

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Agnes Rikk

**GABA-ergilise süsteemi geenide ekspressiooni muutused Wfs1-  
puudulikkusega hiirtel**

Bakalaureusetöö

Juhendajad Silva Sütt PhD

Lilian Kadaja-Saarepuu PhD

TARTU 2014

## SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID .....	3
SISSEJUHATUS .....	4
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....	5
1.1 Wfs1 iseloomustamine .....	5
1.1.1 Wolframi sündroom .....	5
1.1.2 Wfs1 geen ja valk .....	6
1.1.3 Wfs1-puudulikkusega hiired .....	7
1.2 Ärevus ja stress .....	7
1.2.1 Ärevuse ja stressiga seotud rajad ajus .....	7
1.2.2 Wfs1 seos ärevuse ja stressiga .....	8
1.3 GABA-ergiline süsteem .....	9
1.3.1 GABA-ergilise süsteemi üldiseloomustus .....	9
1.3.2 GABA retseptorid .....	10
2 EKSPERIMENTAALNE OSA .....	12
2.1 Töö eesmärgid .....	12
2.2 Materjal ja meetodika .....	12
2.2.1 Katseloomad .....	12
2.2.2 Etanooli manustamine .....	12
2.2.3 Aju prepareerimine .....	13
2.2.4 RNA eraldamine, cDNA süntees .....	13
2.2.5 Kvantitatiivne reaalkaja-PCR .....	13
2.2.6 Statistika .....	13
2.3 Tulemused .....	15
2.3.1 Gabra alaühikute ekspressioon oimusagaras .....	15
2.3.2 Gabra alaühikute ekspressioon prefrontaalses koos .....	16
2.3.3 Gabra alaühikute ekspressioon hipokampuses .....	17
2.3.4 Gabra3 alaühiku ekspressioon tõstetud pluss-puuri katses .....	18
2.4 Arutelu .....	20
KOKKUVÕTE .....	22
SUMMARY .....	23
KASUTATUD KIRJANDUS .....	24
LIHTLITSENTS .....	31

## KASUTATUD LÜHENDID

AC8	Adenüültsüklaas 8
CA1	<i>Cornu Ammonis</i> 1
cAMP	Tsükliline adenosinmonofosfaat
cDNA	Komplementaarne DNA
DIDMOAD	<i>Diabetes Insipidus, Diabetes Mellitus, Optic Atrophy, Deafness</i>
ER	Endoplasmaatiline retiikulum
GABA	$\gamma$ -aminovõihape
Gabra	$\gamma$ -aminovõihape retseptori $\alpha$ alaühik
GAD	Glutamaadi dekarboksülaas
GR	Glükokortikoid retseptor
HPRT	Hüpoksantiin-guaaniin fosforibosültransferaas
MR	Mineralokortikoid retseptor
PCR	Polümeraasne ahelreaktsioon
SERT	Serotoniini transporter
WFS1	Wolframi sündroom 1 geen või valk inimesel
Wfs1	Wolframi sündroom 1 geen või valk inimesest erineval liigil
WT	Wild type (metsiktüüpi)
5-HT	5-hüdroksütrüptamiin ehk serotoniin

## SISSEJUHATUS

Wolframi sündroom on autosomaalne retsessiivne haigus, mille põhjustajaks on mutatsioon *WFS1* geenis (Strom *et al.*, 1998). *WFS1* kodeerib 890 aminohappe suurust valku wolframiin (Hofmann *et al.*, 2003). Wolframi sündroom põhjustab diabeeti, nägemisnärvide atroofiat, kurtust ja enamasti Wolframi sündroomiga inimesi kannatab psühhiaatriliste häirete all (Swift *et al.*, 1990; Strom *et al.*, 1998).

*Wfs1*-puudulikkusega hiired on väiksema kehakaaluga ja neil on suurenenud ärevus stressirohkes keskkonnas võrreldes metsiktüüpi hiirtega (Luuk *et al.*, 2009). Peale selle on *Wfs1*-defektsetel hiirtel langenud GABA<sub>A</sub> retseptori  $\alpha 1$  ja  $\alpha 2$  mRNA alaühiku ekspressioon oimusagaras ja prefrontaalses koos (Raud *et al.*, 2009). Manustades *Wfs1*-puudulikkusega hiirtele diasepaami, mis on GABA<sub>A</sub> retseptori antagonist, vähenes närilistel ärevus tõstetud pluss-puuri katses. Samuti on *Wfs1*-puudulikkusega hiirtel vähenenud tundlikus amfetamiinile võrreldes metsiktüüpi pesakaaslastega, kuid neil on suurenenud tundlikus apomorfiinile (Luuk *et al.*, 2009).

Antud bakalaureusetöö eesmärkideks on uurida *Wfs1*-puudulikkusega hiirtel etanooli toimemehhanisme, mis on seotud GABA<sub>A</sub> retseptorite erinevate alatüüpidega.

Käesolev töö teostati Tartu Ülikooli Bio- ja siirdemeditsiini instituudis füsioloogia osakonnas.

