

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOGIA INSTITUUT

Silvia Jänes

**Endoplasmaatilise retiikulumi stressi geenide seos suurenenud ärevusega Wfs1-  
puudulikkusega hiirtel**

Bakalaureusetöö

Juhendajad Silva Sütt PhD

Lilian Kadaja-Saarepuu PhD

TARTU 2014

# SISUKORD

SISUKORD .....	2
LÜHENDID .....	3
SISSEJUHATUS .....	4
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	5
1.1. Wfs1 geen ja valk .....	5
1.2. Wolframi sündroom.....	5
1.3. Wfs1-puudulikkusega hiir.....	6
1.4. ER stress .....	6
1.5. ER-stressi rajad .....	7
1.5.1. GRP78 ja GRP94.....	7
1.5.2. ATF6.....	7
1.5.3. XBP-1 .....	8
1.6. WFS1 seos ER-stressiga .....	8
2. EKSPERIMENTAALNE OSA .....	11
2.1. Töö eesmärgid.....	11
2.2. Materjal ja meetodika .....	11
2.2.1. Katseloomad .....	11
2.2.2. Aju prepareerimine .....	11
2.2.3. Kvantitatiivne reaalaaja PCR .....	11
2.2.4. Valgu eraldamine.....	12
2.2.5. Immuunoblot .....	13
2.3. Tulemused.....	14
2.3.1. <i>Grp94</i> ekspressioon ja immuunblot .....	14
2.3.2. <i>Grp78</i> ekspressioon .....	16
2.3.3. <i>Atf6a</i> ekspressioon.....	18
3. ARUTELU .....	20
KOKKUVÕTE .....	22
RESUME .....	23
KASUTATUD KIRJANDUS .....	24
LIHTLITSENTS.....	31

## LÜHENDID

AC8	Adenüülaat tsüklaas 8
ATF6	Aktiveeriv transkriptsioonifaktor 6
cDNA	Komplementaarne DNA
ER	Endoplasmaatiline retiikulum
ERSE	Endoplasmaatilise retiikulumi vastuse element
GRP	Glükoosi reguleeritud proteiin
HPRT	Hüpoksantiin fosforibosüültransferaas
HRD1	Endoplasmaatilise retiikulumiga seotud valgu degradatsiooniraja E3 ubikvitiinligaas
Ire1	<i>Inositol-requiring enzyme 1</i>
mRNA	Informatsiooni ( <i>messenger</i> ) ribonukleinhape
NF-κB	Tuumafaktor kappa B
PBS	Fosfaatpuhveris soolade lahus
PCR	Polümeraasi ahelreaktsioon ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PERK	PKR-laadse endoplasmaatilise retiikulumi kinaas
PVDF	Polüvinüülideenfluoriid
RIPA	Radioimmunosadestamise katse puhver
SDS-PAGE	Naatriumdodetsüülsulfaat polüakrüülamiidgeel-elektroforees
UPR	Voltumata valgu vastus ( <i>unfolded protein response</i> )
Wfs1	Wolfram syndrome 1 (wolframiin) geen või valk
XBP1	X-box-ga seonduv valk 1
Xbp1-s	Splaissitud Xbp1 valk
Xbp1-u	Splaissimata Xbp1 valk

## SISSEJUHATUS

Wolframi sündroom on neurodegeneratiivne haigus, mis on põhjustatud mutatsioonidest *WFS1* geenis ning selle sümptomiteks on suhkru- ning magediabeet, optiline atroofia, kurtus ja polüneuropaatia (Strom *et al.*, 1998). On näidatud, et *WFS1* valk on seotud ER-stressi (endoplasmaatilise retiikulumi stressi) vastuse tekkimisega (Fonseca *et al.*, 2010).

ER-stressiks nimetatakse voltumata valkude kuhjumist ER-le, mille tulemusena käivitub UPR (voltumata valgu vastus) (Xu *et al.*, 2005). ER-stressi vastuse korral aktiveeruvad esmalt ER-i *chaperonid* GRP78 ja GRP94, mis tagavad voltunud ja voltumata valkude korrastamise, seejärel valgusüntees inhibeeritakse ning toimub ER-seoselise degradatsiooniraja induktsioon. Kui rakk ei suuda ER-stressiga toime tulla, suunatakse rakk apoptoosi (Schroder ja Kaufman, 2005; Kakiuchi *et al.*, 2007).

ATF6 on ER-stressi vastust aktiveeriv transkriptsioonifaktor (Ye *et al.*, 2000), mis on otseselt seotud *WFS1*-ga ning reguleerib ERSE aktivatsiooni ja ER-stressi vastuse tekkeks vajalike geenide ekspressiooni (Fonseca *et al.*, 2010).

Sellest tulenevalt oli käesoleva Tartu Ülikooli Bio- ja siirdemeditsiini instituudi füsioloogia osakonnas valminud töö eesmärgiks uurida ER-stressiga seotud geenide (*Grp78*, *Grp94*, *Atf6 $\alpha$* ) ekspressiooni *Wfs1*-puudulikkusega hiirte ja metsiktüüpi hiirte erinevates ajuosades stressitingimustes.

Märksõnad: ER-stress, *Wfs1*-puudulikkusega hiir, tõstetud pluss-puur, Grp, ärevus.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1. Wfs1 geen ja valk

*WFS1* asub inimesel 4. kromosoomi 16.1 piirkonnas ja koosneb kaheksast eksonist. *WFS1* kodeerib 890 aminohappe pikkust valku wolframiin, molekulmassiga 100 kDa. Wolframiin on hüdrofoobne tetrameerne valk, millel on üheksa transmembraanset domääni ning suured hüdrofiilsed piirkonnad mõlemas terminuses (Hofmann, 2003). Wolframiin on ER-i membraanis paiknev glükoproteiin (Takeda *et al.*, 2001). Endogeenset wolframiini ekspresseeritakse tugevalt ajus, südames, kopsus ning kõhunäärme  $\beta$ -rakkudes (Ishihara *et al.*, 2004; Philbrook *et al.*, 2005). Ajus ekspresseeritakse *Wfs1* kõige rohkem dorsaalses ja ventraalses striatumis, amügdalas, ajukoores, hippokampuses ning allokorteksis (Takeda *et al.*, 2001; Ishihara *et al.*, 2004; Kato *et al.*, 2008; Luuk *et al.*, 2008). Nii *WFS1* mutatsiooniga inimestel kui *Wfs1*-puudulikkusega hiirtel esineb  $\beta$ -rakkude hävimine, mis võib olla vastus ebatäpselt reguleeritud ER-stressile (Karasik *et al.*, 1989; Riggs *et al.*, 2005). Seega on *WFS1* oluline  $\beta$ -rakkude ER-i homöostaasis (Fonseca *et al.*, 2012).

## 1.2. Wolframi sündroom

Wolframi sündroom on autosomaalne retsessiivne haigus, mis on põhjustatud mutatsioonidest *WFS1* geenis (Inoue *et al.*, 1998; Strom *et al.*, 1998). Wolfram sündroomi (OMIM 222300) kirjeldati esmakordselt 1938. aastal, kui ühe perekonna kaheksast liikmest neljal esines juveniilne diabeet ning optiline atroofia (Wolfram ja Wagener, 1938). Sellest alates on täheldatud rohkem kui 200 sarnast juhtumit, sümptomiteks veel *diabetes insipidius* ning muud endokriinsed ja neuroloogilised häired (ataksia, nüstagmus, perifeerne neuropaatia ja vaimne alaarenemine) (Barrett *et al.*, 1995; Rigoli *et al.*, 2011). Harilikult avaldub *diabetes mellitus* inimesel elu esimesel kümnendil, optiline atroofia aga teisel (Barrett ja Bunday, 1997). Tavaliselt surevad Wolframi sündroomiga patsiendid 25 – 40 aastastel hingamisteede rikete tagajärjel, mis on põhjustanud ajutüve atroofiast (Barrett *et al.*, 1995). Sümptomite varieeruvus ja rohkus kinnitab kuuluvust progressiivsete neurodegeneratiivsete haiguste hulka, mis mõjutavad nii perifeerset kui kesknärvisüsteemi (Barrett ja Bunday, 1997). Umbes 60%-l Wolframi sündroomi patsientidel esineb erinevaid psühhiaatrilisi häireid, näiteks depressioon või psühhosis (Swift *et al.*, 1990). Isegi *Wfs1*-mutatsiooniga heterosügootidel on 26 korda suurem tõenäosus sattuda psühhiaatrilisse ravisse võrreldes mittekandjatega (Swift *et al.*, 1998).

### 1.3. Wfs1-puudulikkusega hiir

Praeguseks on loodud kaks erinevat Wfs1-puudulikkusega hiirt (Ishihara *et al.*, 2004; Luuk *et al.*, 2009). Tartu Ülikooli füsioloogia osakonnas on loodud Wfs1-puudulikkusega hiired, kellel on eemaldatud 8. ekson (Luuk *et al.*, 2009). Wfs1-puudulikud hiired on väiksema kehakaaluga kui metsiktüüpi hiired (Luuk *et al.*, 2009) ning neil on võrreldes metsiktüüpi hiirtega madalam plasmainsuliini tase (Terasmaa *et al.*, 2011). Katsetega on näidatud, et Wfs1-puudulikkusega hiirte lokomotoorne aktiivsus on metsiktüüpi hiirtest madalam (Luuk *et al.*, 2009), samas on Wfs1-puudulikkusega hiired ärevamad kui metsiktüüpi hiired (Raud *et al.*, 2009). On võimalik, et WFS1 valk omab rolli näriliste kohanemises uudes ja stressirikas keskkonnas (Luuk *et al.*, 2009).

