevalt kirjanduses näidatud ATF6, ATF4 ja XBP1 tõusust tingitud ER-i stressi tekkimist neuronaaalses rakukultuuris tulenevalt WFS1-puudulikkusest (Caglinec *et al.*, 2016). ER-i stressist põhjustatud apoptoosist võib tuleneda neuronite kadu oliivtuumades, mis võib selgitada ka FOXP2 ekspressioonitaseme langust 6-kuustel loomadel. Tulemused kinnitavad, et sarnaselt pankrease beeta rakkudele on ka neuronites suurenenud ER stress WS-ga kaasneva rakusurma põhjuseks.

Võrdlemaks kvantitatiivselt 3- ja 6-kuuste *Wfs1-ex5-KO232* ja WT-loomade *Foxp2* mRNA ekspressioonitaset, viidi läbi kvantitatiivne reaalaaja PCR ventraalses piklikajus ning selgus, et 3-kuuste *Wfs1-ex5-KO232* rottide *Foxp2* mRNA tase ei erinenud WT-loomade omast, kuid 6-kuustel *Wfs1-ex5-KO232* rottidel oli *Foxp2* ekspressioonitase vähenenud (joonis 10 B). *Foxp2* ekspressiooni vähenemine võib olla tingitud FOXP2 positiivsete neuronite degeneratsioonist või vastusena ER stressile on selle geeni ekspressioon vähenenud nendes rakkudes. Kuna *Wfs1* ekspressiooni tase ei ole muutunud ja ER-i stressi tase on suurenenud, võib ka teine variant olla tõene. Seega on vaja täiendavat uuringut, et välja selgitada *Wfs1* mutantsete loomade vananemisega kaasnevaid muutusi FOXP2 positiivsetes neuronites. FOXP2 positiivsete neuronite kadu võib põhjustada *Wfs1-ex5-KO232* rottidel nii motoorika kui ka vokaalse kommunikatsiooni häireid, mis vajavad kindlasti edaspidiseid uuringuid.

Töös leiti MRT immunohistoloogia ja geeniekspressiooni analüüsi kasutades, et *Wfs1-ex5-KO232* rottidel esineb piklikaju ruumala vähenemine, millele eelneb ER-i stressi tõus selles aju piirkonnas. Saadud töö tulemused on mitmeti unikaalsed ning põhijoontes kattuvad WS-i patsientide kirjeldatud sümptomitega. Seetõttu loovad töö tulemused aluse edaspidisteks neurodegeneratsiooni uuringuteks WS-roti mudelis. See võimaldab paremini mõista neurodegeneratsiooni mehhanisme nii WS-i kui ka teiste neurodegeneratiivsete haiguste korral ning välja töötada ravimeetodeid.

KOKKUVÕTE

Selle töö eesmärk oli kirjeldada WFS1-puudulikkusega roti piklikaju neurodegeneratsiooni.

Töös kasutati esmakordselt *Wfs1-ex5-KO232* rottidel *in vivo* MRT uuringut ning tulemuste kvantitatiivne analüüs näitas 15-kuustel *Wfs1-ex5-KO232* emas- ja isasloomadel piklikaju ruumala vähenemist ja ekstraparenhümaalse ala ruumala suurenemist oliivtuumade tasandil. Seda võib põhjuslikult seostada antud piirkonna neurodegeneratsiooniga. Töö tulemused kattuvad WS-i patsientidel kirjeldatud piklikaju atroofiaga. Sellest võib järeldada, et ajutüve neurodegeneratsiooni muster näib olevat *Wfs1-ex5-KO232* rottidel ja WS-i patsientidel sarnane.

Piklikaju degeneratsiooni molekulaarsel tasemel hindamiseks läbi viidud immunohistoloogiline analüüs näitas WFS1 ekspressiooni piklikaju lineaartuumas ja oliivtuumades, seejuures võis näha nõrka WFS1 värvingu intensiivsuse langust 15-kuustel *Wfs1-ex5-KO232* rottidel, võrreldes WT-loomadega. WFS1 lokalisatsioon roti oliivtuumades on sarnane varem kirjeldatud WFS1 ekspressiooniga hiire piklikaju oliivtuumades. Varasemlt on kirjeldatud oliivtuumade neuronite kadu ja gliosis WS-i patsiendil, mis näitab, et oliivtuumade degeneratsioon kaasneb WS-ga.