Märksõnad: *Wfs1*, GABA-ergiline süsteem, GABA<sub>A</sub> retseptor, etanool, ärevus

# 1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 Wfs1 iseloomustamine

### 1.1.1 Wolframi sündroom

Wolframi sündroomi (MIM 2223000) esmakirjeldajateks olid Wolfram ja Wagener, kes teatasid neljast haigusjuhtumist aastal 1938 (Wolfram ja Wagner, 1938). Wolframi sündroom, akronüümiga DIDMOAD (*diabetes insipidius, diabetes mellitus, optic atrophy, deafness*), on autosomaalne retsessiivne haigus, mida iseloomustab varajane diabeet, magediabeet, nägemisnärv atroofia ja erinevad neuroloogilised sümptomid, nagu kurtus, ataksia ja perifeerne neuropaatia. Sündroom on kõige paremini kirjeldatav kui neurodegeneratiivne häire, mis on seotud kesknärvisüsteemiga, perifeersetel närvide ja neuroendokriinsete kudede (Strom *et al.*, 1998).

Magediabeet avaldub keskmiselt 6-aastaselt. Mikrovaskulaarsed tüsistused esinevad harva ning arenevad aeglasemalt I tüüpi diabeedi korral (Kinsley *et al.*, 1995). Progressiivne nägemisnärv atroofia avaldub keskmiselt 11. eluaastal. Keskmise eluiga Wolframi sündroomi põdevatel inimestel on 30 aastat. Surma põhjuseks on tsentraalne hingamispuudulikkus ja sekundaarne neerupuudulikkuse infektsioon (Barrett ja Bunday, 1997).

60% Wolframi sündroomiga inimesi kannatab psühhiaatriliste häirete all, enim esineb depressiooni, psühhoosi, impulsiivsust ja agressiivsust (Swift *et al.*, 1990). Heterosügootsetel *WFS1* mutatsiooni kandjatel on tõenäosus psühhiaatriliste häirete tekkele 26 korda kõrgem (Swift ja Swift, 2000). On näidatud, et polümorfismid *WFS1* geenis muudavad inimesed vastuvõtlikumaks meeleoluhäiretele (Swift ja Swift, 2000; Koido *et al.*, 2005; Swift ja Swift, 2005). Meeleoluhäireid on seostatud muutustega serotoniini, noradrenaliini ja dopamiinergilises süsteemis (Matto *et al.*, 2011; Visnapuu *et al.*, 2013).

Wolframi sündroomi keskmine sagedus Inglismaal on 1/770 000 ja Põhja-Ameerikas märgatavalt vähem, 1/100 000 (Barrett *et al.*, 1995; Kinsley *et al.*, 1995).

### 1.1.2 Wfs1 geen ja valk

*WFS1* paikneb inimesel neljanda kromosoomi 16.ndas piirkonnas (4p16.1) ja koosneb kaheksast eksonist (ekson 1 on mittekodeeriv). Enamik Wolframi sündroomi põhjustavaid mutatsioone on leitud 8. eksonis (Hardy *et al.*, 1999; Hansen *et al.*, 2005; Cano *et al.*, 2007). *WFS1* kodeerib 890 aminohappe suurust (100 kDa), endoplasmaatilise retiikulumi (ER) glükoproteiini wolframiin (Cryns *et al.*, 2003; Hofmann *et al.*, 2003). Sekundaarstruktuuri ennustuste järgi on wolframiinil kolm struktuurset domääni: hüdrofoobne tsentraalne domään, mis sisaldab 9-10 membraani toestavat segmenti, millega külgneb hüdrofiilne domään N-terminaalses otsas ja hüdrofiilne karboksüülne saba (Hofmann *et al.*, 2003).

Wfs1 ekspressiooni tase on eriti kõrge ajus, pankreases, südames ja insuliini sekreteeritavates  $\beta$ -rakkudes. Nii inimestel kui ka hiirtel põhjustab wolframiini puudulikkus pankrease  $\beta$ -rakkude vähenemist, mis on tingitud  $\beta$ -rakkude suurenenud apoptoosist, kuna rakud ei tule toime ER-stressiga (Karasik *et al.*, 1989; Riggs *et al.*, 2005; Yamada *et al.*, 2006). Wfs1 on seega oluline insuliini tootvate pankrease  $\beta$ -rakkude ellujäämiseks ja funktsioneerimiseks (Luuk *et al.*, 2009).

Ajus ekspresseeritakse Wfs1 valku suurtes kogustes ventraalses juttkehas, hipokampuse CA1 regioonis, laiendatud amügdalas, haisteköbrikeses, piriform koore teises kihis ja vähemal määral juttkeha tagumises osas (Owens *et al.*, 2005; Luuk *et al.*, 2009).

Wolframiini üheks funktsiooniks võib olla osalemine  $\text{Ca}^{2+}$  homöostaasi reguleerimisel (Takei *et al.*, 2006). Wfs1 C-terminaalne domään interakteerub  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPaasi  $\beta 1$  alaühikuga (Zatyka *et al.*, 2008). Seetõttu võib oletada, et wolframiin osaleb Na-pumba  $\beta 1$  alaühiku küpsemisel.