Lisaks on loodud veel teine Wfs1-puudulikkusega hiirte liin, mille homosügootsed Wfs1-puudulikud hiired on nii välimuselt, kasvult kui ka viljakuselt normaalsed, kuid neil on vähenenud insuliini sekretsioon (Ishihara *et al.*, 2004). Lisaks esineb Wfs1-puudulikel hiirtel progressiivne  $\beta$ -rakkude kadu ning on täheldatud ka suurenenud apoptoosi pankreases (Ishihara *et al.*, 2004). Käitumiskatsed on näidanud, et Wfs1-puudulikel hiirtel on emotsionaalse käitumise arengupeatetus, vähenenud sotsiaalne interaktsioon ning muutuv käitumine vastavalt keskkonnale (Kato *et al.*, 2008).

### 1.4. ER stress

ER-is toimuvad valkude post-translatsioonilised modifikatsioonid, sünteesitud valkude voltumine ja õigesti kokkupakkimine (Rigoli *et al.*, 2011). Häired ER-i funktsioonis põhjustavad voltumata valkude kuhjumist, mille tulemusena vallandatakse voltumata valgu vastus (UPR). Seda nähtust nimetatakse ER-stressiks (Ron ja Walter, 2007; Rutkowski ja Kaufman, 2007). UPR-i esialgne eesmärk on kohaneda muutuva keskkonnaga ja taastada normaalne ER-i funktsioon. Valkude voltumise protsessi ER-is stabiliseerivad  $\text{Ca}^{2+}$ -sõltuvad molekulaarsed *chaperonid* GRP78, GRP94 ja kalretikuliin (Orrenius *et al.*, 2003; Ma ja Hendershot, 2004; Schroder ja Kaufman, 2005). Kohanemiseks vajalikud mehhanismid kaasavad transkriptsioonilisi programme, mis indutseerivad ER-i valkude voltumisvõimet taastavate geenide ekspressiooni. mRNA translatsioon on esialgu inhibeeritud, takistamaks uute valkude kuhjumist ER-le seniks, kuni UPR-valgud on olemas. Kui kohanemine ei õnnestu, aktiveeritakse NF- $\kappa$ B, mis on raku kaitseks mediaatoreid kodeerivate geenide ekspressiooni transkriptsioonifaktoriks. Pikaajaline ja tugev ER stress käivitab raku programmeeritud surma – apoptoosi (Xu *et al.*, 2005).

## 1.5. ER-stressi rajad

Normaalse ER-i talitluse eest vastutab voltumata valkude vastus (UPR), mida vahendavad transmembraansed ER-i signaalvalgud PERK, IRE1 ja ATF6 (Schroder ja Kaufman, 2005; Xu *et al.*, 2005; van Schadewijk *et al.*, 2012), mis tavatingimustes on inaktiivsed seotuna GRP78-ga (van Schadewijk *et al.*, 2012), kuid ER-stressi korral aktiveeruvad GRP78-lt vabanedes (Xu *et al.*, 2005; Ron ja Walter, 2007; van Schadewijk *et al.*, 2012).

### 1.5.1. GRP78 ja GRP94

GRP78 on 78 kDa suurune glükoos reguleeritud valkude (GRP) perekonda kuuluv, Ca<sup>2+</sup>-siduv valk (Shiu *et al.*, 1977; Liu *et al.*, 1997), mille nõrk ATPaasne aktiivsus aitab siduda voltumata valke, hoides nii ära nende agregatsiooni ER-il (McLaughlin ja Vandebroek, 2011) ja tagades ER-i homöostaasi (Suzuki *et al.*, 2007). Lisaks hoiab GRP78 ER-stressi sensoreid inaktiivses olekus (van Schadewijk *et al.*, 2012) ning kaitseb programmeeritud rakusurma eest (Kaufman, 1999).

Teine GRP perekonda kuuluv 94 kDa suurune *chaperon* GRP94 on ER-is kõige rohkem esinev glükoproteiin (Lee, 2001). GRP94 osaleb valkude pakkimisel ja degradatsioonil (Kozutsumi *et al.*, 1988; Yoshida, 1998; Christianson *et al.*, 2008), sidudes substraate pärast nende vabanemist GRP78-lt (Melnick *et al.*, 1994). On spetsiifilisem kui GRP78 (McLaughlin ja Vandebroek, 2011) ning polümorfismid *GRP94* geenis on seotud bipolaarse häirega (Kakiuchi *et al.*, 2007).

### 1.5.2. ATF6

ATF6 on 670 aminohappest koosnev UPR-spetsiifiline transkriptsioonifaktor, mis kuulub leutsiini tõmblukk valkude hulka (Hai *et al.*, 1989; Zhu *et al.*, 1997; Haze *et al.*, 1999). Imetajate rakud ekspresseerivad kaht ATF6 isovormi: ATF6 $\alpha$  ja ATF6 $\beta$  (Yamamoto *et al.*, 2007). Nii ATF6 $\alpha$  kui ATF6 $\beta$  on võimelised reguleerima kindlaid ER-stressi vastuse tekkeks vajalike geenide ekspressiooni (Haze *et al.*, 1999; Haze *et al.*, 2001). Samas on geeni väljalülitamisel hiirte embrüo fibroblastide uurimisel leitud, et ainult ATF6 $\alpha$  on ER-stressi tingimustes vajalik erinevate ER-is paiknevate *chaperonide* induksiooniks (Wu *et al.*, 2007; Yamamoto *et al.*, 2007).

ER-stressi korral vabaneb ATF6 GRP78-lt ning liigub Golgi kompleksi, kus proteaaside toimel vabaneb transkriptsioonifaktor tsütosooli ning liigub edasi tuuma, indutseerides ER-i *chaperon* valgu GRP78 ja XBP-1 transkriptsiooni (Ye *et al.*, 2000; van Schadewijk *et al.*, 2012). Lisaks ER-stressi vastuse tekke regulatsioonile on näidatud, et ATF6 võib olla seotud odontoblastide diferentseerumisega (Kim *et al.*, 2014).

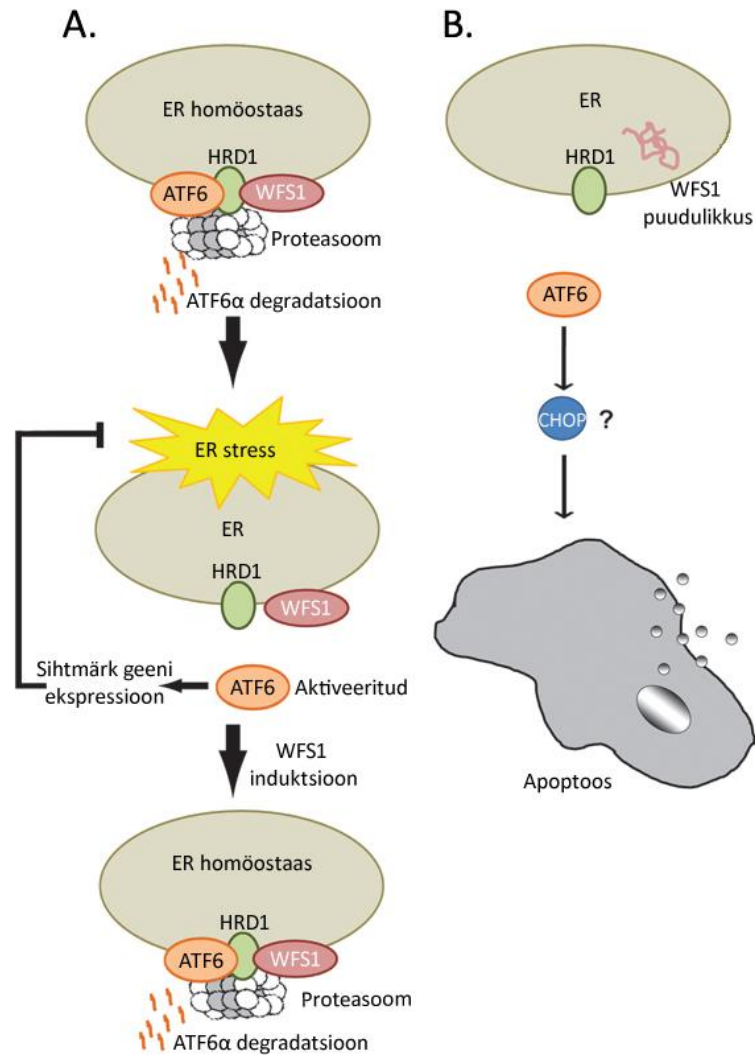
### 1.5.3. XBP-1

IRE1/XBP-1 signaalrada on vajalik efektiivseks valgu voltumiseks, küpsemiseks ja degradatsiooniks ER-is ning näitab, et UPR-i sihtmärkgeenide alamhulgad on sõltuvad XBP-1-st (Lee *et al.*, 2003). Valesti voltunud valkude äratundmisel osaleb ER-i transmembraanne kinaasne valk IRE1, mis vabanemisel GRP78-lt oligomeriseerub ER-i membraanis (Xu *et al.*, 2005) ja aktiveerub autofosforüleerumise teel. Kasutades oma endoribonukleaaset aktiivsust, valmistab IRE1 XBP-1 mRNA-st introni (Shamu ja Walter, 1996; Sidrauski *et al.*, 1996; Tirasophon *et al.*, 1998; Tirasophon, 2000; Ruegsegger *et al.*, 2001; Shen *et al.*, 2001; Yoshida *et al.*, 2001; Calfon *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002). Läbiviidav splaissimine muudab 267-aminohappelise valgu XBP-1u splaissitud 371-aminohappeliseks valguks XBP-1s, mis translokeerub tuuma, kus indutseerib *chaperon*-geenide transkriptsiooni (Shen *et al.*, 2001; Yoshida *et al.*, 2001; Calfon *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002). Ainult splaissitud vorm XBP-1s on aktiivne transkriptsioonifaktor ja XBP-1u ei oma mingisugust transaktiivset omadust (Yoshida *et al.*, 2001; Iwakoshi *et al.*, 2003).