Järgnevas immunohistoloogilises uuringus selgus, et oliivtuumades ekspresseerub WFS1 eranditult FOXP2 positiivsetes neuronites. See on esmakordne, kui kirjeldatakse WFS1 ja FOXP2 kolokalisatsiooni oliivtuumade neuronites ning töö tulemusena järeldati, et FOXP2 võib olla potentsiaalseks WS-ga seotud neurodegeneratsiooni molekulaarseks markeriks piklikaju oliivtuumades.

Edasine ER-i stressi markerite mRNA tasemel uuring näitas ajast sõltuvat ER-i stressi tekkimist *Wfs1-ex5-KO232* rottide ventraalses piklikajus, täpsemalt oli 6-kuustel rottidel *Grp78* tase tõusnud, võrreldes WT loomadega. Ajutüves tekkivat ER-i stressi pole eelnevalt WS loomudel näidatud. ER stressi tõus eelneb ajutüve neurodegeneratsioonile, mis kinnitab, et suurenenud ER stress on WS-ga kaasneva rakusurma põhjuseks.

3- ja 6-kuuste WT- ja *Wfs1-ex5-KO232* loomade *Wfs1* ning *Foxp2* mRNA kvantitatiivne analüüs näitas ajast sõltuvat genotüübivahelist muutust *Foxp2* ekspressioonis. Nimelt esines 6-kuustel *Wfs1-ex5-KO232* loomadel *Foxp2* ekspressioonitaseme langus, sealjuures jäi *Wfs1*

ekspressioon ajas muutumatuks. *Foxp2* langus võib olla vastus tekkinud ER-i stressile või alternatiivselt olla indikaator FOXP2 positiivsete neuronite kaole.

Vaatamata ulatuslikele uuringutele ei ole WS-ile seniajani ravi leitud. Praegu piirdub ravi diabeedi sümptomite kontrollimisega, kuid kahjuks ei peata see neurodegeneratiivseid protsesse, mis tekitavad patsientidele enim komplikatsioone. Töö tulemused loovad aluse edaspidisteks neurodegeneratsiooni uuringuteks WS-i roti mudelis, mis on vajalikud uute ravistrateegiate väljatöötamiseks. Lisaks on edaspidistes uuringutes oluline võimalike biomarkerite leidmine WS-i varajaseks diagnoosimiseks ja ravimi toime efektiivsuse hindamiseks.

Töö põhitulemused:

1. 15-kuustel *Wfs1-ex5-KO232* emas- ja isasloomadel on piklikaju ruumala vähenenud ja ekstraparenhümaalse ala ruumala suurenenud oliivtuumade tasandis.
2. WFS1 ekspresseerub piklikaju lineaartuumas ja oliivtuumades.
3. 8- ja 15-kuustel *Wfs1-ex5-KO232* rottidel esineb nõrk WFS1 valgu ekspressiooni intensiivsuse langus.
4. Piklikaju oliivtuumades lokaliseerub WFS1 eranditult FOXP2 positiivsetes neuronites.
5. FOXP2 saab kasutada potentsiaalselt piklikaju oliivtuumade neurodegeneratsiooni molekulaarse markerina.
6. 6. elukuuks on *Wfs1-ex5-KO232* rottidel ventraalses piklikajus välja kujunenud ER-i stress.
7. *Wfs1-ex5-KO232* loomadel esines vanusest sõltuv *Foxp2* ekspressioonitaseme langus.

Characterization of medulla neurodegeneration in *Wfs1* deficient rats

Kadri Seppa

Purpose: Neurodegenerative diseases are multifactorial disorders of the nervous system, affecting about 30 million people worldwide (Sheikh *et al.*, 2013). Wolfram syndrome (WS) is a rare neurodegenerative disorder, which is caused by biallelic mutations of the *WFS1* gene and characterized by diabetes mellitus, diabetes insipidus, optic nerve atrophy, hearing loss and neurodegeneration of the brainstem and many other complications (Barrett *et al.*, 1995, Barrett and Bunday, 1997, Inoue *et al.*, 1998). Currently, there is no cure for WS and death usually occurs by respiratory failure due to brainstem atrophy (Urano, 2016). Since previous studies have mainly focused on investigation of diabetes mellitus, the aim of the present study was to examine neurodegeneration of medulla in *Wfs1* deficient rats.

