

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Helis Guske

**Na-pumba alaühikute ekspressiooni muutused Wfs1-puudulikkusega hiirte  
südames ja neerudes**

Bakalaureusetöö

Juhendajad:           Silva Sütt PhD  
                                  prof. Ants Kurg PhD

TARTU 2014

# SISUKORD

|  |    |
|--|----|
| SISUKORD .....   | 2  |
| LÜHENDID .....   | 3  |
| SISSEJUHATUS .....   | 4  |
| 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....   | 5  |
| 1.1 <i>WFS1</i> iseloomustamine .....  | 5  |
| 1.1.1 Wolframi sündroom.....   | 5  |
| 1.1.2 <i>WFS1</i> geeni ja volframiini valgu iseloomustamine.....  | 5  |
| 1.2 Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPaas .....  | 7  |
| 1.2.1 Naatriumpump neerudes.....   | 8  |
| 1.2.2 Naatriumpump südames .....   | 9  |
| 2. EKSPERIMENTAALNE OSA.....   | 10 |
| 2.1 Uurimistöö eesmärgid .....   | 10 |
| 2.2 Materjal ja meetodika.....   | 10 |
| 2.2.1 Katseloomad .....  | 10 |
| 2.2.2 Südame ja neerude prepareerimine.....  | 10 |
| 2.2.3 Kvantitatiivne reaalkaja PCR .....   | 11 |
| 2.2.4 Valgu eraldamine.....  | 11 |
| 2.2.5 Immunoblot .....   | 12 |
| 2.3 Tulemused .....  | 12 |
| 2.3.1 Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPaas alaühikute mRNA ekspressioon südames.....                                | 12 |
| 2.3.2 Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPaasi alaühikute $\alpha_1$ ja $\beta_1$ mRNA ekspressioon neerudes.....      | 15 |
| 2.3.3 Na-pumba $\alpha_1$ alaühiku valgu tase <i>Wfs1</i> -puudulikkusega homosügootsetel ja metsiktüüpi hiirtel ..... | 16 |
| 2.4 Arutelu.....   | 17 |
| KOKKUVÕTE .....  | 19 |
| SUMMARY .....  | 20 |
| KASUTATUD KIRJANDUS .....  | 21 |
| Lihtlitsents .....   | 26 |

# LÜHENDID

|          |  |
|----------|--|
| AC8      | Adenülaadi tsüklaas 8  |
| Atp1a1   | Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPaasi $\alpha_1$ alaühik  |
| Atp1a2   | Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPaasi $\alpha_2$ alaühik  |
| Atp1b1   | Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPaasi $\beta_1$ alaühik   |
| Atp1b2   | Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPaasi $\beta_2$ alaühik   |
| BCA      | Bitsinkoonhape ( <i>bicinchoninic acid</i> )                 |
| cAMP     | Tsükliline adenosiinmonofosfaat                              |
| cDNA     | Komplementaarne DNA  |
| ECL      | Elektrokemiluminestsents                                     |
| Hprt     | Hüpoksantiin fosforibosültransferaas                         |
| HRP      | Mädarõika peroksüdaas ( <i>horse radish peroxidase</i> )     |
| PBST     | Fosfaatpuhveris soolade lahus ja 0.1 % Tween 20              |
| PVDF     | Polüvinüülideenfluoriid                                      |
| RIPA     | Radioimmunosadestamise katse puhver                          |
| RPT      | Neerude proksimaalne tuubul ( <i>renal proximal tubule</i> ) |
| SDS      | Naatriumdodetsüülsulfaat                                     |
| SDS-PAGE | Naatriumdodetsüülsulfaat-poliakrüülamiid geelelektroforees   |
| WFS1     | Wolframi sündroomi 1 geen                                    |
| Wfs1     | Wolframi sündroomi 1 valk                                    |

# SISSEJUHATUS

Wolframi sündroom on autosomaalne retsessiivne pärilik haigus, mille põhjustajaks on mutatsioonid *WFS1* geenis. Wolframi sündroomiga patsientidel esineb suhkruhaigust, magediabeet, nägemisnärvide atroofia, kurtus, häired kusetrakti normaalses funktsioneerimises ning erinevad psühhiaatrilised haigused (Barrett *et al.*, 1995). *WFS1* on oluline  $\text{Ca}^{2+}$  regulatsioonis ja ER-stressi vastuses. On näidatud, et neuronite ja pankrease  $\beta$ -rakkude hävimine Wolframi sündroomiga patsientidel võib olla seotud ER-stressiga, mis viib rakusurma (Fonseca *et al.*, 2010).

$\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaas ehk  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -pump on rakkude plasmamembraanis paiknev ensüüm, mis transpordib naatriumi ja kaaliumi ioone läbi rakumembraani. Sellisel viisil luuakse rakumembraanil elektrokeemiline potentsiaal, mida kasutatakse kaltsiumi ja glükoosi transportimisel (Lingrel ja Kuntzweiler, 1994). On näidatud interaktsioon *WFS1* valguga ning  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaasi  $\beta_1$  alaühiku vahel ning võib arvata, et *WFS1* on oluline naatriumpumba kokkupanekul ja stabiilsuse tagamisel (Fonseca *et al.*, 2010).

Käesoleva töö eesmärgiks on uurida Na-pumba alaühikute ekspressiooni neerudes ja südames homosügootsetel ja heterosügootsetel *Wfs1*-puudulikkusega hiirtel võrreldes metsiktüüpi hiirtega.

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

Märksõnad:  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaas, neerud, süda, volframiin, *Wfs1*-puudulikkusega hiir

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 *WFSI* iseloomustamine

### 1.1.1 Wolframi sündroom

Mutatsioonid volframiini kodeerivas *WFSI* geenis põhjustavad Wolframi sündroomi (OMIM 222300) (Barrett *et al.*, 1995). Enamik kirjeldatud mutatsioonidest on leitud kaheksandast eksonist. Sinna hulka kuuluvad insertsioonid, deletsioonid, nonsense ja missense mutatsioonid (Khanim *et al.*, 2001; Cryns *et al.*, 2003). Wolframi sündroomiga patsientidel on kirjeldatud üle 100 *WFSI* mutatsiooni ning enamik neist asuvad valgu C-terminaalses regioonis (Hofmann *et al.*, 2003). Haiguse esimesed kirjeldajad olid Wolfram ja Wagener, kes iseloomustasid seda kui juveniilset suhkruhaigust koos nägemise tugeva nõrgenemisega (Wolfram ja Wagener, 1938).

Wolframi sündroom on haruldane neurodegeneratiivne häire, mis hõlmab kesknärvisüsteemi, perifeerseid närve ning neuroendokriinkudet. Wolframi sündroomile on iseloomulikuks magediabeet (*diabetes insipidus*), mille puhul vee tagasiimendumine neerudest on puudulik, ning I tüüpi diabeet, lisaks nägemisnärvide atroofia ja kurtus. Sellest tuleneb Wolframi sündroomi teine nimetus – DIDMOAD (*diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy and deafness*) (Khanim *et al.*, 2001).