### 1.6. WFS1 seos ER-stressiga

WFS1 on UPR komponent, mis reguleerib ER-stressi vastust (Fonseca *et al.*, 2005). Raku normaalses olekus on ATF6α WFS1 toimel seotud HRD1-ga, hoides ära ER-stressi vastuse tekke. ER-stressi korral vabaneb ATF6α HRD1-lt, liigub ER-i membraanist tuuma ja suurendab stressi leevendamiseks vajalike sihtmärkgeenide ekspressiooni. ER-stressi käivitumine indutseerib *Wfs1* ekspressiooni, mis negatiivse tagasiside kaudu surub alla ATF6α sihtmärkgeenide (sh *Grp78* ja *Xbp-1*) ekspressiooni ning ERSE aktivatsiooni. Lisaks stabiliseerib WFS1 E3 ubikvitiinligaas HRD1 ning toob ATF6α proteasoomi, kus see degradeeritakse. Selle tulemusel surutakse maha ER-stressi signaliseerimine, kaitstes sedasi rakke apoptoosi eest (Fonseca *et al.*, 2010) (Joonis 1).





**Joonis 1.** WFS1 kontrollib valgu ATF6 $\alpha$  taset ning aktivatsiooni (A). Tavaolekus aitab WFS1 ATF6 $\alpha$ -l interakteeruda HRD1-ga, mis märgistab ATF6 $\alpha$  proteasoomseks degradatsiooniks ubikvitiiniga. ER-stressi korral ATF6 $\alpha$  vabaneb, läbib proteolüüsi ning liigub tuuma, kus indutseerib ER-stressi vastuse tekkeks vajalikke geenide ekspressiooni. Hiljem indutseerib ER-stress *Wfs1* ekspressiooni, mis põhjustab ATF6 $\alpha$  degradatsiooni. Wfs1-puudulikkus põhjustab ATF6 $\alpha$  hüperaktivatsiooni, mis viib apoptoosini (B) (Fonseca *et al.*, 2010).

On näidatud, et bipolaarse häire, epilepsia ja migreeni raviks kasutatava valproaadi terapeutilised omadused võivad olla vahendatud ER-stressi moduleerimise kaudu, suurendades vaba WFS1 hulka (Kakiuchi *et al.*, 2009). Nimelt, aktiveerib valproaat *Wfs1* transkriptsiooni ja indutseerib *Wfs1* mRNA ekspressiooni närvirakus, kusjuures teiste ER-stressi markerite ekspressioonile (GRP94, GRP78, täielik ja splaissitud XBP-1 ja ATF) mõju ei avalda (Kakiuchi *et al.*, 2009). Tavatingimustes moodustab WFS1 GRP94-ga kompleksi, kuid valproaat suurendab nende vahelist dissotsiatsiooni.

Pankreases osaleb WFS1 insuliini sekretsiooni reguleerimises. Tavalises seisundis stimuleerivad glükoos ja GLP-1 WFS1 translokatsiooni ER-st plasmamembraanile, kus WFS1 moodustab kompleksi AC8 (adenülaat tsüklaas 8) ja kalmoduliiniga, stimuleerides cAMP sünteesi ning insuliini sekretsiooni. ER-stressi korral on WFS1 ER-is kinni, hoides ära AC8 ja kalmoduliini vahelise kompleksi moodustumise, inhibeerides cAMP sünteesi ning insuliini sekretsiooni (Fonseca *et al.*, 2012).

## **2. EKSPERIMENTAALNE OSA**

### **2.1. Töö eesmärgid**

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida ER-stressiga seotud geenide (*Grp78*, *Grp94*, *Atf6a*) ekspressiooni erinevates ajuosades Wfs1-puudulikkusega hiirtel ja metsiktüüpi hiirtel stressitingimustes.

### **2.2. Materjal ja metoodika**

#### **2.2.1. Katseloomad**

Katseloomadeks olid emased Tartu Ülikooli Bio- ja siirdemeditsiini instituudis füsioloogia osakonnas valmistatud Wfs1-puudulikkusega homosügootsed (Luuk *et al.*, 2009) ning kontrolliks metsiktüüpi hiired. Katseloomad, kelle geneetiline taust oli (129/SVEVS6/tac x C57bl/6J) x (129/SVEVS6/tac x C57bl/6J), paljundati ja genotüpiseeriti Tartu Ülikooli arstiteaduskonna füsioloogia osakonnas. Loomi vanusega 3 – 4 kuud hoiti puurides 8-10 kaupa 12-h/12-h valge/pime tsüklis 22°C juures (valge tsükkel algas kell 7 hommikul). Hiirtel oli vaba ligipääs toidule ja veele ning loomkatsed toimusid kella 10:00 ja 17:00 vahel. Kõik katsed teostati Eesti Vabariigi põllumajandusministeeriumi poolt välja antud loa alusel (number 88, välja antud 25.august 2011).

#### **2.2.2. Aju prepareerimine**

Katseloomad surmati tservikaalse dislokatsiooni teel. Kolju jahutati vedelas lämmastikus ning eemaldati aju. Aju prepareeriti jääl, mille käigus eraldati oimusagar, ventraalne striatum, hippokampus ja frontaalkoor. Eraldatud struktuurid külmutati vedelas lämmastikus ning säilitati temperatuuril -80 °C.

#### **2.2.3. Kvantitatiivne reaalaaja PCR**

RNA eraldamiseks kasutati Trizol reagenti (Invitrogen) ning cDNA sünteesimiseks Superscript III pöördtranskriptaasi (Invitrogen) ja oligo dT18 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. Praimerid sünteesiti programmiga Primer Express™ (PE Applied Biosystems, Foster City, California, USA) ekson-ekson ühenduskohtadesse vältimaks genoomse DNA ekspressiooni. Praimerite järjestused ja Taqman sondid on toodud tabelis 1. Sisemise kontrollina kasutati koduhoidja geeni *Hprt1*, mis on näidatud kui kõige efektiivsemalt ja stabiilsemalt ekspresseeruv geen (Raud *et al.*, 2009). Kasutati kahte erinevat tehnoloogiat: Taqman süsteemi (PE Applied Biosystems) ja 5 X HOT FIREPol® EvaGreen® supermixi (Solis BioDyne) fluorestseeruva märgisega puhvrit vastavalt etteantud protokollidele. EvaGreen® meetodi puhul kontrolliti praimerite spetsiifilisust ja iga reaktsiooni korral kasutati dissotsiatsioonikõverat. Kõik reaktsioonid teostati neljas korduses, et vähendada võimalikke vigu. Reaktsioonide lõppmahuks oli 10 µl, kasutades 50-100 ng cDNA-d. Paralleelselt viidi läbi kõigi nelja grupi ekspressioonid. Ekspressiooni analüüsimiseks kasutati 2-deltaCt meetodit (Livak ja Schmittgen, 2001) ning statistika teostati ühesuunalise ANOVAGA kasutades statistikaprogrammi Statistica 10 (StatSoft, USA).

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

Geen	Assay ID või järjestus	Geeni ID
Atf6a	Mm01295317_m1	NM_001081304
Grp94	Mm00441927_m1	NM_011631
Grp78_for	5'-CATAAACCCCGATGAGGCTGTA-3'	NM_022310
Grp78_rev	5'-CACCTGTATCCTGATCACCAGAGA-3'	
Grp78_probe	5'-FAM-TGGTGCCGCTGTCCAGGCTG-MGB-3'	
Hprt1_for	5'-GCAGTACAGCCCCAAAATGG-3'	NM_013556
Hprt1_rev	5'-AACAAAGTCTGGCCTGTATCCAA-3'	
Hprt1_probe (VIC_TAMRA)	5'-VIC-AAGCTTGCTGGTGAAAAGGACCTCTCG TAMRA-3'	

#### 2.2.4. Valgu eraldamine

Eemaldatud oimusagara proovid homogeniseeriti sonikeerimise teel RIPA puhvris (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1 % SDS, 0.5% Sodium deoxycholate, 1% Triton X-100), kuhu lisati 1mM proteaasi inhibiitor kokteili (Sigma). Proovid tsentrifugeeriti seejärel 10 minutit 10000 g juures ning säilitati -80°C juures. Valgu kontsentratsiooni mõõtmiseks kasutati BCA kitti (Pierce, Rockford, IL, USA).

### **2.2.5. Immuunoblot**

Valguproovid (40 ng) lahutati 10%-lise SDS-PAGE meetodil ja kanti seejärel üle PVDF membraanile (Renart *et al.*, 1979; Towbin *et al.*, 1979), mida blokeeriti 5% lõssipulbri lahusega. Seejärel inkubeeriti membraanid spetsiifilise primaarse antikehaga: GRP94 (1:5000; Cell Signaling) või  $\beta$ -aktiin (1:10000, Cell Signaling) üleöö loksutil +4°C juures. Membraani pesti 3x10 minutit PBST-s ning seejärel inkubeeriti 1 h toatemperatuuril HRP-ga konjugeeritud jänese IgG sekundaarse antikeha lahusega (lahjendusega 1:10000). Tulemuste detekteerimiseks kasutati ECL reagenti (Pierce, Rockford, IL, USA). Tulemusi analüüsiti MultiGauge (FujuFilm) programmiga ja huvipakkuva valgu hulka võrreldi aktiini hulgaga.