Methods: This study used *in vivo* magnetic resonance imaging, immunohistochemistry, and gene expression methods to characterize neurodegeneration in 93 rat brains.

Results: T2-weighted *in vivo* MRI analysis at the level of the inferior olive revealed no difference in medulla between male *Wfs1-ex5-KO232* rats and WT littermates at the age of 8 months. At the age of 15 months a decrease in volume of the medulla and an increase in volume of extraparenchymal space was shown in male and female *Wfs1-ex5-KO232* rats compared with wild-type animals, which may be causally associated with neurodegeneration of this region.

Immuno-histological analysis of the brainstem showed WFS1 expression in the linear nucleus and inferior olive within the medulla of the rat. Moreover, WFS1 staining is decreased in the inferior olive of *Wfs1-ex5-KO232* rats at the age of 15 months.

The following immuno-histological analysis of the inferior olive revealed that *Wfs1* is expressed exclusively in all FOXP2 positive neurons. Colocalization of WFS1 and FOXP2 in inferior olive was shown for the first time and it was suggested that FOXP2 can be used as molecular marker of neurodegeneration in this animal model.

Further study at mRNA level demonstrated time-dependent neuronal ER stress in inferior olive of *Wfs1-ex5-KO232* rats. At the age of 6 months ER stress marker *Grp78* showed increased

level compared to WT animals. Brain specific *Grp78*-induced ER Stress was previously not described in WFS1 deficient animal models.

Quantitative analysis of mRNA demonstrated a time-dependent change of *Foxp2* between genotypes, namely, at the age of 6 months *Wfs1*-ex5-KO232 rats showed decreased expression level of *Foxp2* although *Wfs1* expression remained unchanged. Decreased expression of *Foxp2* can be result of ER stress response, or alternatively, serve as an indicator of neuronal loss.

Conclusion: The pattern of neurodegeneration of the medulla appears to be similar in the WFS1 deficient rats and in human WS patients. Therefore, *Wfs1*-ex5-KO232 rats can be a valuable new model to study the molecular mechanism and treatment options for neurodegeneration accompanying Wolfram syndrome. The resulting knowledge could later be applied to improve the quality of life for WS patients.

KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU

- Barg S, Huang P, Eliasson L, Nelson DJ, Obermuller S, Rorsman P, Thevenod F, Renstrom E (2001) Priming of insulin granules for exocytosis by granular Cl(-) uptake and acidification. *J Cell Sci* 114:2145-2154.
- Barrett TG, Bunday SE (1997) Wolfram (DIDMOAD) syndrome. *J Med Genet* 34:838-841.
- Barrett TG, Bunday SE, Fielder AR, Good PA (1997) Optic atrophy in Wolfram (DIDMOAD) syndrome. *Eye (Lond)* 11 (Pt 6):882-888.
- Barrett TG, Bunday SE, Macleod AF (1995) Neurodegeneration and diabetes: UK nationwide study of Wolfram (DIDMOAD) syndrome. *Lancet* 346:1458-1463.
- Cagalinec M, Liiv M, Hodurova Z, Hickey MA, Vaarmann A, Mandel M, Zeb A, Choubey V, Kuum M, Safiulina D, Vasar E, Veksler V, Kaasik A (2016) Role of Mitochondrial Dynamics in Neuronal Development: Mechanism for Wolfram Syndrome. *PLoS Biol* 14:e1002511.
- Campbell P, Reep RL, Stoll ML, Ophir AG, Phelps SM (2009) Conservation and diversity of Foxp2 expression in muroid rodents: functional implications. *J Comp Neurol* 512:84-100.
- de Heredia ML, Cleries R, Nunes V (2013) Genotypic classification of patients with Wolfram syndrome: insights into the natural history of the disease and correlation with phenotype. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* 15:497-506.
- Fonseca SG, Fukuma M, Lipson KL, Nguyen LX, Allen JR, Oka Y, 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* 280:39609-39615.
- Fonseca SG, Ishigaki S, Osowski CM, Lu S, Lipson KL, Ghosh R, Hayashi E, Ishihara H, Oka Y, Permutt MA, Urano F (2010) Wolfram syndrome 1 gene negatively regulates ER stress signaling in rodent and human cells. *J Clin Invest* 120:744-755.
- Fraser FC, Gunn T (1977) Diabetes mellitus, diabetes insipidus, and optic atrophy. An autosomal recessive syndrome? *J Med Genet* 14:190-193.
- Fredette BJ, Adams JC, Mugnaini E (1992) GABAergic neurons in the mammalian inferior olive and ventral medulla detected by glutamate decarboxylase immunocytochemistry. *J Comp Neurol* 321:501-514.
- Fujita H, Sugihara I (2012) FoxP2 expression in the cerebellum and inferior olive: development of the transverse stripe-shaped expression pattern in the mouse cerebellar cortex. *J Comp Neurol* 520:656-677.
- Guo X, Shen S, Song S, He S, Cui Y, Xing G, Wang J, Yin Y, Fan L, He F, Zhang L (2011) The E3 ligase Smurf1 regulates Wolfram syndrome protein stability at the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 286:18037-18047.