WFS1 translokeerub glükoosi toimel pankrease  $\beta$ -rakkude ER membraanist plasmamembraani ja interakteerub kaltsiumist sõltuva adenüültsüklaas 8-ga (AC8) ja kalmoduliiniga, mille tagajärjel suureneb cAMP produktsioon, mis reguleerib insuliini tootmist ja sekretsiooni. Mutatsioonid *WFS1* geenis, Wfs1 valgu puudumine või ER stress põhjustavad cAMP produktsiooni vähenemist ja selle tulemusena on häiritud insuliini vabastamine glükoosi manustamisel. See mehhanism võib olla põhjuseks II tüüpi diabeedi tekkel Wolframi sündroomi patsientidel (Fonseca *et al.*, 2012).

### 1.1.3 Wfs1-puudulikkusega hiired

Praeguseks on loodud kaks erinevat Wfs1-puudulikkusega hiirte liini (Ishihara *et al.*, 2004; Luuk *et al.*, 2009).

Tartu Ülikooli Bio- ja siirdemeditsiini instituudis füsioloogia osakonnas loodud hiirtel on välja lülitatud 8. ekson. Nad on väiksema kehakaaluga kui metsiktüüpi hiired. Samuti on Wfs1-puudulikkusega hiirtel vähenenud tundlikkus amfetamiinile ja suurenenud tundlikkus apomorfiinile. Amfetamiini stimuleeriv toime on Wfs1-puudulikkusega hiirtel nõrgem, mis ilmselt viitab madalamale presünaptilise dopamiini vabastamisele mesolimbilises rajas. Seevastu postsünaptiline dopamiini retseptori agonist apomorfiin indutseerib kõrgemat motoorset aktivatsiooni Wfs1-puudulikkusega hiirtel, mis peegeldab dopamiini ülesregulatsiooni postsünaptilises retseptoris mesolimbilises süsteemis. Samuti põhjustab sotsiaalne isolatsioon Wfs1-puudulikkusega hiirtel oluliselt suuremat ärevust hele-tume puuri testis võrreldes metsiktüüp hiirtega (Luuk *et al.*, 2009)

Wfs1-puudulikkusega hiired on tundlikumad paroksetiini ja imipramiini (antidepressandid) manustamisele võrreldes metsiktüüpi hiirtega. See võib tuleneda vähenenud 5-HT transporteri (SERT) ekspressioonist Wfs1-puudulikkusega hiirtel (Visnapuu *et al.*, 2013).

## 1.2 Ärevus ja stress

### 1.2.1 Ärevuse ja stressiga seotud rajad ajus

Suurenenud ärevus hirmutavates situatsioonides on normaalne reaktsioon. Patoloogiliseks ärevuseks nimetatakse protsessi, kus inimene tunneb suurenenud hirmu kui reaalne oht puudub. Kõrgenenud ärevus põhjustab südameklappimist, lihaspinget, suureneb adrenaliini tase (Pratt, 1992; Wood ja Toth, 2001). Ärevuse neurokeemilistes protsessides osalevad erinevad virgatsained, mis stimuleerivad vastavate ajupiirkondade tegevust. Ajupiirkondadest osalevad ärevuse regulatsioonis *locus coeruleus* ja *raphe* tuumad, kus toodetakse serotoniini kui peamist meeleolu mediaatorit ajus (Sullivan *et al.*, 1999). Keskne roll emotsionaalse käitumise regulatsioonis on amügdalal (mandelkeha), mis võtab vastu sensorset informatsiooni ajukoorest ja taalamusest. Amügdala, mis on seotud prefrontaalse koorega, osaleb teadliku hirmu tajus. Amügdala väljundid *locus coeruleus*'e, hüpotaalamuse, *substantia grisea centralis*'e ja juttkehast vahendavad hirmu ja ärevusega seotud autonoomseid ja neuroendokriinseid vastuseid (File *et al.*, 2000).

Stress on negatiivne emotsionaalne seisund, millega kaasnevad biokeemilised, füsioloogilised ja käitumuslikud muutused, mis on vallandatud erinevate stressorite poolt (Baum, 1990). Stressi tagajärjel tõuseb vererõhk ja südame löögisagedus (Rozanski *et al.*, 1999) ning vabanevad stressihormoonid, seega krooniline stress nõrgendab immuunsüsteemi (Schneiderman *et al.*, 2005). Ajutüvi ja hüpotaalamus on peamisteks osalejateks autonoomsetes ja neuroendokriinsetes vastustes stressoritele, mängides olulist rolli mälus, ärevuses ja otsustusvõimes. Need ajuosad on sihtmärkideks stressile ja stressihormoonidele (McEwen, 2007). Teistest ajupiirkondadest osalevad veel amügdala, hipokampus, prefrontaalne koor, *locus coeruleus* ja *raphe* tuumad (Ulrich-Lai ja Herman, 2009).