## 2.3. Tulemused

### 2.3.1. *Grp94* ekspressioon ja immuunblot

*Grp94* ekspressioonitaset võrreldi pluss-puuris käinud homosügootsetel *Wfs1*-puudulikkusega ja metsiktüüpi hiirtel võrreldes kodupuurist võetud sama genotüübiga loomadega nii ventraalses striaatumis, frontaalkoores, hippokampuses kui ka oimusagaras.

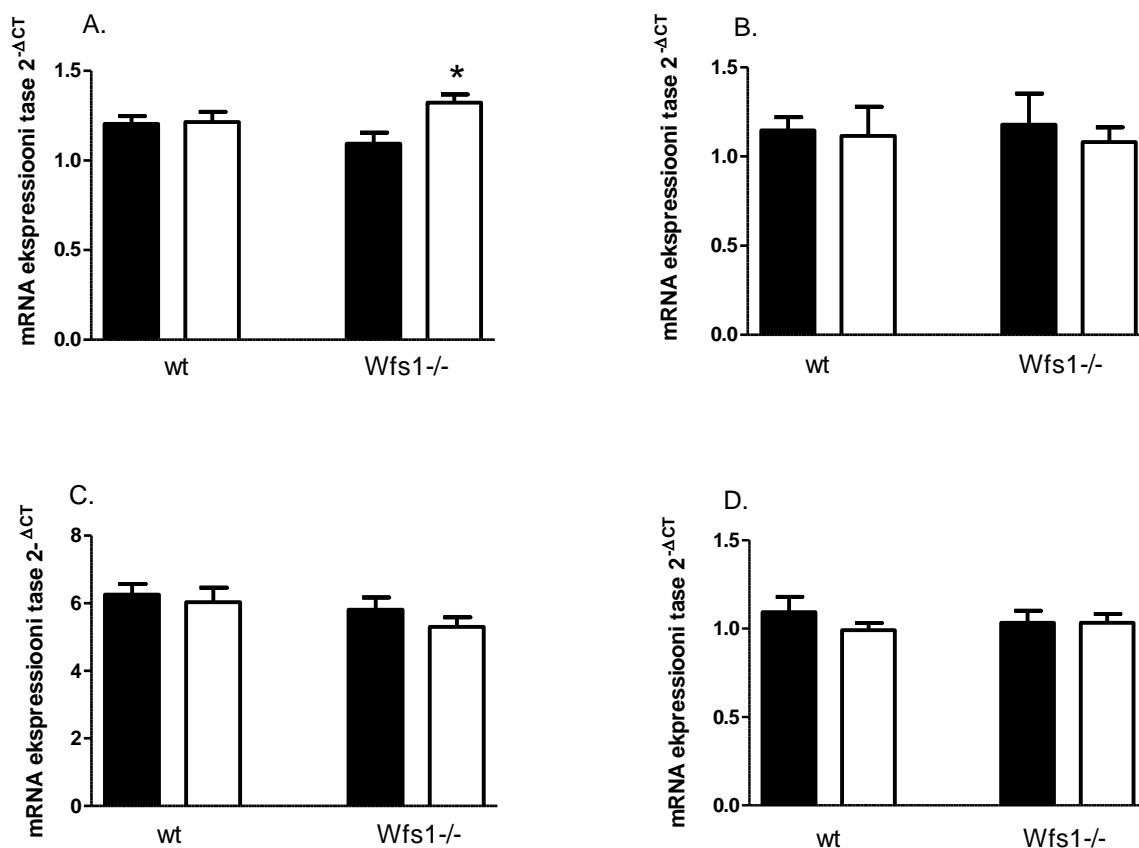
Ventraalses striaatumis võis *Wfs1*-puudulikkusega homosügootsetel pluss-puuri hiirtel täheldada statistiliselt olulist *Grp94* mRNA ekspressiooni tõusu võrreldes kontrollgrupi *Wfs1*-puudulikkusega homosügootsete hiirtega ( $F(1;20)=3,167$ ;  $p=0,028$ ). *Grp94* ekspressiooni tase *Wfs1*-puudulikkusega homosügootsetel pluss-puuris käinud loomadel oli kõrgem võrreldes kontrollgrupi metsiktüüpi ( $F(1;20)=3,167$ ;  $p=0,403$ ) ja pluss-puuris käinud metsiktüüpi hiirtega ( $F(1;20)=3,167$ ;  $p=0,480$ ). Homosügootsete *Wfs1*-puudulikkusega hiirte *Grp94* ekspressioonitasemes oli näha langust võrreldes kontrollgrupi metsiktüüpi hiirte ( $F(1;20)=3,167$ ;  $p=0,465$ ) ja metsiktüüpi pluss-puuris käinud hiirtega ( $F(1;20)=3,167$ ;  $p=0,390$ ), kuid tulemused ei olnud statistiliselt olulised. Pluss-puuris käinud metsiktüüpi hiirtel oli *Grp94* ekspressioon sarnane kontrollgrupi metsiktüüpi hiirte omaga ( $F(1;20)=3,167$ ;  $p=0,999$ ) (Joonis 3. A).

Frontaalkoores ei esinenud uuritud genotüüpide vahel *Grp94* ekspressioonis statistiliselt olulisi erinevusi. Küll aga võis täheldada sarnast ekspressioonitaset pluss-puuris käinud *Wfs1*-puudulikkusega homosügootsetel hiirtel võrreldes kontrollgrupi metsiktüüpi hiirtega ( $F(1;23)=0,1075$ ;  $p=0,983$ ), pluss-puuris käinud metsiktüüpi hiirtega ( $F(1;23)=0,1075$ ;  $p=0,997$ ) ja homosügootsete *Wfs1*-puudulikkusega kontrollgrupi hiirtega ( $F(1;23)=0,1075$ ;  $p=0,949$ ). Samuti ei esinenud olulist erinevust homosügootsete *Wfs1*-puudulikkusega ja kontrollgrupi metsiktüüpi hiirte vahel ( $F(1;23)=0,1075$ ;  $p=0,999$ ) ega ka *Wfs1*-puudulikkusega homosügootsete ja pluss-puuris käinud metsiktüüpi hiirte ( $F(1;23)=0,1075$ ;  $p=0,987$ ) ning pluss-puuris käinud metsiktüüpi hiirte ning kontrollgrupi metsiktüüpi hiirte vahel ( $F(1;23)=0,1075$ ;  $p=0,998$ ) (Joonis 3. B).

Hippokampuses võis täheldada *Grp94* ekspressiooni taseme langust pluss-puuris käinud *Wfs1*-puudulikkusega homosügootsetel hiirtel võrreldes kontrollgrupi metsiktüüpi hiirtega ( $F(1;24)=1,3692$ ;  $p=0,309$ ), pluss-puuri metsiktüüpi hiirtega ( $F(1;24)=1,3692$ ;  $p=0,356$ ) ja *Wfs1*-puudulike homosügootsete hiirtega ( $F(1;24)=1,3692$ ;  $p=0,783$ ). Küllaltki sarnast geeniekspressiooni taset võis märgata *Wfs1*-puudulikkusega homosügootsetel hiirtel võrreldes kontrollgrupi metsiktüüpi ( $F(1;24)=1,3692$ ;  $p=0,862$ ) ja pluss-puuri metsiktüüpi

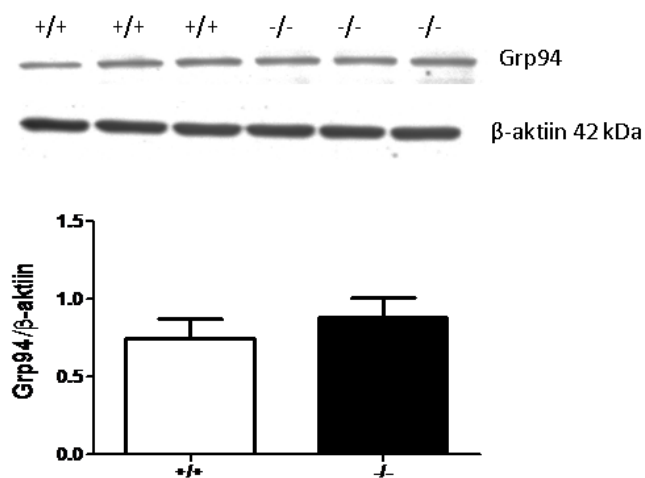
hiirtega ( $F(1;24)=1,3692$ ;  $p=0,927$ ) ning pluss-puuris käinud metsiktüüpi hiirtel võrreldes kontrollgrupi metsiktüüpi hiirte omaga ( $F(1;24)=1,3692$ ;  $p=0,996$ ) (Joonis 3. C).