- Harding HP, Zhang Y, Ron D (1999) Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 397:271-274.
- Hardy C, Khanim F, Torres R, Scott-Brown M, Seller A, Poulton J, Collier D, Kirk J, Polymeropoulos M, Latif F, Barrett T (1999) Clinical and molecular genetic analysis of 19 Wolfram syndrome kindreds demonstrating a wide spectrum of mutations in WFS1. *Am J Hum Genet* 65:1279-1290.
- Hatanaka M, Tanabe K, Yanai A, Ohta Y, Kondo M, Akiyama M, Shinoda K, Oka Y, Tanizawa Y (2011) Wolfram syndrome 1 gene (WFS1) product localizes to secretory granules and determines granule acidification in pancreatic β -cells. *Hum Mol Genet* 20:1274-1284.
- Hershey T, Lugar HM, Shimony JS, Rutlin J, Koller JM, Perantie DC, Paciorkowski AR, Eisenstein SA, Permutt MA (2012) Early brain vulnerability in Wolfram syndrome. *PLoS ONE* 7:e40604.
- Hilson JB, Merchant SN, Adams JC, Joseph JT (2009) Wolfram syndrome: a clinicopathologic correlation. *Acta Neuropathol* 118:415-428.
- 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, Permutt MA (1998) A gene encoding a transmembrane protein is mutated in patients with diabetes mellitus and optic atrophy (Wolfram syndrome). *Nat Genet* 20:143-148.
- Ishihara H, Takeda S, Tamura A, Takahashi R, Yamaguchi S, Takei D, Yamada T, Inoue H, Soga H, Katagiri H, Tanizawa Y, Oka Y (2004) Disruption of the WFS1 gene in mice causes progressive beta-cell loss and impaired stimulus-secretion coupling in insulin secretion. *Hum Mol Genet* 13:1159-1170.
- Kanki T, Klionsky DJ (2009) Mitochondrial abnormalities drive cell death in Wolfram syndrome 2. *Cell Res* 19:922-923.
- Kato T, Ishiwata M, Yamada K, Kasahara T, Kakiuchi C, Iwamoto K, Kawamura K, Ishihara H, Oka Y (2008) Behavioral and gene expression analyses of Wfs1 knockout mice as a possible animal model of mood disorder. *Neurosci Res* 61:143-158.
- Koch GL (1990) The endoplasmic reticulum and calcium storage. *Bioessays* 12:527-531.
- Lai CS, Gerrelli D, Monaco AP, Fisher SE, Copp AJ (2003) FOXP2 expression during brain development coincides with adult sites of pathology in a severe speech and language disorder. *Brain : a journal of neurology* 126:2455-2462.
- Lu S, Kanekura K, Hara T, Mahadevan J, Spears LD, Osowski CM, Martinez R, Yamazaki-Inoue M, Toyoda M, Neilson A, Blanner P, Brown CM, Semenkovich CF, Marshall BA, Hershey T, Umezawa A, Greer PA, Urano F (2014) A calcium-dependent protease as a potential therapeutic target for Wolfram syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:E5292-5301.