Koritkosteroidhormoone toodetakse neerupealise koores (Joels, 2006) ja neid jagatakse kahte rühma – glükokortikoidid ja mineralokortikoidid. Glükokortikoidide sekretsioon tõuseb vastuseks ärevusele ja stressisituatsioonides (Sapolsky *et al.*, 2000). Imetajatel glükokortikoid hormoon kortisool reguleerib mitmeid organismi funktsioone, taastades sellega homöostaasi pärast ajutisi häireid, nagu näiteks stress, samas mineralokortikoid hormoon aldosterool kontrollib vererõhku (Joels, 2006). Glükokortikoidid avaldavad oma mõju seostudes glükokortikoid retseptorile (GR) ja mineralokortikoidid seostuvad MR-le (Offermanns ja Rosenthal, 2008).

### **1.2.2 Wfs1 seos ärevuse ja stressiga**

Wfs1-puudulikkusega hiirtel on suurenenud ärevus stressirohkes keskkonnas võrreldes metsiktüüpi loomadega. Samuti on neil suurenenud stressi järgselt plasma kortikosterooni tase (Luuk *et al.*, 2009). Wfs1-puudulikkusega hiirtel on GABA<sub>A</sub> retseptorite alaühikute  $\alpha 1$  (Gabra1) ja  $\alpha 2$  (Gabra2) mRNA ekspressioon langenud oimusagaras ja prefrontaalses koores võrreldes metsiktüüpi hiirtega (Raud *et al.*, 2009). GABA<sub>A</sub> retseptori antagonist diasepaami (1 mg/kg) manustamine Wfs1-puudulikkusega hiirtele vähendab ärevust tõstetud pluss-puuri katses (Luuk *et al.*, 2009).

Luuk *et al.* oletasid, et Wfs1-puudulikkusega hiirte käitumuslik aktiivsus vähenes osaliselt Wfs1-ekspresseerivate neuronite madalama aktiivsuse tõttu, mis ulatuvad välja naalduvast tuumast kuni keskaju dopamiinergiliste neuroniteni. Selle põhjal võib oletada, et Wfs1 valk on närilistel oluline käitumuslike adaptatsioonide vahendaja.



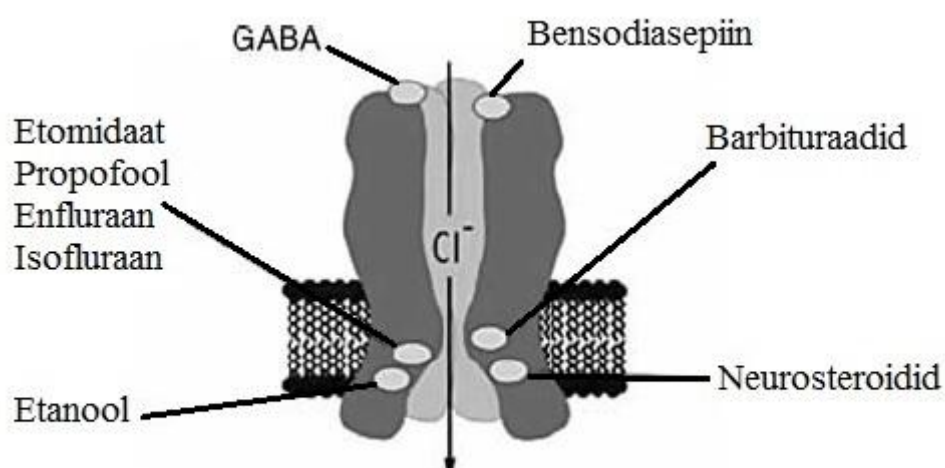
### 1.3 GABA-ergiline süsteem

#### 1.3.1 GABA-ergilise süsteemi üldiseloomustus

$\gamma$ -aminovõihape (GABA) on peamine inhibitoorne virgatsaine ajus, mis sünteesitakse põhiliselt glutamaadist glutamaadi dekarboksülaasiga (GAD). GABA funktsioone vahendatakse GABA seondumisel kas ionotroopsete retseptoritega GABA<sub>A</sub> ja GABA<sub>C</sub>, või metabotroopse retseptoriga GABA<sub>B</sub> (Watanabe *et al.*, 2002; Olsen ja Sieghart, 2008).

GABA-ergiline süsteem on seotud füsioloogiliste ja käitumuslike protsessidega ja mitmete neuropsühhiaatriliste haigustega (Olsen ja Sieghart, 2008). GABA-ergilisel süsteemil on oluline roll aju arengus, osaledes närvikudede tekkes, proliferatsioonis, migratsioonis ja diferentseerumises (Jelita ja Madarasz, 2005). Samuti on GABA-ergilisel süsteemil oluline roll ärevuse regulatsioonis. GABA<sub>A</sub> retseptorite kaudu toimivad erinevad allosteerilised ligandid nagu neurosteroidid, barbituraadid, etanool, bensodiasepiinid (joonis 1). Ravimid, mida kasutatakse ärevuse, epilepsia, unehäirete, alkoholi sõltuvuse ravimiseks, toimivad GABA<sub>A</sub> retseptorite kaudu (Korpi *et al.*, 2002).