Oimusagaras võis täheldada *Grp94* ekspressiooni taseme langust pluss-puuris käinud *Wfs1*-puudulikkusega homosügootsetel hiirtel võrreldes kontrollgrupi metsiktüüpi hiirtega ( $F(1;24)=0,389$ ;  $p=0,794$ ) ning pluss-puuris käinud metsiktüüpi hiirtel võrreldes kontrollgrupi metsiktüüpi hiirtega ( $F(1;24)=0,389$ ;  $p=0,769$ ), kuid tulemused polnud statistiliselt olulised. Sarnast *Grp94* mRNA ekspressioonitaset võis täheldada pluss-puuris käinud *Wfs1*-puudulikkusega homosügootsetel hiirtel võrreldes pluss-puuris käinud metsiktüüpi hiirtega ( $F(1;24)=0,389$ ;  $p=0,999$ ) ja *Wfs1*-puudulikkusega homosügootidega ( $F(1;24)=0,389$ ;  $p=0,997$ ) ning *Wfs1*-puudulikkusega homosügootidel võrreldes kontrollgrupi metsiktüüpi hiirtega ( $F(1;24)=0,389$ ;  $p=0,925$ ) ning pluss-puuri metsiktüüpi hiirtega ( $F(1;24)=0,389$ ;  $p=0,995$ ) (Joonis 3. D).



**Joonis 3.** Tõestatud pluss-puuri mõju metsiktüüpi (wt) ja *Wfs1*-puudulikkusega homosügootsetel hiirtel (*Wfs1*<sup>-/-</sup>) *Grp94* ekspressioonile ventraalne striatum (A), frontaalkoor (B), hippokampus (C), oimusagar (D). Igas grupis 6-8 looma. Mustad tulbad – kontrollgrupp, valged tulbad – tõstetud pluss-puuri hiired; \* $p<0.05$ , võrreldes sama genotüübi kontrollgrupi hiirtega

GRP94 valgu avaldumine Wfs1-puudulikkusega homosügootide oimusagaras oli kõrgem kui kontrollgrupi metsiktüüpi hiirtel ( $F(1;13)=0,54139$ ;  $p=0,475101$ ), kuid tulemus ei olnud statistiliselt oluline (Joonis 4).



**Joonis 4.** GRP94 valgu tase oimusagaras Wfs1-puudulikkusega homosügootsel (-/-) ja metsiktüüpi (+/+) hiirtel.

### 2.3.2. *Grp78* ekspressioon

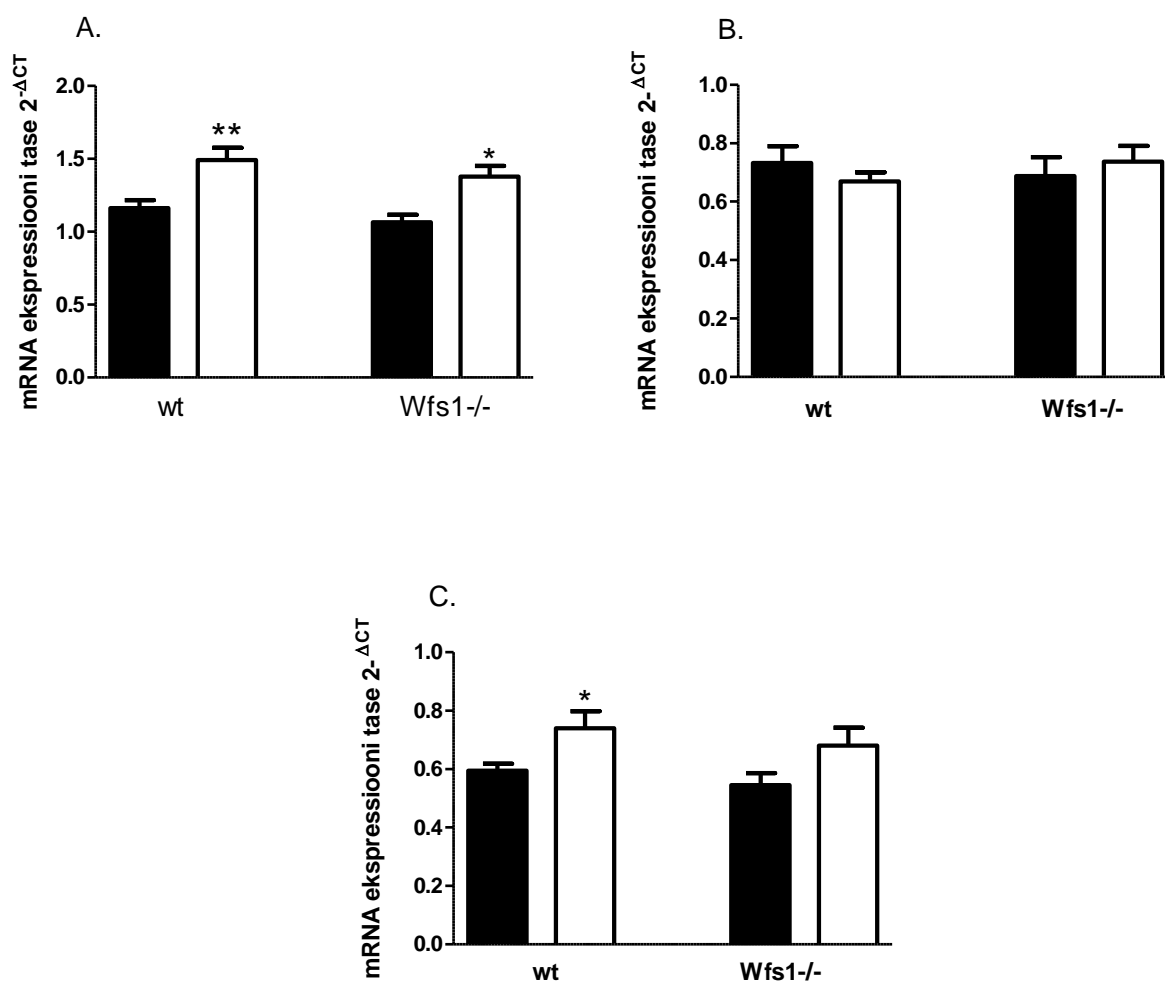
*Grp78* ekspressioonitaset võrreldi pluss-puuris käinud homosügootsetel Wfs1-puudulikkusega ja metsiktüüpi hiirtel võrreldes kodupuurist võetud sama genotüübiga loomadega ventraalses striaatumis, frontaalkoores ja hippokampuses.

Ventraalses striaatumis oli *Grp78* mRNA ekspressioon statistiliselt oluliselt tõusnud pluss-puuris käinud Wfs1-puudulikkusega homosügootsetel hiirtel võrreldes kontrollgrupi Wfs1-puudulikkusega homosügootidega ( $F(1; 24)=8,878$ ;  $p=0,016$ ), pluss-puuris käinud metsiktüüpi hiirtel võrreldes kontrollgrupi homosügootsete Wfs1-puudulikkusega hiirtega ( $F(1; 24)=8,878$ ;  $p=0,0007$ ) ning pluss-puuris käinud metsiktüüpi hiirtel võrreldes kontrollgrupi metsiktüüpi hiirtega ( $F(1; 24)=8,878$ ;  $p=0,009$ ). Lisaks täheldati kõrgemat *Grp78* ekspressiooni taset pluss-puuris käinud Wfs1-puudulikkusega homosügootsetel hiirtel võrreldes kontrollgrupi metsiktüüpi hiirtega ( $F(1; 24)=8,878$ ;  $p=0,151$ ), pluss-puuris käinud metsiktüüpi hiirtel võrreldes pluss-puuris käinud homosügootsete Wfs1-puudulikkusega hiirtega ( $F(1; 24)=8,878$ ;  $p=0,658$ ) ja kontrollgrupi metsiktüüpi hiirtel võrreldes kontrollgrupi homosügootsete Wfs1-puudulikkusega hiirtega ( $F(1;24)=8,878$ ;  $p=0,721$ ), kuid need tulemused ei olnud statistiliselt olulised (Joonis 5. A).

Frontaalkoores olid *Grp78* ekspressioonitasemed sarnased pluss-puuris käinud Wfs1-puudulikkusega homosügootsetel hiirtel võrreldes kontrollgrupi metsiktüüpi ( $F(1; 19)=0,3551$ ;  $p=0,999$ ) ja kontrollgrupi Wfs1-puudulikkusega homosügootidega ( $F(1;$



19)=0,3551; p=0,917) ning kontrollgrupi homosügootsetel *Wfs1*-puudulikkusega hiirtel võrreldes nii kontrollgrupi metsiktüüpi hiirtega ( $F(1; 19)=0,3551$ ;  $p=0,937$ ) kui ka pluss-puuris käinud metsiktüüpi hiirtega ( $F(1; 19)=0,3551$ ;  $p=0,995$ ). Väga väikest *Grp78* ekspressioonitaseme tõusu oli märgata pluss-puuris käinud homosügootsete *Wfs1*-puudulikkusega hiirtel võrreldes pluss-puuris käinud metsiktüüpi hiirtega ( $F(1; 19)=0,3551$ ;  $p=0,830$ ) ja kontrollgrupi metsiktüüpi hiirtel võrreldes pluss-puuris käinud metsiktüüpi hiirtega ( $F(1; 19)=0,3551$ ;  $p=0,858$ ), kuid need tulemused polnud statistiliselt olulised (Joonis 5. B).