### 1.1.2 *WFSI* geeni ja volframiini valgu iseloomustamine

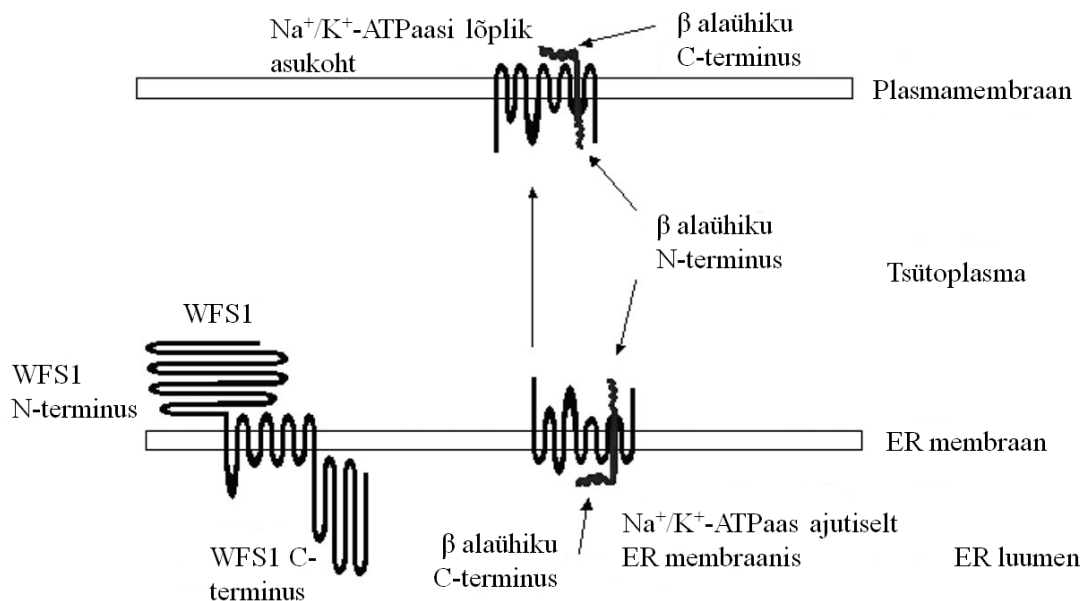
*WFSI* geen paikneb inimesel neljanda kromosoomi 4p16.1 lookuses ning hiirel viienda kromosoomi 5qB3 lookuses. *WFSI* geen koosneb kaheksast eksonist (Strom *et al.*, 1998).

Volframiin on 890 aminohappe suurune ja umbes 100 kDa molekulmassiga glükoproteiin, mis paikneb endoplasmaatilise retiikulumi (ER) membraanis (Strom *et al.*, 1998; Osman *et al.*, 2003). Volframiin on hüdrofoobne valk, millel on 9 transmembraanset segmenti ning pikad hüdrofiilsed N- ja C-terminaalsed regioonid. N-terminus on tsütoplasmas ning C-terminus ER luumenis (Hofmann *et al.*, 2003). Inimese ja hiire järjestused on kõrgelt homoloogsed: nukleotiidide tasemel 83% ning aminohapete tasemel 87% (Strom *et al.*, 1998).

Volframiin on kõige enam ekspresseerunud ajus, südames, skeletilihastes ja insuliini sekreteerivates pankrease  $\beta$ -rakkudes. Väiksemas koguses on teda maksas, neerudes ja põrnas (Hofmann *et al.*, 2003). Ajus on *Wfs1* ekspresseerunud laiendatud amügdalas, hippokampuses, haistesibulas ja allokorteksis (Takeda *et al.*, 2001; Luuk *et al.*, 2009). See viitab sellele, et volframiin on seotud emotsionaalse käitumise, sealhulgas hirmu ja ärevuse regulatsiooniga (Takeda *et al.*, 2001).

WFS1 täpne funktsioon on siiani teadmata, kuid on näidatud WFS1 rolli  $\text{Ca}^{2+}$  regulatsioonil ja ER-stressi vastuses (Osman *et al.*, 2003; Yamada *et al.*, 2006). *Wfs1*-puudulikkuse korral on pankrease  $\beta$ -rakud tundlikumad ER-stressist põhjustatud rakusurma suhtes (Fonseca *et al.*, 2010). Glükoosiga stimuleerimisel liigub WFS1 plasmamembraani, kus ta moodustab kompleksi  $\text{Ca}^{2+}$ / kalmoduliiniga ja AC8-ga, stimuleerides cAMP sünteesi. Kompleksi moodustamine on oluline pankrease  $\beta$ -rakkude insuliini biosünteesis ja sekretsioonis (Fonseca *et al.*, 2012).

On näidatud, et  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaasi  $\beta_1$  alaühik interakteerub volframiini C-terminaalse ja transmembraanse regiooniga ER luumenis (Joonis 1). *Wfs1*-mutantsetes fibroblasti ja pankrease  $\beta$ -rakkudes on  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaasi  $\beta_1$  alaühiku ekspressioon väiksem võrreldes normaalsete rakkudega. Lisaks on näidatud volframiini N-terminaalse regiooni interaktsioon vakuolaarse  $\text{H}^+$ ATPaasi V1A alaühikuga ning V1A alaühiku ekspressiooni vähenemist *WFS1*-puudulikkuse korral. Mõlema alaühiku degradatsioon *WFS1*-puudulikkusega rakkudes on suurem kui normaalsetes rakkudes (Zatyka *et al.*, 2008; Gharanei *et al.*, 2013). Sellest tulenevalt võib oletada, et volframiinil on üldine soodustav roll oligomeersete valkude alaühikute kokkupanekul ning nende stabiilsuse tagamisel.



**Joonis 1.** WFS1 ja  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaasi  $\beta_1$  alaühiku lokaliseerimine raku. Naatriumpumba lõplik asukoht on plasmamembraanis, kuid valmistamise ja naatriumpumba alaühikute ( $\alpha$  ja  $\beta$ ) kokkupanekul paikneb see lühiajaliselt ER membraanis. Kõige tõenäolisemalt toimub WFS1 ja  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaasi  $\beta_1$  alaühiku omavaheline interaktsioon ER luumenis (kohandatud Zatyka *et al.*, 2008).

## 1.2 $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaas

$\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaas ehk naatriumpump transpordib naatriumi ja kaaliumi ioone. Energiaallikana kasutatakse selles protsessis ATP hüdrolyüüsil vabanevat energiat. Iga kolme rakust välja pumbatud naatriumiooni kohta viiakse raku sisse kaks kaaliumiooni (Lingrel ja Kuntzweiler, 1994). Protsessi tulemusena luuakse rakumembraanile nii elektriline kui ka keemiline gradient. Elektriline gradient on oluline rakkude puhkeolekupotentsiaali säilitamiseks ja signaaliülekaneks närvi- ja lihaskoes (Tedeschi, 1974).

$\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaas kuulub P-tüüpi ATPaaside klassi, kuid erineb teistest selle klassi pumpadest selle poolest, et teda saab spetsiifiliselt inhibeerida südame glükosiididega nagu näiteks ouabaiiniga (Tedeschi, 1974; Tiger ja Fowler, 1991). Ta koosneb kahest katalüütilisest  $\alpha$  alaühikust, kahest reguloorsest  $\beta$  alaühikust ning FXD valgust (Segall *et al.*, 2001; Mishra *et al.*, 2011).

Katalüütilisel  $\alpha$  alaühikul on naatriumi ja kaaliumi seondumiskohad ning tema koosseisu kuulub konserveerunud aspartaadijääk, mille kaudu toimub valgusfosforüleerimine (Lingrel ja Kuntzweiler, 1994).  $\alpha$  alaühikul on neli isovormi ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$ ), mille avaldumismäär

erinevates kudedes ja arenguetappides on erinev. Kõige rohkem leidub organismis  $\alpha_1$  isovormi, mida ekspresseeritakse üle terve keha.  $\alpha_2$  ekspresseeritakse lihastes, ajus ja südames,  $\alpha_3$  peamiselt neuronites, vähesel määral südames ning  $\alpha_4$  on avastatud ainult testistes (Segall *et al.*, 2001; McDonough *et al.*, 2002).

Regulatoorse  $\beta$  alaühiku ülesandeks on  $\alpha$  alaühiku kinnitamine plasmamembraani ning tagada pumba stabiilsus (Lingrel ja Kuntzweiler, 1994). Regulatoorsel alaühikul on 3 isovormi ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$  ja  $\beta_3$ ) (Therien ja Blostein, 2000; Kaplan, 2002).  $\beta_1$  isovorm on sarnaselt  $\alpha_1$ -le ekspresseerunud erinevates kudedes üle keha,  $\beta_2$  ajus ja lihastes ning  $\beta_3$  isovorm on peamiselt ekspresseerunud kopsudes, testistes, skeletilihastes ja maksas (Appel *et al.*, 1996; Avila *et al.*, 1998; Tokhtaeva *et al.*, 2012).

On näidatud, et homosügootsed naatriumpumba  $\alpha_1$  alaühiku puudulikkusega hiired on embrüonaalselt letaalsed ning  $\alpha_2$  puudulikkusega hiired surevad sündides (James *et al.*, 1999). Homosügootsed naatriumpumba  $\beta_2$  alaühiku puudulikkusega hiired surevad 17-18 päeva vanuselt (Magyar *et al.*, 1994). Seega on naatriumpump ja tema erinevate alaühikute ekspressioon olulised juba varajases organismi arengus.