Ioonkanalid, GABA<sub>A</sub> ja glutamaadi retseptorid on tundlikud etanoolile ning põhjustavad etanooli sõltuvust (Crews *et al.*, 1996). Etanooli manustamine mõjutab käitumist sarnaselt bensodiasepiini ja barbituraadiga (Majchrowicz, 1975; Whiting *et al.*, 1995). Etanool suurendab GABA-ergilist närviülekanet suurendades GABA presünaptilist vabanemist ja GABA<sub>A</sub> retseptori defosforüleerimist, millega kaasneb tundlikkus GABA suhtes (Kumar *et al.*, 2009).



**Joonis 1.** GABA<sub>A</sub> retseptor ja selle seondumiskohad GABA, etanooli, bensodiasepiini, barbituraadi jaoks, jne (Offermanns ja Rosenthal, 2008).

### 1.3.2 GABA retseptorid

GABA<sub>A</sub> retseptor on hetero-oligomeerne kompleks, mis koosneb viiest erinevast alaühikute perekonnast ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\rho$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$  ja  $\pi$ ) (Sieghart, 1995; Grobin *et al.*, 1998; Olsen ja Sieghart, 2008; Kilb, 2012). Alaühikud on ~450 aminohappejäägi pikkused ja neil on sarnane topoloogiline ülesehitus. Pool alaühikust koosneb hüdrofiilsest ekstratsellulaarsest N-terminaalsest domäänist, mis sisaldab tsüsteiini lingi, sellele järgneb neli hüdrofoobset transmembraanset järjestust (TM1-TM4) (Hevers ja Luddens, 1998; Sigel ja Steinmann, 2012) ja väike ekstratsellulaarne C-terminus (Hevers ja Luddens, 1998). N-terminaalne ots sisaldab endas GABA ja bensodiasepiini sidumissaiti ning TM3 ja TM4 vahel on rakusisene fosforüülimissait (Hevers ja Luddens, 1998; Sigel ja Steinmann, 2012).

GABA seondumine GABA<sub>A</sub> retseptorile avab kloriidkanali, mille tulemusena Cl<sup>-</sup> ioonid liiguvad rakku sisse (Hevers ja Luddens, 1998; Kumar *et al.*, 2009). Kloriidioonide sissevool hüperpolariseerib membraani, mille tulemusel tekib neuronaalne inhibitsioon (Kumar *et al.*, 2009).

GABA<sub>A</sub> retseptori heterogeensus tuleneb alaühikute paigutusest ning see määrab ära farmakoloogilised omadused (Olsen ja Sieghart, 2008). Suurem osa retseptorite alaühikutest on moodustatud kahest  $\alpha$ , kahest  $\beta$  ja ühest  $\gamma$ ,  $\delta$  või  $\epsilon$  alaühikust (Sieghart ja Sperk, 2002; Olsen ja Sieghart, 2008).

$\alpha 1$  alaühik on kõige arvukam ning seda ekspresseeritakse peaaegu kõikides ajupiirkondades, näiteks ajukoos, hipokampuses ja taalamuses,  $\alpha 2$ -te hipokampuses, taalamuses, amügdalas,  $\alpha 3$ -e ajutüves, basaalse eesaju neuronites ja taalamuse retikulaarses tuumas (Nusser *et al.*, 1996; Okada *et al.*, 2000; Klausberger *et al.*, 2002; Offermanns ja Rosenthal, 2008; Kumar *et al.*, 2009).

$\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  ja  $\alpha 3$  on bensodiasepiini siduvad alaühikud, sisaldades histidiini N-terminaalses konserveerunud piirkonnas (Wieland *et al.*, 1992; Rudolph *et al.*, 1999; Offermanns ja Rosenthal, 2008).  $\alpha 1$  punktmutatsiooniga hiirtel, kellel asendati histidiin arginiiniga, vähenes tundlikkus diasepaami suhtes (Rudolph *et al.*, 1999). Seega on  $\alpha 1$  alaühik oluline diasepaamiga seondumiseks.

Etanoolist tingitud lokomotoorsed muutused ja agressiivsus on vahendatud GABA<sub>A</sub>  $\alpha 1$  alaühiku kaudu (de Almeida *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2009), samas  $\alpha 2$  alaühik vahendab etanooli sedatiivset efekti (Kumar *et al.*, 2009).

GABA<sub>B</sub> retseptor on G-valguga seotud heterodimeer, alaühikutega GABA<sub>B</sub>R1 ja GABA<sub>B</sub>R2 (Kaupmann *et al.*, 1998). GABA<sub>B1</sub> on seotud ER-iga (Couve *et al.*, 1998) ning GABA<sub>B2</sub> on retseptori komponent, mis seob endaga G-alku (Calver *et al.*, 2001; Robbins *et al.*, 2001).

GABA<sub>C</sub> retseptorid koosnevad heteromeersetest alaühikutest, mis asetsevad pentameerselt. Igal alaühikul on ekstratsellulaarne domään, mis seob endaga ligande ja transmembraanne domään, mis koosneb neljast segmendist M1-M2, nagu ka GABA<sub>A</sub> (Harrison ja Lummis, 2006; Sigel ja Steinmann, 2012).