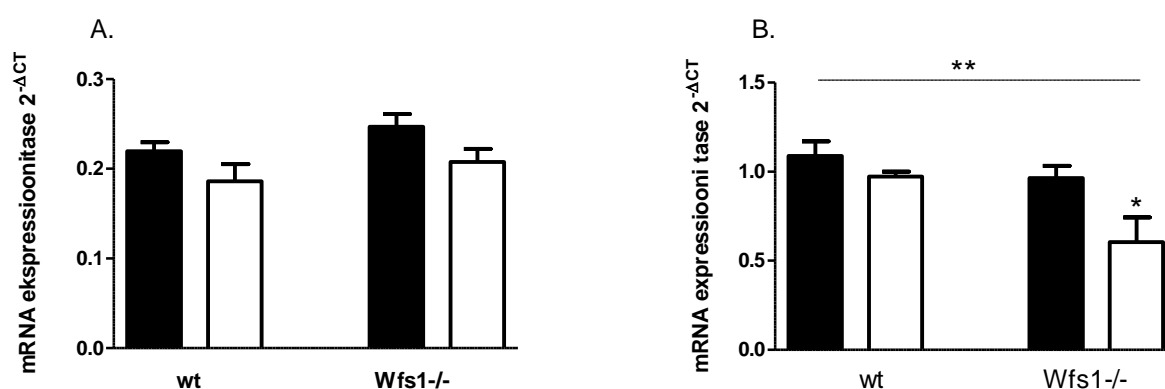


**Joonis 5.** Tõstetud pluss-puuri mõju metsiktüüpi (wt) ja *Wfs1*-puudulikkusega homosügootsetel hiirtel (*Wfs1*<sup>-/-</sup>) *Grp78* ekspressioonile ventraalne striatum (A), frontaalkoor (B), hippokampus (C). Mustad tulbad – kontrollgrupp, valged tulbad – tõstetud pluss-puuri hiired; \* $p < 0.05$ , võrreldes sama genotüübi kontrollgrupi hiirtega

Hippokampuses näitasime statistiliselt olulist *Grp78* mRNA ekspressiooni langust kontrollgrupi *Wfs1*-puudulikkusega homosügootsetel hiirtel võrreldes pluss-puuris käinud metsiktüüpi hiirtega ( $F(1;20)=3,1644$ ;  $p=0,048$ ). *Grp78* ekspressioonitaseme märgatavat tõusu võis täheldada pluss-puuris käinud homosügootsetel *Wfs1*-puudulikkusega hiirtel võrreldes kontrollgrupi *Wfs1*-puudulikkusega homosügootsete hiirtega ( $F(1;20)=3,1644$ ;  $p=0,239$ ) ja pluss-puuris käinud metsiktüüpi hiirtel võrreldes kontrollgrupi metsiktüüpi hiirtega ( $F(1;20)=3,1644$ ;  $p=0,184$ ) ning väiksemat tõusu pluss-puuris käinud *Wfs1*-puudulikkusega homosügootsetel hiirtel võrreldes kontrollgrupi metsiktüüpi hiirtega ( $F(1;20)=3,1644$ ;  $p=0,605$ ). Madalam *Grp78* ekspressioon esines pluss-puuris käinud *Wfs1*-puudulikkusega homosügootsetel hiirtel võrreldes pluss-puuris käinud metsiktüüpi hiirtega ( $F(1;20)=3,1644$ ;  $p=0,824$ ) ja kontrollgrupi homosügootsete *Wfs1*-puudulikkusega hiirtel võrreldes kontrollgrupi metsiktüüpi hiirtega ( $F(1;20)=3,1644$ ;  $p=0,894$ ), kuid tulemused polnud statistiliselt olulised (Joonis 5. C)

### 2.3.3. *Atf6a* ekspressioon

*Atf6a* ekspressioonitaset võrreldi pluss-puuris käinud homosügootsetel *Wfs1*-puudulikkusega ja metsiktüüpi hiirtel võrreldes kodupuurist võetud sama genotüübiga loomadega nii frontaalkoores kui hippokampuses.



**Joonis 6.** Tõestatud pluss-puuri mõju metsiktüüpi (wt) ja *Wfs1*-puudulikkusega homosügootsetel hiirtel (*Wfs1*<sup>-/-</sup>) *Atf6a* ekspressioonile frontaalkoor (A), hippokampus (B). Mustad tulbad – kontrollgrupp, valged tulbad – tõstetud pluss-puuri hiired; \* $p<0.05$ , võrreldes sama genotüübi kontrollgrupi hiirtega,  $p<0.01$ , võrreldes metsiktüüpi kontrollgrupi hiirtega

Frontaalkoores oli oluliselt kõrgem *Atf6a* ekspressiooni tase kontrollgrupi *Wfs1*-puudulikkusega homosügootsetel hiirtel võrreldes pluss-puuris käinud metsiktüüpi hiirtega

( $F(1;22)=2,7245$ ;  $p=0,047$ ). Lisaks täheldati kõrgemat ekspressioonitaset pluss-puuris käinud Wfs1-puudulikkusega homosügootsetel hiirtel võrreldes pluss-puuris käinud metsiktüüpi hiirtega ( $F(1;22)=2,7245$ ;  $p=0,729$ ), kontrollgrupi homosügootsetel Wfs1-puudulikkusega hiirtel võrreldes kontrollgrupi metsiktüüpi hiirtega ( $F(1;22)=2,7245$ ;  $p=0,625$ ), kontrollgrupi metsiktüüpi hiirtel võrreldes pluss-puuris käinud metsiktüüpi hiirtega ( $F(1;22)=2,7245$ ;  $p=0,429$ ) ja kontrollgrupi Wfs1-puudulikkusega homosügootidel võrreldes pluss-puuris käinud homosügootsete Wfs1-puudulikkusega hiirtega ( $F(1;22)=2,7245$ ;  $p=0,297$ ), kuid tulemused polnud statistiliselt olulised. *Atf6a* ekspressioon pluss-puuris käinud Wfs1-puudulikkusega homosügootsetel hiirtel oli sarnane kontrollgrupi metsiktüüpi hiirtega ( $F(1;22)=2,7245$ ;  $p=0,946$ ) (Joonis 6. A).

Hippokampuses oli *Atf6a* ekspressioon pluss-puuris käinud Wfs1-puudulikkusega homosügootsetel hiirtel väga oluliselt madalam võrreldes kontrollgrupi metsiktüüpi hiirtega ( $F(1;22)=5,5299$ ;  $p=0,007$ ), pluss-puuris käinud metsiktüüpi hiirtega ( $F(1;22)=5,5299$ ;  $p=0,023$ ) ja kontrollgrupi Wfs1-puudulikkusega homosügootsete hiirtega ( $F(1;22)=5,5299$ ;  $p=0,043$ ). *Atf6a* ekspressioon oli natuke madalam kontrollgrupi homosügootsetel Wfs1-puudulikkusega hiirtel võrreldes kontrollgrupi metsiktüüpi hiirtega ( $F(1;22)=5,5299$ ;  $p=0,808$ ) ning pluss-puuris käinud metsiktüüpi hiirtel võrreldes kontrollgrupi metsiktüüpi hiirtega ( $F(1;22)=5,5299$ ;  $p=0,811$ ), kuid tulemused polnud statistiliselt olulised. Kontrollgrupi Wfs-puudulikkusega homosügootsete hiirte *Atf6a* ekspressioonitase oli sarnane pluss-puuris käinud metsiktüüpi hiirte omale ( $F(1;22)=5,5299$ ;  $p=0,999$ ) (Joonis 6. B).

### 3. ARUTELU

Käesoleva töö eesmärgiks oli kirjeldada ER-stressiga seotud geenide ekspressiooni erinevates ajuosades *Wfs1*-puudulikkusega hiirtel ja metsiktüüp hiirtel stressitingimustes. Varasemalt kirjeldatud töödes on tõestatud WFS1 osalemist ER-stressi signaliseerimisel (Fonseca *et al.*, 2010) ja on näidatud, et valproaadi manustamisel suureneb *Wfs1* ekspressioon ning GRP94 ja WFS1 vaheline dissotsiatsioon (Kakiuchi *et al.*, 2009). Samuti on näidatud GRP78 ja GRP94 ekspressioonitaseme tõus *Wfs1*-puudulikkusega hiirte pankrease  $\beta$ -rakkudes (Yamada *et al.*, 2006).

Antud töös uurisime *Grp94*, *Grp78* ja *Atf6a* ekspressiooni pluss-puuris käinud homosügootsetel *Wfs1*-puudulikkusega ja metsiktüüpi hiirtel võrreldes kodupuurist võetud sama genotüübiga loomadega. Leidsime, et ajuosades, kus on kõrge *Wfs1* ekspressiooni tase, on muutunud ER-stressiga seotud geenide ekspressioon tõstetud pluss-puuris käinud loomadel. Varasemad katsed Tartu Ülikooli füsioloogia osakonnas on näidanud, et *Wfs1*-homosügootsed hiired on tõstetud pluss-puuri katses oluliselt ärevamad võrreldes metsiktüüp hiirtega. Nimelt, sisenevad nad vähem avatud õlgadele, eelistades suletud õlgadel viibimist. Samas, diasepaam suurendab *Wfs1*-homosügootsetel hiirtel avatud õlgadele sisenemisi (Raud *et al.*, 2009).

Eelnevalt on näidatud, et WFS1 on ER membraanis otseselt seotud GRP94-ga, reguleerides ER-stressi vastust (Fonseca *et al.*, 2010). Antud töö tulemused näitasid, et pluss-puuris käinud *Wfs1*-puudulikkusega homosügootsetel hiirtel on ventraalses striatumis oluliselt kõrgem *Grp94* ekspressioonitase võrreldes sama genotüübi naiivsete loomadega, samas kui metsiktüüpi hiirtel ei olnud erinevust gruppide vahel. Teistes uuritud ajustruktuurides (hippokampus, oimusagar, frontaalkoor) *Grp94* ekspressiooni olulist muutust genotüüpide vahel ei täheldatud. Valgu tasemel (GRP94) ei olnud erinevust oimusagaras metsiktüüpi ja *Wfs1*-puudulikkusega homosügootsetel hiirtel.