### 1.2.1 Naatriumpump neerudes

Neerudes tagab naatriumpump naatriumi reabsorbtsiooni, mis on vajalik rakuvälise vedeliku mahu ja vererõhu reguleerimiseks (Pavlovic *et al.*, 2013). Naatriumioonide reabsorbtsioon neerudes peab olema rangelt reguleeritud, et tagada naatriumi homeostaas ja normaalne vererõhk. Neerude proksimaalses tuubulis (*RPT*) liigub filtreeritud naatrium rakkudesse  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporti,  $\text{Na}^+/\text{glükoos}$  kotranspordi,  $\text{Na}^+/\text{fosfaadi}$  transpordi ja  $\text{Na}^+/\text{aminohappe}$  kotranspordi süsteemide kaudu. Nende pumpade töö jaoks vajaliku naatriumgradiendi eest vastutab  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -pump (Al-Khalili *et al.*, 2004; Taub *et al.*, 2010). Seega  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -pumba inhibeerimisel suureneb rakkudes naatriumi kontsentratsioon ning see võib omakorda viia rakusisese pH või kaltsiumisisalduse muutumisele (Kaplan, 2002).

Naatriumpumba aktiivsust kontrollivad mitmed efektormolekulid, sealhulgas dopamiin, parathormoon, norepinefriin ja prostaglandiin  $\text{E}_2$ . Dopamiin ning parathormoon vähendavad  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaasi aktiivsust, norepinefriin ja prostaglandiin  $\text{E}_2$  aga stimuleerivad pumba tööd (Taub *et al.*, 2010). Kui naatriumpumba regulatsioon neerude proksimaalses tuubulis on häiritud, siis viib see hüpertoonia tekkele (Wang *et al.*, 2009).



Neerudes on peamiselt ekspresseerunud  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaasi  $\alpha_1$  ja  $\beta_1$  alaühikud (Taub *et al.*, 2010). Rottidel on näidatud, et diabeet, mis on üks Wolframi sündroomile iseloomulik haigus, vähendab neerudes naatriumpumba  $\alpha_1$  alaühiku ekspressiooni (Nordquist *et al.*, 2010). Oksüdatiivne stress vähendab neerudes  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaasi  $\alpha_1$  stabiilsust ning seeläbi põhjustab  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaasi aktiivsuse langust neerude proksimaalses tuubulis (Thevenod ja Friedmann, 1999).

### 1.2.2 Naatriumpump südames

Rakusisese naatriumi hulga reguleerimine on oluline südame normaalseks funktsioneerimiseks. Iga aktsioonipotentsiaali käigus liigub naatrium rakkudesse läbi pingest sõltuvate naatriumkanalite. Naatriumi väljutamiseks rakkudest on aga oluline naatriumpump. Tekkiv naatriumgradient on oluline, et genereerida kiire aktsioonipotentsiaali tõus. Kuna  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -pumba töö sõltub naatriumpumba poolt genereeritud naatriumgradiendist, siis mõjutab naatriumpump ka rakusisese kaltsiumi hulka ning seeläbi reguleerib müokardi kontraktiilsust (Pavlovic *et al.* 2007). On näidatud, et  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaas kaitseb südant naatriumi ja kaltsiumi liiast ning seega ka südamerütmihäirete eest nii raku kui ka organi tasemel (Pavlovic *et al.*, 2013).

Hiire südames on põhiliselt ekspresseerunud  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaasi  $\alpha_1$  ja  $\beta_1$  isovormid, kuid lisaks neile väiksemal määral ka  $\alpha_2$  ja  $\beta_2$ . Inimesel on südames lisaks nendele ekspresseerunud ka  $\alpha_3$  (McDonough *et al.*, 2002). On näidatud, et ühe isovormi puudumise korral on kompensatsiooniks suurenenud mõne teise isovormi ekspressioon. Näiteks heterosügootsetel  $\alpha_1$  alaühiku puudulikkusega hiirtel on tõusnud  $\alpha_2$  alaühiku ekspressioonitase (Magyar *et al.*, 1994). Samas ei ole sarnaseid kompenseerivaid mehhanisme leitud heterosügootsetel  $\alpha_2$  puudulikkusega ja homosügootsetel  $\beta_2$  puudulikkusega hiirtel vastavalt  $\alpha_1$  ja  $\beta_1$  alaühiku ekspressioonis (Weber *et al.*, 1998).

$\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaasi talitluse ja kardiomüopaatia vaheline seos on küll ebaselge, kuid on näidatud, et südamepuudulikkuse korral on inimese südames vähenenud naatriumpumba aktiivsus ning  $\alpha_1$ ,  $\alpha_3$  ja  $\beta_1$  alaühikute ekspressioonitasemed (Schwinger *et al.*, 1999). Sealjuures on täheldatud muutusi  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaasi alaühikute ekspressioonis juba väga varajastes südamepuudulikkuse etappides (Schwinger *et al.*, 2003). On näidatud, et homosügootsete naatriumpumba  $\beta_1$  alaühiku puudulikkusega hiirte süda ei reageeri ouabaiinile, mis tavaliselt toimib naatriumpumba inhibiitorina (Barwe *et al.*, 2009).

## 2. EKSPERIMENTAALNE OSA

### 2.1 Uurimistöö eesmärgid

1. Uurida  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaasi  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  ja  $\beta_2$  alaühikute mRNA ekspressioone homosügootsete ja heterosügootsete Wfs1-puudulikkusega hiirte südames võrreldes metsiktüüpi hiirtega.
2. Uurida  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaasi  $\alpha_1$  ja  $\beta_1$  alaühikute mRNA ekspressioone homosügootsete ja heterosügootsete Wfs1-puudulikkusega hiirte neerudes võrreldes metsiktüüpi hiirtega.
3. Uurida  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaasi  $\alpha_1$  valgu taset homosügootsete ja metsiktüüpi hiirte südames ja neerudes.

### 2.2 Materjal ja meetodika

#### 2.2.1 Katseloomad

Katseloomadeks olid emased Tartu Ülikoolis bio- ja siirdemeditsiini instituudis füsioloogia osakonnas valmistatud F2 põlvkonna Wfs1-puudulikkusega homosügootsed ja heterosügootsed hiired (Luuk *et al.*, 2009) ja kontrolliks metsiktüüpi hiired. Katseloomad paljundati ja genotüpiseeriti Tartu Ülikooli arstiteaduskonna füsioloogia osakonnas. Katseloomade geneetiline taust oli (129S6/SvEvTac x C57BL/6) x (129S6/SvEvTac x C57BL/6). Loomade vanus oli 2-3 ja 8 kuud. Hiiri hoiti puurides 8-10 kaupa 12-h/12-h valge/pime tsüklis 22 °C juures (valge tsüklil algas kell 7 hommikul). Hiirtel oli vaba ligipääs toidule ja veele. Kõik katsed teostati Eesti Vabariigi põllumajandusministeeriumi poolt välja antud loa alusel (number 88, välja antud 25 august 2011).

#### 2.2.2 Südame ja neerude prepareerimine

Katseloomad surmati tservikaalse dislokatsiooni teel. Seejärel eemaldati igalt hiirelt 1 terve neer ja süda, mis külmutati koheselt vedelas lämmastikus ja säilitati kuni proovide analüüsamiseni -80 °C juures.

### 2.2.3 Kvantitatiivne reaalaaja PCR

RNA eraldamiseks kasutati Trizol reagenti (Invitrogen) ja cDNA sünteesimiseks Superscript III pöördtranskriptaasi (Invitrogen) ja oligo dT<sub>18</sub> oligonukleotiide vastavalt etteantud protokollidele. Kvantitatiivse reaalaaja PCR-i teostamiseks kasutati ABI PRISM 7900HT Fast Real-Time PCR Süsteemi (PE Applied Biosystems, USA) ja ABI PRISM 7900 SDS 2.2.2 tarkvara. Kasutatud praimerite ja sondide järjestused on toodud tabelis 1. Referentsina kasutati *Hprt1* koduhoidja geeni, mis on eelnevalt tõestatud katsetes kõige stabiilsemalt ja efektiivsemalt ekspresseeruv geen (Raud *et al.* 2009). Kõik reaktsioonid teostati neljas korduses, et vähendada võimalikke vigu. Kõikide reaktsioonide lõppmahuks oli 10 µl, kasutades 50-100 ng cDNA-d. Kõigi kolme loomade grupi ekspressioonid teostati paralleelselt. Ekspressiooni analüüsimiseks kasutati ühesuunalist ANOVA-t ja statistika teostati Statistica 8 programmiga.