## 2 EKSPERIMENTAALNE OSA

### 2.1 Töö eesmärgid

Käesoleva töö eesmärkideks on:

- välja selgitada etanooli mõju GABA-ergilise süsteemi GABA<sub>A</sub> retseptori  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  ja  $\alpha 3$  alaühikute geenide ekspressiooni muutustele homosügootsetel Wfs1-puudulikkusega hiirtel ja metsiktüüpi loomadel peale etanooli manustamisest 30 minuti ja 60 minuti jooksul
- uurida GABA<sub>A</sub> retseptori  $\alpha 3$  alaühiku ekspressiooni tõstetud pluss-puuris käinud Wfs1-homosügootsetel ja metsiktüüp hiirtel

### 2.2 Materjal ja meetodika

#### 2.2.1 Katseloomad

Katseloomadeks olid Tartu Ülikooli Bio- ja siirdemeditsiini instituudis füsioloogia osakonnas loodud Wfs1-puudulikkusega homosügootsed (Luuk *et al.*, 2009) ja metsiktüüpi hiired. Katseloomade paljundamine ja genotüüpiseerimine viidi läbi Tartu Ülikooli füsioloogia osakonnas. Katseloomadeks olid F2 põlvkond geneetilise taustaga (129S6/SvEvTac  $\times$  C57BL/6)  $\times$  (129S6/SvEvTac  $\times$  C57BL/6). Loomade vanus oli 2-3 kuud. Hiiri hoiti puurides 6-8 kaupa 20 °C juures 12-h/12-h valge/pime tsüklis. Hiirtel oli vaba ligipääs toidule ja veele. Käitumiskatsed viidi läbi ajavahemikus 8.00 - 17.00. Katsed viidi läbi Eesti Vabariigi põllumajandusministeeriumi antud loa alusel (nr. 88, välja antud 25.august 2011).

#### 2.2.2 Etanooli manustamine

Wfs1-homosügootsetele ja metsiktüüpi hiirtele süstiti etanooli (2 g/kg) intraperitonaalselt 30 või 60 minutit enne ajude eemaldamist.

### **2.2.3 Aju prepareerimine**

Katseloomad surmati tservikaalse dislokatsiooni teel ja eraldati aju. Peale seda prepareeriti aju jääl, millest eemaldati oimusagar (sisaldab amügdalat), hipokampus ja prefrontaalne koor. Eraldatud ajustruktuurid külmutati vedelas lämmastikus ja hoiti kuni edasiste analüüsideni -80 °C juures.

### **2.2.4 RNA eraldamine, cDNA süntees**

RNA eraldamiseks kasutati *Trizoli* (Invitrogen), cDNA sünteesimiseks kasutati oligod(T)18 praimereid ja Superscript pöördtranskriptaas III (Invitrogen) vastavalt etteantud protokollidele.

### **2.2.5 Kvantitatiivne reaalaaja-PCR**

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. Praimerite järjestused on toodud tabelis 1. Koduhoidja geeniks oli *Hprt1*, mis on eelnevalt tõestatud katsetes kõige efektiivsemalt ja stabiilsemalt 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. Kõikide gruppide geeni ekspressioonid teostati paralleelselt. Ekspressiooni analüüsimiseks kasutati 2-deltaCt meetodit (Livak ja Schmittgen, 2001).

### **2.2.6 Statistika**

Geeni ekspressiooni tulemused on analüüsitud kahe-suunalise ANOVAGA (genotüüp ja tõstetud pluss-puurile eksponeerimine või genotüüp ja etanooli manustamine). Post hoc võrdlused on teostatud kas Tukey HSD testiga või Newman-Keuls testiga kasutades Statistica 10 (StatSoft, USA).

**Tabel 1.** Kvantitatiivse reaalaaja PCR-i praimerid ja sondid.

Geeni sümbol	Assay ID või järjestus	Geeni ID
Gabra1	Mm00439046_m1	NM_010250
Gabra2	Mm00433435_m1	NM_008066.3
Gabra3	Mm01294271_m1	NM_008067
Hprt1 for	5'-GCAGTACAGCCCCAAAATGG-3'	NM_013556
Hprt1 rev	5'-AACAAAGTCTGGCCTGTATCCAA-3'	
Hprt1 probe (VIC_MGB)	5'-VIC-AAGCTTGCTGGTGAAAAGGACCTCTCG MGB-3'	