GRP78 osaleb ER-stressi signaliseerimisel, hoides signaalvalke inaktiivsetena (van Schadewijk *et al.*, 2012). Meie saadud tulemused näitasid ventraalses striatumis mõlema genotüübi korral pluss-puuri efekti *Grp78* ekspressioonile. Nimelt oli *Grp78* mRNA ekspressioon oluliselt tõusnud mõlemal pluss-puuris käinud genotüübil võrreldes kontrollgrupi hiirtega. Hippokampuses oli *Grp78* ekspressioon pluss-puuris käinud metsiktüüpi hiirel oluliselt kõrgem võrreldes kontrollgrupi *Wfs1*-puudulikkusega homosügootsete hiirtega, ning jällegi võis täheldada pluss-puuri efekti ekspressioonile.

Varasemalt on näidatud, et WFS1 valk ekspresseerub tugevamalt stressiga seotud ajupiirkondades nagu ventraalne striatum ja hippokampus (Luuk *et al.*, 2008). Võib oletada,

et just seetõttu toimusidki pluss-puuris käinud loomade vastavates ajupiirkondades olulised muutused GRP valkude ekspressioonis.

ATF6 $\alpha$  on üks kolmest olulisest ER-stressi vastuses osalevast sensorist, mis interakteerub WFS1-ga (Fonseca *et al.*, 2010). Võrdlesime *Atf6 $\alpha$*  mRNA ekspressiooni tasemete erinevusi tõstetud pluss-puuris käinud *Wfs1*-puudulikkusega loomadel ja metsiktüüpi hiirtel frontaalkoores ning hippokampuses. Näitasime, et hippokampuses oli *Atf6 $\alpha$*  ekspressiooni tase pluss-puuris käinud *Wfs1*-puudulikkusega homosügootidel oluliselt madalam võrreldes nii kontrollrühma metsiktüüpi kui *Wfs1*-homosügootsete hiirtega. Kuna ATF6 indutseerib tuumas ER-stressi leevendamiseks vajalike sihtmärkgeenide ekspressiooni (Fonseca *et al.*, 2010) ning selle ekspressioonitase pluss-puuris käinud *Wfs1*-puudulikkusega homosügootidel oli hippokampuses tunduvalt madalam kui teistel genotüüpidel, võib järeldada, et ärevamate loomade rakud ei saa ER-stressiga hakkama ning viiakse tõenäoliselt apoptoosi.

## KOKKUVÕTE

Wolframi sündroomi põhjustavad mutatsioonid *WFS1* geenis ning on näidatud, et *WFS1* valk osaleb ER-stressi vastuse tekkel reguleerides valkude *GRP78*, *GRP94* ja *ATF6a* ekspressiooni (Fonseca *et al.*, 2010). Käesolevas töös uurisime ER-i *chaperonide* *GRP78* ja *GRP94* ning UPR-spetsiifilise *ATF6a* ekspressiooni erinevates ajuosades tõstetud pluss-puuris käinud *Wfs1*-puudulikkusega homosügootsetel ja kontrollgrupi hiirtel võrreldes metsiktüüpi hiirtega. Varasemad katsed näitavad, et *Wfs1*-homosügootsed hiired on oluliselt ärevamad tõstetud pluss-puuri katses võrreldes metsiktüüp hiirtega. Käesolevas töös leidsime, et ventraalses striatumis oli nii *Grp94* kui *Grp78* ekspressioon pluss-puuris käinud hiirtel kõrgem võrreldes kontrollgrupi hiirtega. Lisaks oli *Grp78* ekspressioon oluliselt kõrgem ka pluss-puuris käinud metsiktüüpi hiirte hippokampuses võrreldes kontrollgrupi *Wfs1*-puudulikkusega homosügootsete hiirtega.

Statistiliselt olulist langust võis täheldada veel *Atf6a* ekspressiooni pluss-puuris käinud *Wfs1*-puudulikkusega homosügootide hippokampuses võrreldes kontrollgrupi metsiktüüpi ja *Wfs1*-puudulikkusega hiirtega.

Käesolevas töös tuvastasime suuremaid muutusi nii *Grp78*, *Grp94* kui *Atf6a* ekspressioonil pluss-puuris käinud *Wfs1*-puudulikkusega homosügootide ja metsiktüüpi hiirte ning samade genotüüpide naiivsete vormide vahel ning leidsime, et *Wfs1*-puudulikkus mõjutab suurenenud ärevusega loomadel ER-stressiga seotud geenide ekspressiooni erinevates ajuosades.

## Changes of endoplasmatic reticulum stress genes in *Wfs1*-deficient mice with increased anxiety

Silvia Jänes

### RESUME

Wolfram syndrome is a neurodegenerative disease caused by the mutations in the *WFS1* gene. The symptoms include juvenile diabetes mellitus and diabetes insipidus, optic atrophy, deafness and peripheral neuropathy (Strom *et al.*, 1998).

Endoplasmatic reticulum (ER) is responsible for the post-translational modification, folding and assembling of newly synthesized proteins (Rigoli *et al.*, 2011). The disturbances in ER functions cause unfolded protein response (UPR) (Ron ja Walter, 2007; Rutkowski ja Kaufman, 2007). In case of ER stress, there firstly is induction of chaperones GRP78 and GRP94 which promotes the folded and unfolded proteins. It is followed by inhibition of protein synthesis and induction of an ER-associated degradation pathway. If the cell cannot cope with ER stress the apoptosis is induced (Schroder ja Kaufman, 2005; Kakiuchi *et al.*, 2007). *WFS1* interacts with ATF6 and negatively regulates the expression of ATF6 target genes and ERSE activation.

The goal of the present work was to determine the levels of mRNA expression of some ER-stress related genes in different parts of homozygous *Wfs1*-deficient and wildtype mice after exposure to the elevated plus-maze (EPM). We analyzed mRNA expression levels of *Grp78*, *Grp94* and *Atf6a*.

We found that *Grp94* and *Grp78* expressional levels in ventral striatum were significantly higher in *Wfs1*-deficient mice after exposure to the EPM compared to the naive animals of the same genotype. Furthermore, the *Grp78* expression level in hippocampus was also higher in *Wfs1*-deficient mice after EPM exposure compared to the naive animals. The *Atf6a* expression level was significantly lower in hippocampus in the case of *Wfs1*-deficient mice after EPM exposure compared to the naive wildtype and homozygotes.

In the present work we identified important changes in the gene expression levels of *Grp78*, *Grp94* and *Atf6a* in *Wfs1*-deficient homozygous mice after exposure to the EPM. We found that *Wfs1*-deficiency affects ER stress-related gene expression in different parts of mouse brain with increased anxiety.

## KASUTATUD KIRJANDUS

Barrett, T. G., Bunday, S. E. (1997). Wolfram (DIDMOAD) syndrome. *J Med Genet* 34(10): 838-841.

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

Calfon, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J. H., Hubbard, S. R., Harding, H. P., Clark, S. G., Ron, D. (2002). IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* 415(6867): 92-96.

Christianson, J. C., Shaler, T. A., Tyler, R. E., Kopito, R. R. (2008). OS-9 and GRP94 deliver mutant alpha1-antitrypsin to the Hrd1-SEL1L ubiquitin ligase complex for ERAD. *Nat Cell Biol* 10(3): 272-282.

Fonseca, S. G., Fukuma, M., Lipson, K. L., Nguyen, L. X., Allen, J. R., 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(47): 39609-39615.

Fonseca, S. G., Ishigaki, S., Osowski, C. M., Lu, S., Lipson, K. L., Ghosh, R., Hayashi, E., Ishihara, H., Oka, Y., Permutt, M. A., Urano, F. (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., Urano, F., Weir, G. C., Gromada, J., Burcin, M. (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.

Hai, T. W., Liu, F., Coukos, W. J., Green, M. R. (1989). Transcription factor ATF cDNA clones: an extensive family of leucine zipper proteins able to selectively form DNA-binding heterodimers. *Genes & Development* 3(12b): 2083-2090.

Haze, K., Okada, T., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T., Negishi, M., Mori, K. (2001). Identification of the G13 (cAMP-response-element-binding protein-related protein) gene product related to activating transcription factor 6 as a transcriptional activator of the mammalian unfolded protein response. *Biochem J* 355(Pt 1): 19-28.



Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T., Mori, K. (1999). Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell* 10(11): 3787-3799.

Hofmann, S. (2003). Wolfram syndrome: structural and functional analyses of mutant and wild-type wolframin, the WFS1 gene product. *Human Molecular Genetics* 12(16): 2003-2012.

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, M. A. (1998). A gene encoding a transmembrane protein is mutated in patients with diabetes mellitus and optic atrophy (Wolfram syndrome). *Nat Genet* 20(2): 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(11): 1159-1170.

Iwakoshi, N. N., Lee, A. H., Vallabhajosyula, P., Otipoby, K. L., Rajewsky, K., Glimcher, L. H. (2003). Plasma cell differentiation and the unfolded protein response intersect at the transcription factor XBP-1. *Nat Immunol* 4(4): 321-329.

Kakiuchi, C., Ishigaki, S., Osowski, C. M., Fonseca, S. G., Kato, T., Urano, F. (2009). Valproate, a mood stabilizer, induces WFS1 expression and modulates its interaction with ER stress protein GRP94. *PLoS One* 4(1): e4134.

Kakiuchi, C., Ishiwata, M., Nanko, S., Kunugi, H., Minabe, Y., Nakamura, K., Mori, N., Fujii, K., Umekage, T., Tochigi, M., Kohda, K., Sasaki, T., Yamada, K., Yoshikawa, T., Kato, T. (2007). Association analysis of HSP90B1 with bipolar disorder. *J Hum Genet* 52(10): 794-803.