**Tabel 1.** Kvantitatiivse reaalaaja PCR-i Taqman assayd, praimerid ja proovid.

| Geeni sümbol                    | Assay ID või järjestus                | Geeni ID  |
|---------------------------------|---------------------------------------|-----------|
| <i>Atp1a1</i>                   | Mm00523263_m1                         | NM_011716 |
| <i>Atp1a2</i>                   | Mm00617899_m1                         | NM_178405 |
| <i>Atp1b1</i>                   | Mm00437612_m1                         | NM_031823 |
| <i>Atp1b2</i>                   | Mm00442612_m1                         | NM_013415 |
| <i>Hprt1</i> for                | 5'-GCAGTACAGCCCCAAAATGG-3'            |           |
| <i>Hprt1</i> rev                | 5'-AACAAAGTCTGGCCTGTATCCAA-3'         | NM_013556 |
| <i>Hprt1</i> probe<br>(VIC_MGB) | 5'-VIC-AAGCTTGCTGGTGAAAAGGACCTCTCG-3' |           |

*Atp1a1* – Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> -ATPaasi α<sub>1</sub> alaühik; *Atp1a2* – Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> -ATPaasi α<sub>2</sub> alaühik; *Atp1b1* – Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> -ATPaasi β<sub>1</sub> alaühik; *Atp1b2* – Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> -ATPaasi β<sub>2</sub> alaühik; *Hprt1* – hüpoksantiin fosforibosüültransferaas-1 geen

### 2.2.4 Valgu eraldamine

Koed homogeniseeriti sonikeerimise teel RIPA puhvris (50mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0,5% naatriumdeoksülaad, 1% Triton X-100), kuhu lisati 1mM proteaasi inhibiitor kokteili (Sigma). Seejärel tsentrifuugiti proovid 10 minutit 10000 g juures ja supernatant säilitati alikvootidena -80 °C juures. Valgu kontsentratsiooni määramiseks kasutati BCA kitti (Pierce, Rockford, IL, USA).

## 2.2.5 Immunoblot

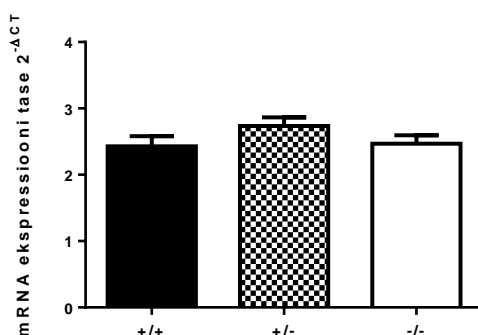
Valguproovid lahutati 10%-lise SDS-PAGE meetodil ning seejärel kanti üle PVDF membraanile. Membraanid blokiti 5% piimapulbri lahusega. Seejärel inkubeeriti membraanid spetsiifilise primaarse antikehaga ATP1A1 (1:5000; Novus Biologicus) või  $\beta$ -aktiin (1:1000, Santa Cruz Biotechnology) loksutil üleöö +4 °C juures. Seejärel pesti membraane 3x10 minutit PBST-s ja inkubeeriti 1 tund toatemperatuuril HRP-ga konjugeeritud hiire või jänese IgG sekundaarse antikehaga lahjendusega 1:10000. Tulemuste detekteerimiseks kasutati ECL reagenti (Pierce, Rockford, IL, USA). Tulemusi analüüsiti MultiGauge (Fuji Film) programmiga, huvipakkuva valgu hulka võrreldi aktiini hulgaga.

## 2.3 Tulemused

### 2.3.1 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaas alaühikute mRNA ekspressioon südames

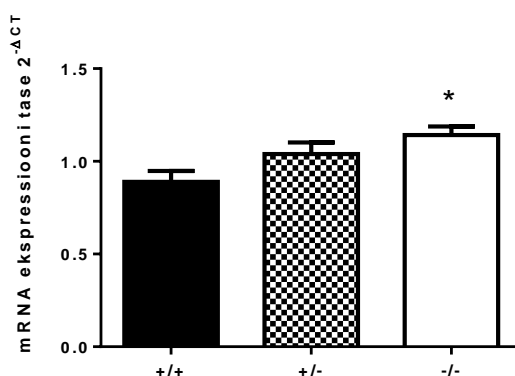
Südames võrreldi Na-pumba alaühikute  $\alpha_1$  ja  $\alpha_2$  ning  $\beta_1$  ja  $\beta_2$  mRNA ekspressiooni Wfs1-heterosügootsetel, Wfs1-homosügootsetel ja metsiktüüpi hiirtel.

*Atp1a1* mRNA ekspressioon oli heterosügootsetel Wfs1-puudulikkusega hiirtel võrreldes metsiktüüpi hiirtega tõusnud, kuid tulemus ei olnud statistiliselt oluline (F(1; 21)=1,482; p=0,272). Heterosügootsetel Wfs1-puudulikkusega hiirtel oli südames *Atp1a1* ekspressiooni tase kõrgem kui homosügootsetel Wfs1-puudulikkusega hiirtel, kuid ei olnud samuti statistiliselt oluline (F(1; 21)=1,482; p=0,375). Metsiktüüpi ja homosügootsete Wfs1-puudulikkusega hiirte vahel *Atp1a1* mRNA ekspressioonis olulist erinevust ei esinenud (F(1; 21)=1,482; p=0,974) (Joonis 2).



**Joonis 2.** *Atp1a1* mRNA ekspressiooni tase südames Wfs1-puudulikkusega homosügootsetel (-/-), heterosügootsetel (+/-) ja metsiktüüpi (+/+) hiirtel. Igas grupis oli 7-8 looma.

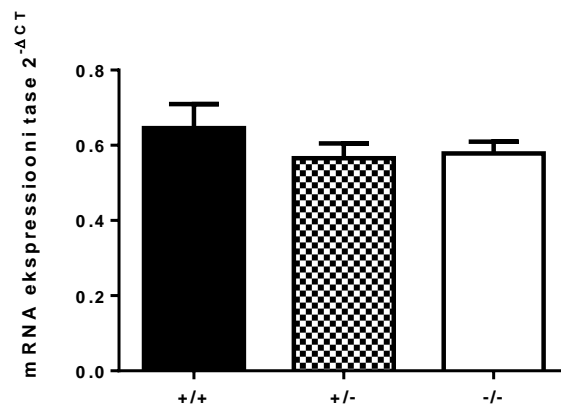
Heterosügootsetel Wfs1-puudulikkusega hiirtel oli südames *Atp1b1* mRNA ekspressioon tõusnud võrreldes metsiktüüpi hiirtega, kuid ei olnud statistiliselt oluline ( $F(1; 19)=4,788$ ;  $p=0,168$ ). Homosügootsetel Wfs1-puudulikkusega hiirtel oli *Atp1b1* ekspressioon samuti suurenenud võrreldes heterosügootsete Wfs1-puudulikkusega hiirtega ( $F(1; 19)=4,788$ ;  $p=0,422$ ). Statistiliselt oluliselt oli *Atp1b1* mRNA ekspressioon tõusnud Wfs1-puudulikkusega homosügootsete hiirte südames võrreldes metsiktüüpi hiirtega ( $F(1; 19)=4,788$ ;  $p=0,0165$ ) (Joonis 3).



**Joonis 3.** *Atp1b1* mRNA ekspressiooni tase südames Wfs1-puudulikkusega homosügootsetel (-/-), heterosügootsetel (+/-) ja metsiktüüpi (+/+) hiirtel. Igas grupis oli 7-8 looma.