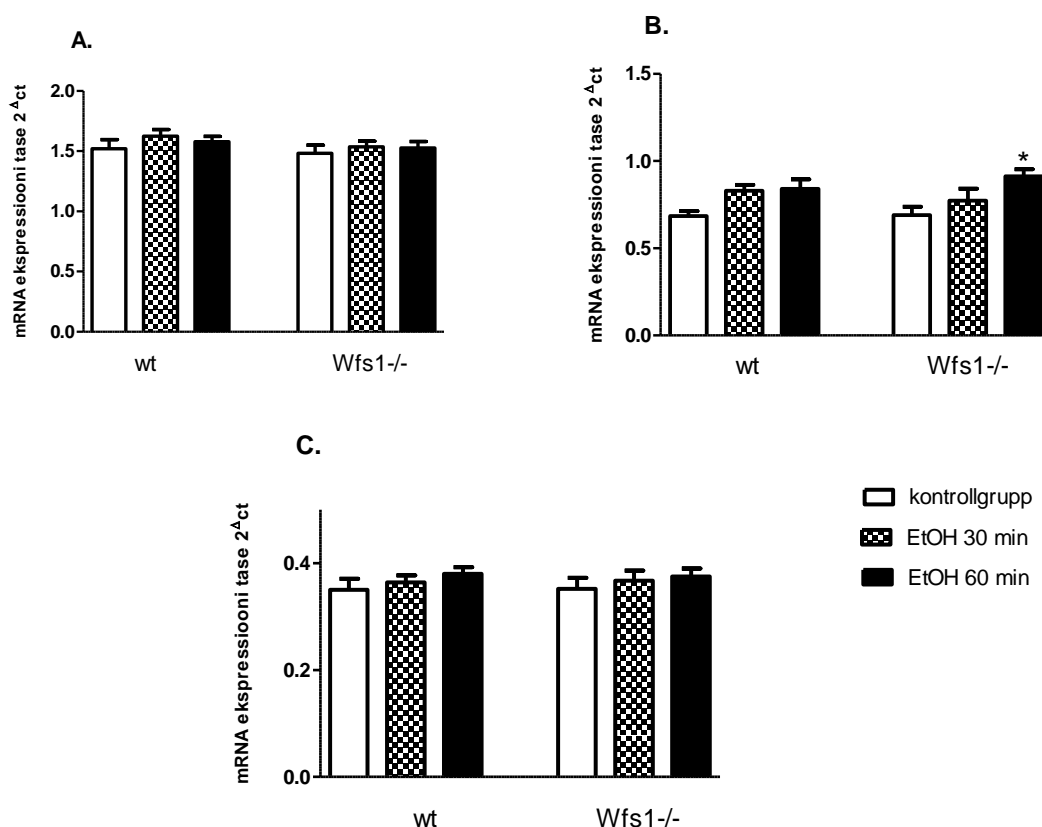
*Gabra1* – gamma-aminovõihape (GABA) A retseptor, alahik  $\alpha 1$ ; *Gabra2* – gamma-aminovõihape (GABA) A retseptor, alahik  $\alpha 2$ ; *Gabra3* – gamma-aminovõihape (GABA) A retseptor, alahik  $\alpha 3$ ; *Hprt1* - hüpoksaantiin-guaaniin fosforibosüültransferaas 1 geen.

## 2.3 Tulemused

### 2.3.1 Gabra alaühikute ekspressioon oimusagaras

Oimusagaras oli statistiliselt oluline ainult Gabra2 ekspressiooni muutus etanooli manustamisel (etanooli süstimine ( $F(2,39)=6.9$ ,  $p<0.01$ ), genotüüp ( $F(1,39)=0.2$ ,  $p=0.64$ ), genotüüp  $\times$  etanool ( $F(2,39)=0.96$ ,  $p=0.39$ ). Post hoc analüüs Newman-Keulsiga kinnitas, et 60 minutit etanooli manustamist Wfs1-defitsiitsetel hiirtel tõstis oluliselt Gabra2 ekspressiooni võrreldes Wfs1-puudulikkusega hiirte kontrollgrupiga (joonis 2B).

Gabra1 ja Gabra3 ekspressioonis statistiliselt olulisi erinevusi gruppide vahel ei tuvastatud. Gabra1 ekspressioon: genotüüp ( $F(1,39)=1.5$ ,  $p=0.22$ ), etanooli süstimine ( $F(2,39)=0.9$ ,  $p=0.41$ ), genotüüp  $\times$  etanool ( $F(2,39)=0.1$ ,  $p=0.91$ ). Gabra3 ekspressioon: genotüüp ( $F(1,39)=0.2$ ,  $p=0.63$ ), etanool ( $F(2,39)=1.8$ ,  $p=0.18$ ), genotüüp  $\times$  etanooli süstimine ( $F(2,39)=0.04$ ,  $p=0.96$ ). Post hoc analüüs Newman-Keulsiga kinnitas, et etanool ei mõjutanud märgatavalt Gabra1 ja Gabra3 geeniekspressiooni mistahes genotüübil võrreldes vastavate kontrollgruppidega (joonis 2A,C).



**Joonis 2.** Geeni ekspressiooni muutused Gabra1 (A), Gabra2 (B) ja Gabra3 (C) 30 minuti ja 60 minuti jooksul peale etanool manustamist oimusagaras metsiktüüp (wt) ja Wfs1- homotüüpsetel hiirtel (Wfs1<sup>-/-</sup>). Igas grupis oli 6-8 looma.