Karasik, A., O'Hara, C., Srikanta, S., Swift, M., Soeldner, J. S., Kahn, C. R., Herskowitz, R. D. (1989). Genetically programmed selective islet beta-cell loss in diabetic subjects with Wolfram's syndrome. *Diabetes Care* 12(2): 135-138.

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(2): 143-158.

Kaufman, R. J. (1999). Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum. coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes & Development* 13(12):11-1233).

Kim, J. W., Choi, H., Jeong, B. C., Oh, S. H., Hur, S. W., Lee, B. N., Kim, S. H., Nor, J. E., Koh, J. T., Hwang, Y. C. (2014). Transcriptional Factor ATF6 is Involved in Odontoblastic Differentiation. *J Dent Res* 93(5): 483-489.

Kozutsumi, Y., Segal, M., Normington, K., Gething, M. J., Sambrook, J. (1988). The presence of malfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature* 332(6163): 462-464.

Lee, A. H., Iwakoshi, N. N., Glimcher, L. H. (2003). XBP-1 Regulates a Subset of Endoplasmic Reticulum Resident Chaperone Genes in the Unfolded Protein Response. *Molecular and Cellular Biology* 23(21): 7448-7459.

Lee, A. S. (2001). The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. *Trends Biochem Sci* 26(8): 504-510.

Lee, K., Tirasophon, W., Shen, X., Michalak, M., Prywes, R., Okada, T., Yoshida, H., Mori, K., Kaufman, R. J. (2002). IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. *Genes Dev* 16(4): 452-466.

Liu, H., Bowes, R. C., 3rd, van de Water, B., Sillence, C., Nagelkerke, J. F., Stevens, J. L. (1997). Endoplasmic reticulum chaperones GRP78 and calreticulin prevent oxidative stress, Ca<sup>2+</sup> disturbances, and cell death in renal epithelial cells. *J Biol Chem* 272(35): 21751-21759.

Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔC(T)</sup> Method. *Methods* 25(4): 402-408.

Luuk, H., Koks, S., Plaas, M., Hannibal, J., Rehfeld, J. F., 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(6): 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(2): 334-345.
- Ma, Y., Hendershot, L. M. (2004). ER chaperone functions during normal and stress conditions. *J Chem Neuroanat* 28(1-2): 51-65.
- McLaughlin, M., Vandenbroeck, K. (2011). The endoplasmic reticulum protein folding factory and its chaperones: new targets for drug discovery? *Br J Pharmacol* 162(2): 328-345.
- Melnick, J., Dul, J. L., Argon, Y. (1994). Sequential interaction of the chaperones BiP and GRP94 with immunoglobulin chains in the endoplasmic reticulum. *Nature* 370(6488): 373-375.
- Orrenius, S., Zhivotovsky, B., Nicotera, P. (2003). Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(7): 552-565.
- Philbrook, C., Fritz, E., Weiher, H. (2005). Expressional and functional studies of Wolframin, the gene function deficient in Wolfram syndrome, in mice and patient cells. *Exp Gerontol* 40(8-9): 671-678.
- Raud, S., Sutt, S., Luuk, H., Plaas, M., Innos, J., Koks, S., Vasar, E. (2009). Relation between increased anxiety and reduced expression of alpha1 and alpha2 subunits of GABA(A) receptors in Wfs1-deficient mice. *Neurosci Lett* 460(2): 138-142.
- Renart, J., Reiser, J., Stark, G. R. (1979). Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(7): 3116-3120.
- Riggs, A. C., Bernal-Mizrachi, E., Ohsugi, M., Wasson, J., Fatrai, S., Welling, C., Murray, J., Schmidt, R. E., Herrera, P. L., Permutt, M. A. (2005). Mice conditionally lacking the Wolfram gene in pancreatic islet beta cells exhibit diabetes as a result of enhanced endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Diabetologia* 48(11): 2313-2321.
- Rigoli, L., Lombardo, F., Di Bella, C. (2011). Wolfram syndrome and WFS1 gene. *Clin Genet* 79(2): 103-117.
- Ron, D., Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(7): 519-529.

- Ruegsegger, U., Leber, J. H., Walter, P. (2001). Block of HAC1 mRNA translation by long-range base pairing is released by cytoplasmic splicing upon induction of the unfolded protein response. *Cell* 107(1): 103-114.
- Rutkowski, D. T., Kaufman, R. J. (2007). That which does not kill me makes me stronger: adapting to chronic ER stress. *Trends Biochem Sci* 32(10): 469-476.
- Schroder, M., Kaufman, R. J. (2005). ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res* 569(1-2): 29-63.
- Shamu, C. E., Walter, P. (1996). Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *EMBO J* 15(12): 3028-3039.
- Shen, X., Ellis, R. E., Lee, K., Liu, C. Y., Yang, K., Solomon, A., Yoshida, H., Morimoto, R., Kurnit, D. M., Mori, K., Kaufman, R. J. (2001). Complementary signaling pathways regulate the unfolded protein response and are required for *C. elegans* development. *Cell* 107(7): 893-903.
- Shiu, R. P., Pouyssegur, J., Pastan, I. (1977). Glucose depletion accounts for the induction of two transformation-sensitive membrane proteins in Rous sarcoma virus-transformed chick embryo fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(9): 3840-3844.
- Sidrauski, C., Cox, J. S., Walter, P. (1996). tRNA ligase is required for regulated mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell* 87(3): 405-413.
- Strom, T. M., Hortnagel, K., Hofmann, S., Gekeler, F., Scharfe, C., Rabl, W., Gerbitz, K. D., 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(13): 2021-2028.
- Suzuki, T., Lu, J., Zahed, M., Kita, K., Suzuki, N. (2007). Reduction of GRP78 expression with siRNA activates unfolded protein response leading to apoptosis in HeLa cells. *Arch Biochem Biophys* 468(1): 1-14.
- Swift, R. G., Polymeropoulos, M. H., Torres, R., Swift, M. (1998). Predisposition of Wolfram syndrome heterozygotes to psychiatric illness. *Mol Psychiatry* 3(1): 86-91.

Swift, R. G., Sadler, D. B., Swift, M. (1990). Psychiatric findings in Wolfram syndrome homozygotes. *Lancet* 336(8716): 667-669.

Zhu, C., Johansen, F. E., Prywes, R. (1997). Interaction of ATF6 and serum response factor. *Mol Cell Biol* 17(9): 4957-4966.

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(5): 477-484.

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. *J Physiol Biochem* 67(3): 381-390.

Tirasophon, W. (2000). The endoribonuclease activity of mammalian IRE1 autoregulates its mRNA and is required for the unfolded protein response. *Genes & Development* 14(21): 2725-2736.

Tirasophon, W., Welihinda, A. A., Kaufman, R. J. (1998). A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. *Genes & Development* 12(12): 1812-1824.

Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(9): 4350-4354.

van Schadewijk, A., van't Wout, E. F., Stolk, J., Hiemstra, P. S. (2012). A quantitative method for detection of spliced X-box binding protein-1 (XBP1) mRNA as a measure of endoplasmic reticulum (ER) stress. *Cell Stress Chaperones* 17(2): 275-279.

Wolfram, D. D., Wagener, H. P. (1938). Diabetes mellitus and simple optic atrophy among siblings: report of four cases. *Mayo Clin Proc* 13: 715-718.

Wu, J., Rutkowski, D. T., Dubois, M., Swathirajan, J., Saunders, T., Wang, J., Song, B., Yau, G. D., Kaufman, R. J. (2007). ATF6alpha optimizes long-term endoplasmic reticulum function to protect cells from chronic stress. *Dev Cell* 13(3): 351-364.

Xu, C., Bailly-Maitre, B., Reed, J. C. (2005). Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest* 115(10): 2656-2664.

Yamada, T., Ishihara, H., Tamura, A., Takahashi, R., Yamaguchi, S., Takei, D., Tokita, A., Satake, C., Tashiro, F., Katagiri, H., Aburatani, H., Miyazaki, J., Oka, Y. (2006). WFS1-deficiency increases endoplasmic reticulum stress, impairs cell cycle progression and triggers the apoptotic pathway specifically in pancreatic beta-cells. *Hum Mol Genet* 15(10): 1600-1609.

Yamamoto, K., Sato, T., Matsui, T., Sato, M., Okada, T., Yoshida, H., Harada, A., Mori, K. (2007). Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6alpha and XBP1. *Dev Cell* 13(3): 365-376.

Ye, J., Rawson, R. B., Komuro, R., Chen, X., Dave, U. P., Prywes, R., Brown, M. S., Goldstein, J. L. (2000). ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol Cell* 6(6): 1355-1364.

Yoshida, H. (1998). Identification of the cis-Acting Endoplasmic Reticulum Stress Response Element Responsible for Transcriptional Induction of Mammalian Glucose-regulated Proteins. INVOLVEMENT OF BASIC LEUCINE ZIPPER TRANSCRIPTION FACTORS. *Journal of Biological Chemistry* 273(50): 33741-33749.

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(7): 881-891.

## LIHTLITSENTS

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

Mina, Silvia Jänes (sünnikuupäev: 14.11.1992)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihlitsentsi) enda loodud teose, „Endoplasmaatilise retiikulumi stressi geenide seos suurenenud ärevusega Wfs1-puudulikkusega hiirtel“, mille juhendajad on Silva Sütt ja Lilian Kadaja-Saarepuu.
  - 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 lihlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.2014