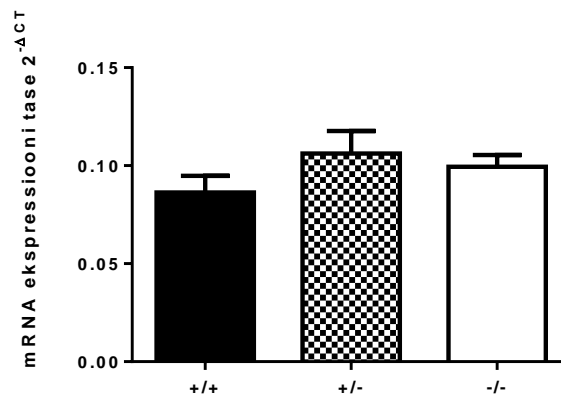
\* -  $p<0.05$  võrreldes metsiktüüpi hiirtega (Tukey HSD test peale ühesuunalist ANOVAt).

*Atp1a2* ekspressioon metsiktüüpi hiirte südames oli kõrgem võrreldes heterosügootsete Wfs1-puudulikkusega ( $F(1; 21)=0,8358$ ;  $p=0,466$ ) ja homosügootsete Wfs1-puudulikkusega hiirtega ( $F(1; 21)=0,8358$ ;  $p=0,576$ ), kuid ei olnud statistiliselt oluline. Heterosügootsetel Wfs1-puudulikkusega hiirtel oli *Atp1a2* mRNA ekspressioon südames sarnane homosügootsete Wfs1-puudulikkusega hiirtega ( $F(1; 21)=0,8358$ ;  $p=0,981$ ) (Joonis 4).



**Joonis 4.** *Atp1a2* mRNA ekspressiooni tase südames Wfs1-puudulikkusega homosügootsetel (-/-), heterosügootsetel (+/-) ja metsiktüüpi (+/+) hiirtel. Igas grupis oli 7-8 looma.

Heterosügootsetel Wfs1-puudulikkusega hiirtel oli südames *Atp1b2* mRNA ekspressioon tõusnud võrreldes metsiktüüpi hiirtega, kuid ei olnud statistiliselt oluline ( $F(1; 20)=1,3388$ ;  $p=0,2704$ ). Homosügootsetel Wfs1-puudulikkusega hiirte südames oli *Atp1b2* ekspressiooni tase veidi madalam kui heterosügootsetel Wfs1-puudulikkusega hiirtel ( $F(1; 20)=1,3388$ ;  $p=0,8496$ ) ja kõrgem kui metsiktüüpi hiirte südames ( $F(1; 20)=1,3388$ ;  $p=0,533$ ), kuid need erinevused ei olnud statistiliselt olulised (Joonis 5).

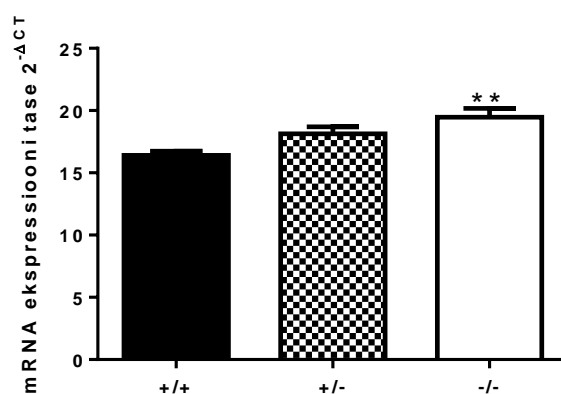


**Joonis 5.** *Atp1b2* mRNA ekspressiooni tase südames Wfs1-puudulikkusega homosügootsetel (-/-), heterosügootsetel (+/-) ja metsiktüüpi (+/+) hiirtel. Igas grupis oli 7-8 looma.

### 2.3.2 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaasi alaühikute $\alpha_1$ ja $\beta_1$ mRNA ekspressioon neerudes

Neerudes võrreldi Na-pumba alaühikute  $\alpha_1$  ja  $\beta_1$  mRNA ekspressiooni Wfs1-heterosügootsetel, Wfs1-homosügootsetel ja metsiktüüpi hiirtel.

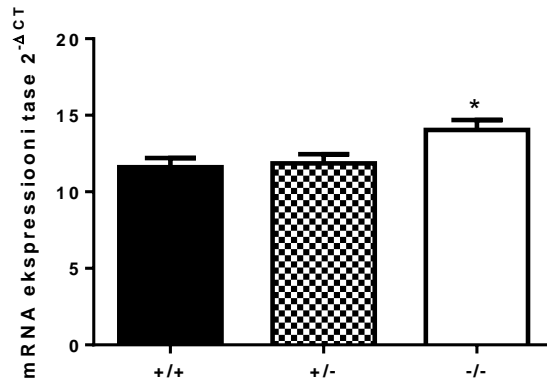
Neerudes ei esinenud statistiliselt olulisi erinevusi *Atp1a1* ekspressioonis heterosügootsetel Wfs1-puudulikkusega hiirtel võrreldes metsiktüüpi hiirtega (F(1; 33)=7,925; p=0,0661) ega ka homosügootsete Wfs1-puudulikkusega hiirtega (F(1; 33)=7,925; p=0,198). Homosügootsetel Wfs1-puudulikkusega hiirte neerudes oli *Atp1a1* mRNA ekspressioon tunduvalt suurenenud võrreldes metsiktüüpi hiirtega ning see erinevus oli statistiliselt oluline (F(1; 33)=7,925; p=0,00117) (Joonis 6).



**Joonis 6.** *Atp1a1* mRNA ekspressiooni tase neerus Wfs1-puudulikkusega homosügootsetel (-/-), heterosügootsetel (+/-) ja metsiktüüpi (+/+) hiirtel. Igas grupis oli 7-10 looma.

\*\* - p<0.005 võrreldes metsiktüüpi hiirtega (Tukey HSD test peale ühesuunalist ANOVAt).

*Atp1b1* ekspressioon heterosügootsete Wfs1-puudulikkusega hiirte neerudes oli sarnane metsiktüüpi hiirtega (F(1; 20); p=0,954). Homosügootsete Wfs1-puudulikkusega hiirte *Atp1b1* ekspressioon oli suurem kui heterosügootsetel Wfs1-puudulikkusega hiirtel (F(1; 20); p=0,0552), kuid ei olnud statistiliselt oluline. Statistiliselt oluliselt oli *Atp1b1* mRNA ekspressioon suurenenud homosügootsete Wfs1-puudulikkusega hiirte neerudes võrreldes metsiktüüpi hiirtega (F(1; 20); p=0,0308) (Joonis 7).

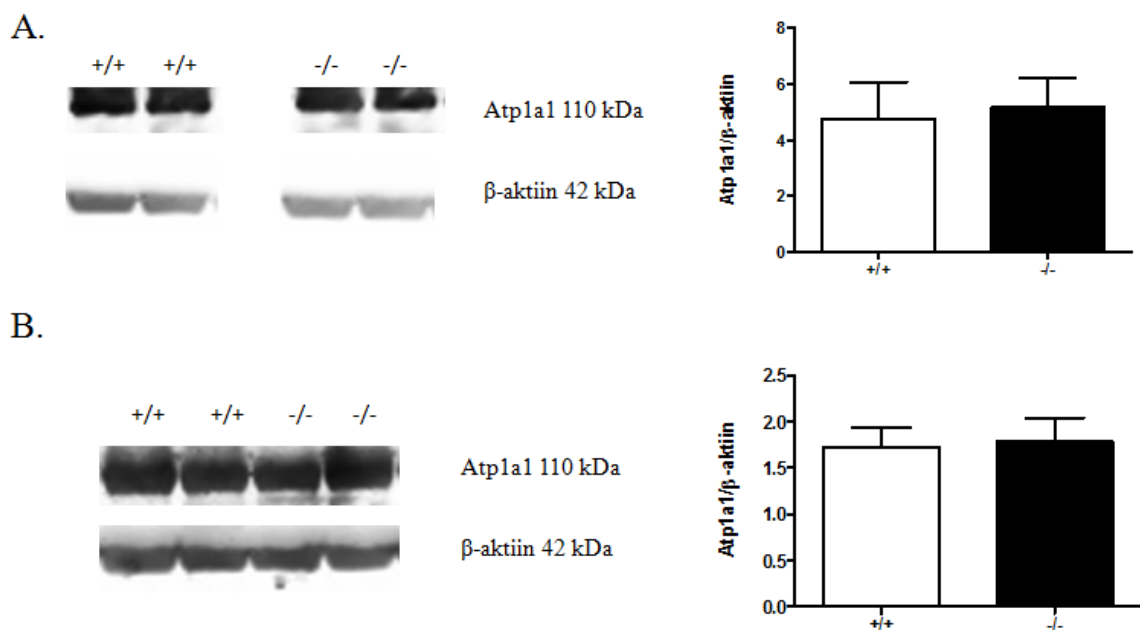


**Joonis 7.** *Atp1b1* mRNA ekspressiooni tase neerus Wfs1-puudulikkusega homosügootsetel (-/-), heterosügootsetel (+/-) ja metsiktüüpi (+/+) hiirtel. Igas grupis oli 7-10 looma.