- Lugar HM, Koller JM, Rutlin J, Marshall BA, Kanekura K, Urano F, Bischoff AN, Shimony JS, Hershey T (2016) Neuroimaging evidence of deficient axon myelination in Wolfram syndrome. *Scientific reports* 6:21167.
- Luuk H, Koks S, Plaas M, Hannibal J, Rehfeld JF, Vasar E (2008) Distribution of Wfs1 protein in the central nervous system of the mouse and its relation to clinical symptoms of the Wolfram syndrome. *J Comp Neurol* 509:642-660.
- Luuk H, Plaas M, Raud S, Innos J, Sutt S, Lasner H, Abramov U, Kurrikoff K, Koks S, Vasar E (2009) Wfs1-deficient mice display impaired behavioural adaptation in stressful environment. *Behav Brain Res* 198:334-345.
- Medlej R, Wasson J, Baz P, Azar S, Salti I, Loiselet J, Permutt A, Halaby G (2004) Diabetes mellitus and optic atrophy: a study of Wolfram syndrome in the Lebanese population. *J Clin Endocrinol Metab* 89:1656-1661.
- Noormets K, Koks S, Muldmaa M, Muring L, Vasar E, Tillmann V (2011) Sex differences in the development of diabetes in mice with deleted wolframin (Wfs1) gene. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 119:271-275.
- Osman AA, Saito M, Makepeace C, Permutt MA, Schlesinger P, Mueckler M (2003) Wolframin expression induces novel ion channel activity in endoplasmic reticulum membranes and increases intracellular calcium. *J Biol Chem* 278:52755-52762.
- Paschen W, Mengesdorf T (2005) Endoplasmic reticulum stress response and neurodegeneration. *Cell Calcium* 38:409-415.
- Paxinos G, Watson C (2014) Paxinos and Watson's The rat brain in stereotaxic coordinates, 7th Edition. San Diego: Elsevier Academic Press.
- Plaas M, Seppa K, Reimets R, Jagomäe T, Toots M, Koppel T, Vallisoo T, Nigul M, Heinla I, Meier I, Kaasik A, Piirsoo A, Hickey M, Terasmaa A, Vasar E (2017) Development of Wolfram syndrome in a Wfs1 mutant rat. *Sci Rep*. Submitted.
- Riggs AC, Bernal-Mizrachi E, Ohsugi M, Wasson J, Fatrai S, Welling C, Murray J, Schmidt RE, Herrera PL, Permutt MA (2005) Mice conditionally lacking the Wolfram gene in pancreatic islet beta cells exhibit diabetes as a result of enhanced endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Diabetologia* 48:2313-2321.
- Rigoli L, Lombardo F, Di Bella C (2011) Wolfram syndrome and WFS1 gene. *Clin Genet* 79:103-117.
- Schoonderwoert VT, Martens GJ (2001) Proton pumping in the secretory pathway. *The Journal of membrane biology* 182:159-169.
- Sheikh S, Safia, Haque E, Mir SS (2013) Neurodegenerative Diseases: Multifactorial Conformational Diseases and Their Therapeutic Interventions. *Journal of neurodegenerative diseases* 2013:563481.
- Shen X, Ellis RE, Lee K, Liu CY, Yang K, Solomon A, Yoshida H, Morimoto R, Kurnit DM, Mori K, Kaufman RJ (2001) Complementary signaling pathways regulate the unfolded protein response and are required for *C. elegans* development. *Cell* 107:893-903.