\* -  $p < 0.05$  võrreldes metsiktüüpi hiirtega (Tukey HSD test peale ühesuunalist ANOVAt).

### 2.3.3 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> α<sub>1</sub> alaühiku valgu tase Wfs1-puudulikkusega homosügootsetel ja metsiktüüpi hiirtel

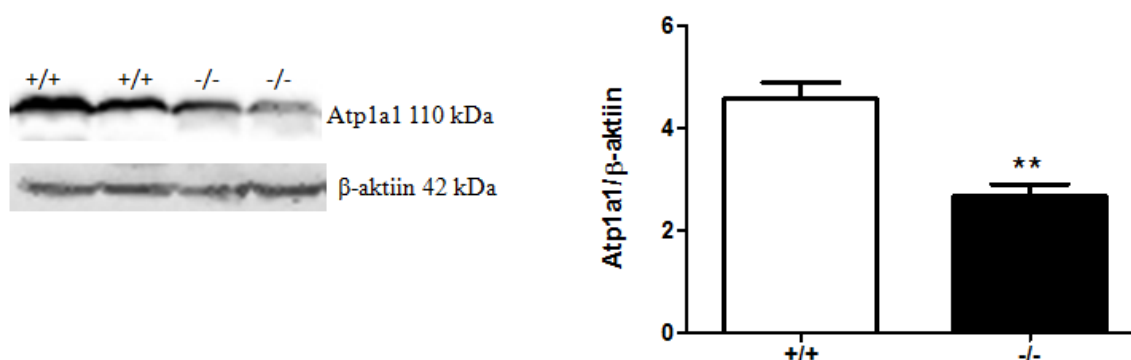
Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaas α<sub>1</sub> alaühiku valgu tase neerus oli 2-3 kuu vanustel homosügootsetel Wfs1-puudulikkusega hiirtel võrreldes metsiktüüpi hiirtega mõnevõrra tõusnud, kuid tulemus ei olnud statistiliselt oluline ( $F(1; 7)=0,825$ ,  $p=0,825$ ) (Joonis 8. A). 8 kuu vanustel homosügootsetel Wfs1-puudulikkusega hiirtel oli α<sub>1</sub> alaühiku valgu tase neerus võrreldav metsiktüüpi hiirtega ( $F(1; 4)=0,866$ ,  $p=0,866$ ) (Joonis 8. B).



**Joonis 8.** Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaas α<sub>1</sub> alaühiku valgu tase neerus Wfs1-puudulikkusega homosügootsetel (-/-) ja metsiktüüpi (+/+) hiirtel. Hiirte vanus 2-3 kuud (A) ja 8 kuud (B).



Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaas  $\alpha_1$  alaühiku valgu tase südames 8 kuu vanustel homosügootsetel *Wfs1*-puudulikkusega hiirtel oli võrreldes metsiktüüpi hiirtega oluliselt langenud ( $F(1; 6)=0,00321$ ;  $p=0,00321$ ) ning see erinevus oli statistiliselt oluline (Joonis 9).



**Joonis 9.** Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaas  $\alpha_1$  alaühiku valgu tase südames *Wfs1*-puudulikkusega homosügootsetel (-/-) ja metsiktüüpi hiirtel. Hiirte vanus 8 kuud.

\*\* -  $p < 0.005$  võrreldes metsiktüüpi hiirtega (Tukey HSD test peale ühesuunalist ANOVAt).

## 2.4 Arutelu

Käesolevas töös leidsime muutusi Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaasi alaühikute ekspressioonis neerudes ja südames. Varasemates katsetes on näidatud WFS1 valgu interaktsiooni naatriumpumba  $\beta_1$  alaühikuga ning tõenäoliselt toimub see ER-is (Zatyka *et al.*, 2008). *Wfs1* on kõrgelt ekspresseerunud südames. Tartu Ülikooli arstiteaduskonna bio- ja siirdemeditsiini instituudi biokeemia osakonnas on uuritud Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaasi aktiivsust südamelihases *Wfs1*-puudulikkusega hiirtel ning leitud, et *Wfs1* geenmutatsiooniga hiirtel on südamelihases naatriumpumba aktiivsus suurem kui metsiktüüpi hiirtel. Südames on kõige enam ekspresseerunud  $\alpha_1$  ja  $\beta_1$ , vähesel määral ka  $\alpha_2$  ja  $\beta_2$  alaühikud. On näidatud, et  $\alpha_1$  ja  $\alpha_2$  isovormid omavad südames erinevat funktsiooni.  $\alpha_1$  heterosügootsetel hiirtel on vähenenud südame kontraktiilsus. Vastupidiselt aga on  $\alpha_2$  heterosügootsetel hiirtel hüperkontraktiilsus, mistõttu on suurenenud Na<sup>+</sup> hulk raku sees ja selle tulemusena on tõusnud Ca<sup>2+</sup> väljavool rakust (James *et al.*, 1999). Teostasime südames  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  ja  $\beta_2$  mRNA ekspressiooni analüüsi.  $\alpha_1$  alaühiku mRNA ekspressioonis muutusi genotüüpide vahel ei täheldatud.  $\alpha_2$  alaühiku ekspressioon oli *Wfs1*-puudulikkusega heterosügootsetel ja homosügootsetel hiirtel küll langenud võrreldes metsiktüüpi hiirtega, kuid ei olnud statistiliselt oluline. Järelikult ei ole südames katalüütilise alaühiku muutusi *Wfs1*-puudulikkusega hiirtel mRNA tasemel võrreldes metsiktüüpi hiirtega. Samas regulatoorse  $\beta_1$  alaühiku ekspressioonitase oli oluliselt tõusnud homosügootsete *Wfs1*-puudulikkusega hiirte südames võrreldes metsiktüüpi hiirtega.

Regulatoorse  $\beta_1$  alaühiku mRNA taseme tõus võib olla kompensatsiooniks valgu taseme vähenemisele Wfs1-puudulikkusega hiirtel võrreldes metsiktüüpi hiirtega (avaldamata andmed). 8 kuu vanustel Wfs1-puudulikkusega hiirtel on aga vähenenud katalüütilise  $\alpha_1$  alaühiku valgu hulk, mis viitab sellele, et muutused  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaasi alaühikute ekspressioonis valgu tasemel ilmnevad just vananedes. Tulemustest võib järeldada, et WFS1 üks võimalikke rolle südames on reguleerida  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaasi aktiivsust, moduleerides  $\alpha_1$  ja  $\beta_1$  taset rakus.

Neerudes täidab  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaas olulist rolli, reguleerides naatriumi reabsorptsiooni tagamaks neerude normaalne funktsioneerimine. *WFS1* mutatsioonide korral on leitud häireid neerude normaalses talitluses (Khanim *et al.*, 2001), seetõttu uurisime naatriumpumba alaühikute mRNA ja valgu taset neerudes Wfs1-puudulikkusega hiirtel. Leidsime, et neerudes on nii  $\alpha_1$  kui ka  $\beta_2$  alaühikute mRNA ekspressioon oluliselt kõrgem Wfs1-puudulikkusega homosügootsetel hiirtel võrreldes metsiktüüpi hiirtega. Samas valgu tasemes  $\alpha_1$  alaühikul erinevusi genotüüpide vahel ei täheldatud ei 2-3 kuu vanustel ega 8 kuu vanustel hiirtel. Naatriumpumba aktiivsust neerudes Wfs1-puudulikkusega hiirtel on uuritud Tartu Ülikooli bio- ja siirdemeditsiini instituudi biokeemia osakonnas ning on leitud, et geenmutatsiooniga hiirtel on pumba aktiivsus madalam kui metsiktüüpi hiirtel. Statistiliselt oluline erinevus leiti ainult heterosügootsetel Wfs1-puudulikkusega hiirtel. Naatriumpumba aktiivsuse langus ei peegeldu alaühikute mRNA ja valgu taseme muutustes.  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaasi  $\beta_1$  alaühik on glükosüleeritud, seega võivad olla mõjutatud posttranskriptsioonilised mehhanismid, mis reguleerivad valgu aktiivsust. Seetõttu on edasisteks eesmärkideks uurida ka  $\beta_1$  alaühiku valgu taset neerudes nii 2-3 kuu vanustel kui ka vanematel hiirtel.

Käesolevas töös leidsime, et Wfs1-puudulikkuse korral on erinevate naatriumpumba alaühikute ekspressioonid muutunud erinevalt. Muutused ekspressioonis võivad olla tingitud sellest, et WFS1 on oluline naatriumpumba alaühikute stabiilsuse tagamisel ning Wfs1-puudulikkuse korral on suurenenud naatriumpumba alaühikute ekspressioon, et ka suurenenud degradatsiooni tingimustes tagada organi normaalne funktsioneerimine.

# KOKKUVÕTE

Mutatsioonid *WFS1* geenis põhjustavad autosomaalset retsessiivset pärilikku haigust Wolframi sündroomi. On näidatud, et *WFS1* mõjutab  $\text{Ca}^{2+}$  regulatsiooni ning osaleb ER-stressi vastuses (Fonseca *et al.*, 2010). Lisaks sellele on kirjeldatud volframiini interaktsiooni  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaasi  $\beta_1$  alaühikuga (Zatyka *et al.*, 2008). Sellest tulenevalt uurisime käesolevas töös naatriumpumba erinevate alaühikute mRNA ekspressiooni *Wfs1*-puudulikkusega homosügootsetel ja heterosügootsetel hiirtel võrreldes metsiktüüpi loomadega. Kvantitatiivse reaalaja PCR-iga teostasime naatriumpumba  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  ja  $\beta_2$  mRNA ekspressiooni hiire südames ning  $\alpha_1$  ja  $\beta_1$  ekspressiooni hiire neerudes. Uurisime ka  $\alpha_1$  alaühiku valgu taset homosügootsete *Wfs1*-puudulikkusega ja metsiktüüpi hiirte neerudes ja südames.

Leidsime, et homosügootsetel *Wfs1*-puudulikkusega hiirtel oli südames märgatavalt tõusnud  $\beta_1$  mRNA ekspressiooni tase ning neerudes nii  $\alpha_1$  kui ka  $\beta_1$  ekspressioonitase võrreldes metsiktüüpi hiirtega. Valgu tasemel ei leidnud me neerudes  $\alpha_1$  alaühiku ekspressioonis muutusi ei 2-3 kuu vanustel ega ka 8 kuu vanustel hiirtel. 8 kuu vanuste homosügootsete *Wfs1*-puudulikkusega hiirte südames leidsime aga  $\alpha_1$  valgu tasemes statistiliselt olulise languse võrreldes metsiktüüpi hiirtega.

Edaspidi on plaanis uurida naatriumpumba erinevate alaühikute ekspressioone südame ja neeru erinevates struktuurides *Wfs1*-puudulikkusega hiirtel ja metsiktüüpi hiirtel eesmärgiga kirjeldada täpsemalt naatriumpumba erinevate isovormide funktsioone ning näidata, millistes struktuurides on ekspresseerunud erinevad naatriumpumba alaühikud.

## Changes in the sodium pump subunit expressions in the hearts and kidneys of Wfs1-deficient mice

Helis Guske

### SUMMARY

Wolfram syndrome is a rare hereditary recessive disease caused by mutations in the *WFS1* gene. Wolfram syndrome causes diabetes mellitus, diabetes insipidus, optic atrophy and deafness (Khanim *et al.*, 2001).

It has been shown that ER-stress causes apoptosis in different cell lines. WFS1 is involved in ER-stress and protects cells from death (Fonseca *et al.*, 2010). It has been shown that Wolframin is a molecular partner of sodium-potassium ATPase  $\beta_1$  subunit and it is necessary for the stability of sodium-pump subunits (Zatyka *et al.*, 2008; Gharanei *et al.*, 2013).

The goal of the present work was to study the mRNA expression and protein levels of different sodium-potassium ATPase subunits in homozygous Wfs1-deficient mice, heterozygous Wfs1-deficient mice and wild type mice. We analyzed mRNA expressions of the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  and  $\beta_2$  in the mouse heart and  $\alpha_1$  and  $\beta_1$  in the mouse kidney. We also analyzed  $\alpha_1$  subunit protein levels in mouse heart and kidney.

We found that  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase  $\beta_1$  subunit expression level in the mouse heart was significantly higher in homozygous Wfs1-deficient mice when compared to wild type mice. In the mouse kidney we observed statistically significant increase in the mRNA expression of homozygous Wfs1-deficient mice in both  $\alpha_1$  and  $\beta_1$  subunits when compared to wild type animals. On protein level we found no difference in the expression of  $\alpha_1$  subunit in the homozygous Wfs1-deficient mouse kidney when compared to wild type mice. In the hearts of eight-month-old Wfs1-deficient mice there was a significant decrease in  $\alpha_1$  expression when compared to wild type mice.

# KASUTATUD KIRJANDUS

Al-Khalili, L., O. Kotova, H. Tsuchida, I. Ehren, E. Feraille, A. Krook and A. V. Chibalin (2004). ERK1/2 mediates insulin stimulation of Na(+),K(+)-ATPase by phosphorylation of the alpha-subunit in human skeletal muscle cells. *J Biol Chem* 279(24): 25211-25218.

Appel, C., S. Gloor, G. Schmalzing, M. Schachner and R. R. Bernhardt (1996). Expression of a Na,K-ATPase beta 3 subunit during development of the zebrafish central nervous system. *J Neurosci Res* 46(5): 551-564.

Avila, J., D. Alvarez de la Rosa, L. M. Gonzalez-Martinez, E. Lecuona and P. Martin-Vasallo (1998). Structure and expression of the human Na,K-ATPase beta 2-subunit gene. *Gene* 208(2): 221-227.

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

Barrett, T. G., K. Poulton and S. Bunday (1995). DIDMOAD syndrome; further studies and muscle biochemistry. *J Inherit Metab Dis* 18(2): 218-220.

Barwe, S. P., M. C. Jordan, A. Skay, L. Inge, S. A. Rajasekaran, D. Wolle, C. L. Johnson, P. Neco, K. Fang, N. Rozengurt, J. I. Goldhaber, K. P. Roos and A. K. Rajasekaran (2009). Dysfunction of ouabain-induced cardiac contractility in mice with heart-specific ablation of Na,K-ATPase beta1-subunit. *J Mol Cell Cardiol* 47(4): 552-560.

Cryns, K., T. A. Sivakumaran, J. M. Van den Ouweland, R. J. Pennings, C. W. Cremers, K. Flothmann, T. L. Young, R. J. Smith, M. M. Lesperance and G. Van Camp (2003). Mutational spectrum of the WFS1 gene in Wolfram syndrome, nonsyndromic hearing impairment, diabetes mellitus, and psychiatric disease. *Hum Mutat* 22(4): 275-287.

Fonseca, S. G., S. Ishigaki, C. M. Osowski, S. Lu, K. L. Lipson, R. Ghosh, E. Hayashi, H. Ishihara, Y. Oka, M. A. Permutt and F. Urano (2010). Wolfram syndrome 1 gene negatively regulates ER stress signaling in rodent and human cells. *J Clin Invest* 120(3): 744-755.

Fonseca, S. G., F. Urano, G. C. Weir, J. Gromada and M. Burcin (2012). Wolfram syndrome 1 and adenylyl cyclase 8 interact at the plasma membrane to regulate insulin production and secretion. *Nat Cell Biol* 14(10): 1105-1112.