- Strom TM, Hortnagel K, Hofmann S, Gekeler F, Scharfe C, Rabl W, Gerbitz KD, Meitinger T (1998) Diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy and deafness (DIDMOAD) caused by mutations in a novel gene (wolframin) coding for a predicted transmembrane protein. *Hum Mol Genet* 7:2021-2028.
- Swift RG, Polymeropoulos MH, Torres R, Swift M (1998) Predisposition of Wolfram syndrome heterozygotes to psychiatric illness. *Mol Psychiatry* 3:86-91.
- Swift RG, Sadler DB, Swift M (1990) Psychiatric findings in Wolfram syndrome homozygotes. *Lancet* 336:667-669.
- Zatyka M, Da Silva Xavier G, Bellomo EA, Leadbeater W, Astuti D, Smith J, Michelangeli F, Rutter GA, Barrett TG (2015) Sarco(endo)plasmic reticulum ATPase is a molecular partner of Wolfram syndrome 1 protein, which negatively regulates its expression. *Hum Mol Genet* 24:814-827.
- Zmyslowska A, Malkowski B, Fendler W, Borowiec M, Antosik K, Gnys P, Baranska D, Mlynarski W (2014) Central nervous system PET-CT imaging reveals regional impairments in pediatric patients with Wolfram syndrome. *PLoS ONE* 9:e115605.
- Takeda K, Inoue H, Tanizawa Y, Matsuzaki Y, Oba J, Watanabe Y, Shinoda K, Oka Y (2001) WFS1 (Wolfram syndrome 1) gene product: predominant subcellular localization to endoplasmic reticulum in cultured cells and neuronal expression in rat brain. *Hum Mol Genet* 10:477-484.
- Takei D, Ishihara H, Yamaguchi S, Yamada T, Tamura A, Katagiri H, Maruyama Y, Oka Y (2006) WFS1 protein modulates the free Ca(2+) concentration in the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett* 580:5635-5640.
- Terasmaa A, Soomets U, Oflijan J, Punapart M, Hansen M, Matto V, Ehrlich K, Must A, Koks S, Vasar E (2011) Wfs1 mutation makes mice sensitive to insulin-like effect of acute valproic acid and resistant to streptozocin. *Journal of physiology and biochemistry* 67:381-390.
- Urano F (2016) Wolfram Syndrome: Diagnosis, Management, and Treatment. *Curr Diab Rep* 16:6.
- Wolfram DJ, Wagener HP (1938) Diabetes mellitus and simple optic atrophy among siblings: report of four cases. *Mayo Clinic Proceedings* 13:715-718.
- Xia Z, Storm DR (2005) The role of calmodulin as a signal integrator for synaptic plasticity. *Nature reviews Neuroscience* 6:267-276.
- Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K (2001) XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* 107:881-891.
- Yushkevich PA, Piven J, Hazlett HC, Smith RG, Ho S, Gee JC, Gerig G (2006) User-guided 3D active contour segmentation of anatomical structures: significantly improved efficiency and reliability. *Neuroimage* 31:1116-1128.

RAAMATUD

Kuhlenbeck H.: The Central Nervous System of Vertebrates, Vol. 4. Spinal Cord and Deuterencephalon. Basel, Karger, 1975, vol 4, pp 388-623 (DOI:10.1159/000395635)

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

<http://vega.sanger.ac.uk/> Vaadatud 14.03.17 kell 15.00.

<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=WFS1> Vaadatud 14.03.17 kell 15.09.

1. Inimene

http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000109501;r=4:6269849-6303265;t=ENST00000226760

2. Rott

http://www.ensembl.org/Rattus_norvegicus/Transcript/Summary?db=core;g=ENSRN0G00000005108;r=14:78640114-78666472;t=ENSRNOT00000034730

3. Hiir

http://www.ensembl.org/Mus_musculus/Transcript/Summary?db=core;g=ENSMUSG00000039474;r=5:36966104-36989205;t=ENSMUST00000043964

Inimese *WFS1* ja roti *Wfs1* geen on 86,40% konserveerunud: Vaadatud 30.03.2017 kell 14.09.

http://www.ensembl.org/Rattus_norvegicus/Gene/Compara_Ortholog?db=core;g=ENSRNOG00000005108;r=14:78640620-78665966;t=ENSRNOT00000034730

Hiire ja roti *Wfs1* geen on omavahel 97,19% konserveerunud ning hiire ja inimese geen 87,08% konserveerunud: Vaadatud 30.03.2017 kell 13.08.

http://www.ensembl.org/Mus_musculus/Gene/Compara_Ortholog?db=core;g=ENSMUSG00000039474;r=5:36966104-36989205;t=ENSMUST00000043964

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Kadri Seppa (sünnikuupäev 08.04.1993)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose (WFS1-puudulikkusega roti piklikaju neurodegeneratsiooni iseloomustus), mille juhendaja on Anton Terasmaa ja kaasjuhendajad Mario Plaas ja Tambet Tõnissoo.
 - 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 **01.07.2018** 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, 31.05.2017