- Gharanei, S., M. Zatyka, D. Astuti, J. Fenton, A. Sik, Z. Nagy and T. G. Barrett (2013). Vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase V1A subunit is a molecular partner of Wolfram syndrome 1 (WFS1) protein, which regulates its expression and stability. *Hum Mol Genet* 22(2): 203-217.
- Hofmann, S., C. Philbrook, K. D. Gerbitz and M. F. Bauer (2003). Wolfram syndrome: structural and functional analyses of mutant and wild-type wolframin, the WFS1 gene product. *Hum Mol Genet* 12(16): 2003-2012.
- James, P. F., I. L. Grupp, G. Grupp, A. L. Woo, G. R. Askew, M. L. Croyle, R. A. Walsh and J. B. Lingrel (1999). Identification of a specific role for the Na,K-ATPase alpha 2 isoform as a regulator of calcium in the heart. *Mol Cell* 3(5): 555-563.
- Kaplan, J. H. (2002). Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annu Rev Biochem* 71: 511-535.
- Khanim, F., J. Kirk, F. Latif and T. G. Barrett (2001). WFS1/wolframin mutations, Wolfram syndrome, and associated diseases. *Hum Mutat* 17(5): 357-367.
- Lingrel, J. B. and T. Kuntzweiler (1994). Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase. *J Biol Chem* 269(31): 19659-19662.
- Luuk, H., M. Plaas, S. Raud, J. Innos, S. Sutt, H. Lasner, U. Abramov, K. Kurrikoff, S. Koks and E. Vasar (2009). Wfs1-deficient mice display impaired behavioural adaptation in stressful environment. *Behav Brain Res* 198(2): 334-345.
- Magyar, J. P., U. Bartsch, Z. Q. Wang, N. Howells, A. Aguzzi, E. F. Wagner and M. Schachner (1994). Degeneration of neural cells in the central nervous system of mice deficient in the gene for the adhesion molecule on Glia, the beta 2 subunit of murine Na,K-ATPase. *J Cell Biol* 127(3): 835-845.
- McDonough, A. A., J. B. Velotta, R. H. Schwinger, K. D. Philipson and R. A. Farley (2002). The cardiac sodium pump: structure and function. *Basic Res Cardiol* 97 Suppl 1: I19-24.
- Mishra, N. K., Y. Peleg, E. Cirri, T. Belogus, Y. Lifshitz, D. R. Voelker, H. J. Apell, H. Garty and S. J. Karlish (2011). FXYD proteins stabilize Na,K-ATPase: amplification of specific phosphatidylserine-protein interactions. *J Biol Chem* 286(11): 9699-9712.
- Nordquist, L., K. Shimada, T. Ishii, D. T. Furuya, A. Kamikawa and K. Kimura (2010). Proinsulin C-peptide prevents type-1 diabetes-induced decrease of renal Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase alpha1-subunit in rats. *Diabetes Metab Res Rev* 26(3): 193-199.

- Osman, A. A., M. Saito, C. Makepeace, M. A. Permutt, P. Schlesinger and M. Mueckler (2003). Wolframin expression induces novel ion channel activity in endoplasmic reticulum membranes and increases intracellular calcium. *J Biol Chem* 278(52): 52755-52762.
- Pavlovic, D., W. Fuller and M. J. Shattock (2007). The intracellular region of FXYD1 is sufficient to regulate cardiac Na/K ATPase. *FASEB J* 21(7): 1539-1546.
- Pavlovic, D., W. Fuller and M. J. Shattock (2013). Novel regulation of cardiac Na pump via phospholemman. *J Mol Cell Cardiol* 61: 83-93.
- Pavlovic, D., A. R. Hall, E. J. Kennington, K. Aughton, A. Boguslavskyi, W. Fuller, S. Despa, D. M. Bers and M. J. Shattock (2013). Nitric oxide regulates cardiac intracellular Na(+) and Ca(2)(+) by modulating Na/K ATPase via PKCepsilon and phospholemman-dependent mechanism. *J Mol Cell Cardiol* 61: 164-171.
- Raud, S., S. Sutt, H. Luuk, M. Plaas, J. Innos, S. Koks and E. Vasar (2009). Relation between increased anxiety and reduced expression of alpha1 and alpha2 subunits of GABA(A) receptors in Wfs1-deficient mice. *Neurosci Lett* 460(2): 138-142.
- Schwinger, R. H., H. Bundgaard, J. Muller-Ehmsen and K. Kjeldsen (2003). The Na, K-ATPase in the failing human heart. *Cardiovasc Res* 57(4): 913-920.
- Schwinger, R. H., J. Wang, K. Frank, J. Muller-Ehmsen, K. Brixius, A. A. McDonough and E. Erdmann (1999). Reduced sodium pump alpha1, alpha3, and beta1-isoform protein levels and Na+,K+-ATPase activity but unchanged Na+-Ca2+ exchanger protein levels in human heart failure. *Circulation* 99(16): 2105-2112.
- Segall, L., S. E. Daly and R. Blostein (2001). Mechanistic basis for kinetic differences between the rat alpha 1, alpha 2, and alpha 3 isoforms of the Na,K-ATPase. *J Biol Chem* 276(34): 31535-31541.
- Strom, T. M., K. Hortnagel, S. Hofmann, F. Gekeler, C. Scharfe, W. Rabl, K. D. Gerbitz and T. Meitinger (1998). Diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy and deafness (DIDMOAD) caused by mutations in a novel gene (wolframin) coding for a predicted transmembrane protein. *Hum Mol Genet* 7(13): 2021-2028.
- Zatyka, M., C. Ricketts, G. da Silva Xavier, J. Minton, S. Fenton, S. Hofmann-Thiel, G. A. Rutter and T. G. Barrett (2008). Sodium-potassium ATPase 1 subunit is a molecular partner

of Wolframin, an endoplasmic reticulum protein involved in ER stress. *Hum Mol Genet* 17(2): 190-200.

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

Taub, M., J. E. Springate and F. Cutuli (2010). Targeting of renal proximal tubule Na,K-ATPase by salt-inducible kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 393(3): 339-344.

Tedeschi, H. (1974). Cell physiology: molecular dynamics. New York,, Academic Press.

Therien, A. G. and R. Blostein (2000). Mechanisms of sodium pump regulation. *Am J Physiol Cell Physiol* 279(3): C541-566.

Thevenod, F. and J. M. Friedmann (1999). Cadmium-mediated oxidative stress in kidney proximal tubule cells induces degradation of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase through proteasomal and endo-/lysosomal proteolytic pathways. *FASEB J* 13(13): 1751-1761.

Tiger, G. and C. J. Fowler (1991). The Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase inhibitor ouabain and the Na<sup>+</sup> ionophore monensin have opposite effects upon carbachol-stimulated inositol phospholipid breakdown in rat cerebral cortical miniprisms. *Cell Signal* 3(3): 209-213.

Tokhtaeva, E., R. J. Clifford, J. H. Kaplan, G. Sachs and O. Vagin (2012). Subunit isoform selectivity in assembly of Na,K-ATPase alpha-beta heterodimers. *J Biol Chem* 287(31): 26115-26125.

Wang, X., I. Armando, K. Upadhyay, A. Pascua and P. A. Jose (2009). The regulation of proximal tubular salt transport in hypertension: an update. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 18(5): 412-420.

Weber, P., U. Bartsch, M. Schachner and D. Montag (1998). Na,K-ATPase subunit beta1 knock-in prevents lethality of beta2 deficiency in mice. *J Neurosci* 18(22): 9192-9203.

Yamada, T., H. Ishihara, A. Tamura, R. Takahashi, S. Yamaguchi, D. Takei, A. Tokita, C. Satake, F. Tashiro, H. Katagiri, H. Aburatani, J. Miyazaki and Y. Oka (2006). WFS1-deficiency increases endoplasmic reticulum stress, impairs cell cycle progression and triggers



the apoptotic pathway specifically in pancreatic beta-cells. *Hum Mol Genet* 15(10): 1600-1609.

## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Helis Guske (sünnikuupäev: 21.05.1992),

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

Na-pumba alaühikute ekspressiooni muutused Wfs1-puudulikkusega hiirte südames ja neerudes,

mille juhendajad on Silva Sütt ja Ants Kurg,

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

Tartus, 26.05.2014