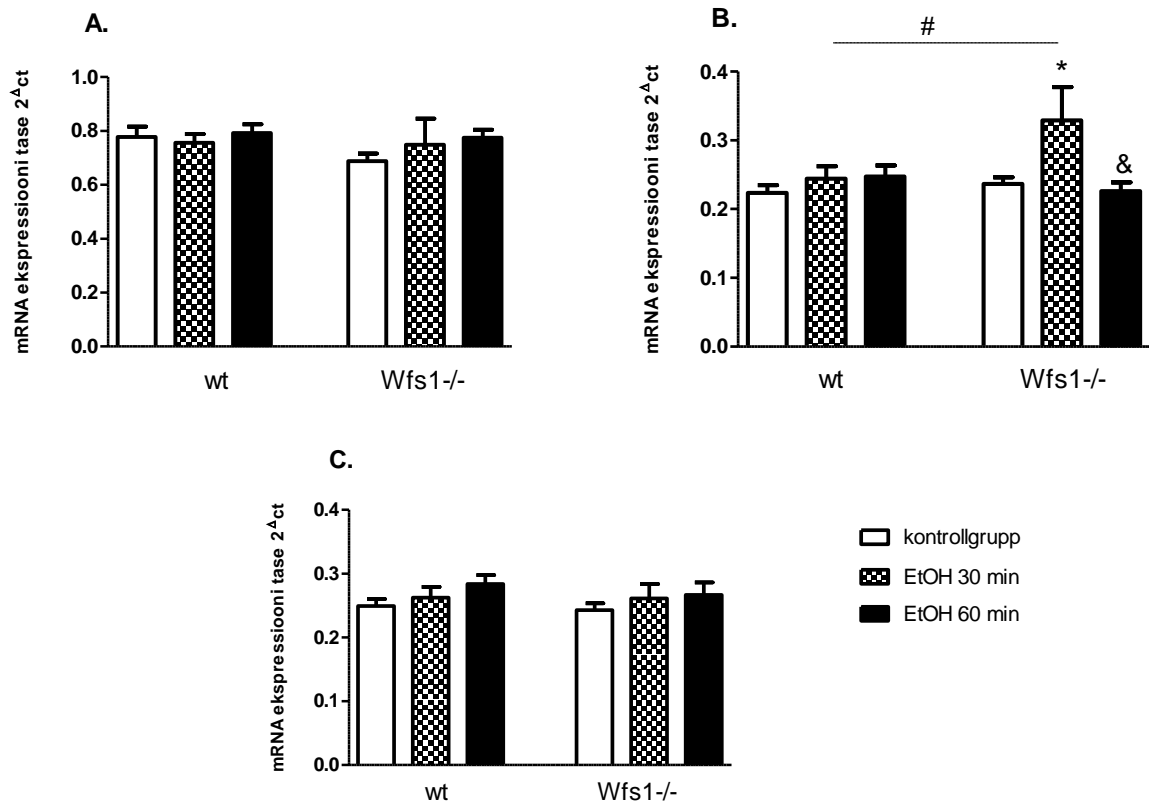
\* $p<0.05$  võrreldes sama genotüübi kontrollgrupiga.

### 2.3.2 Gabra alaühikute ekspressioon prefrontaalses koores

Prefrontaalses koores oli Gabra2 mRNA ekspressioon märgatavalt muutunud peale etanooliga manustamist ( $F(2,39)=4.9$ ,  $p<0.01$ ). Peale selle avastati interaktsioon genotüübi ja etanooli manustamise vahel ( $F(2,39)=3.8$ ,  $p<0.03$ ). Post hoc Newman-Keuls testiga näitas, et 30 minuti grupi homosügootsetel Wfs1-puudulikkusega hiirtel oli Gabra2 mRNA ekspressioon kõrgem võrreldes metsiktüüpi hiirtega ( $p<0.01$ ) (joonis 3B). Gabra2 mRNA ekspressioon oli samuti kõrgem 30 minuti grupi Wfs1-defektsetel homosügootsetel hiirtel võrreldes kontrollgrupi hiirtega. Võrreldes etanooli 30 minuti ja 60 minuti gruppe selgus, et homosügootsetel Wfs1-puudulikkusega hiirtel, kellele manustati etanooli 60 minuti jooksul, oli Gabra2 ekspressioon vähenenud sarnaselt kontrollgrupi hiirtega (joonis 3B).

Gabra1 ja Gabra3 ekspressioonis statistiliselt olulisi erinevusi gruppide vahel ei tuvastatud. Gabra1 ekspressioon: genotüüp ( $F(1,39)=0.8$ ,  $p=0.36$ ), etanooli süstimine ( $F(2,39)=0.4$ ,  $p=0.62$ ), genotüüp  $\times$  etanooli süstimine ( $F(2,39)=0.3$ ,  $p=0.68$ ). Gabra3 ekspressioon: genotüüp ( $F(1,39)=0.3$ ,  $p=0.54$ ), etanool ( $F(2,39)=1.6$ ,  $p=0.20$ ), genotüüp  $\times$  etanooli süstimine ( $F(2,39)=0.1$ ,  $p=0.89$ ) (joonis 3A,C).





**Joonis 3.** Geeni ekspressiooni muutused Gabra1 (A), Gabra2 (B) ja Gabra3 (C) 30 minuti ja 60 minuti jooksul peale etanool manustamist prefrontaalses koores metsiktüüp (wt) ja Wfs1 homosügootsetel hiirtel (Wfs1<sup>-/-</sup>). Igas grupis oli 6-8 looma.

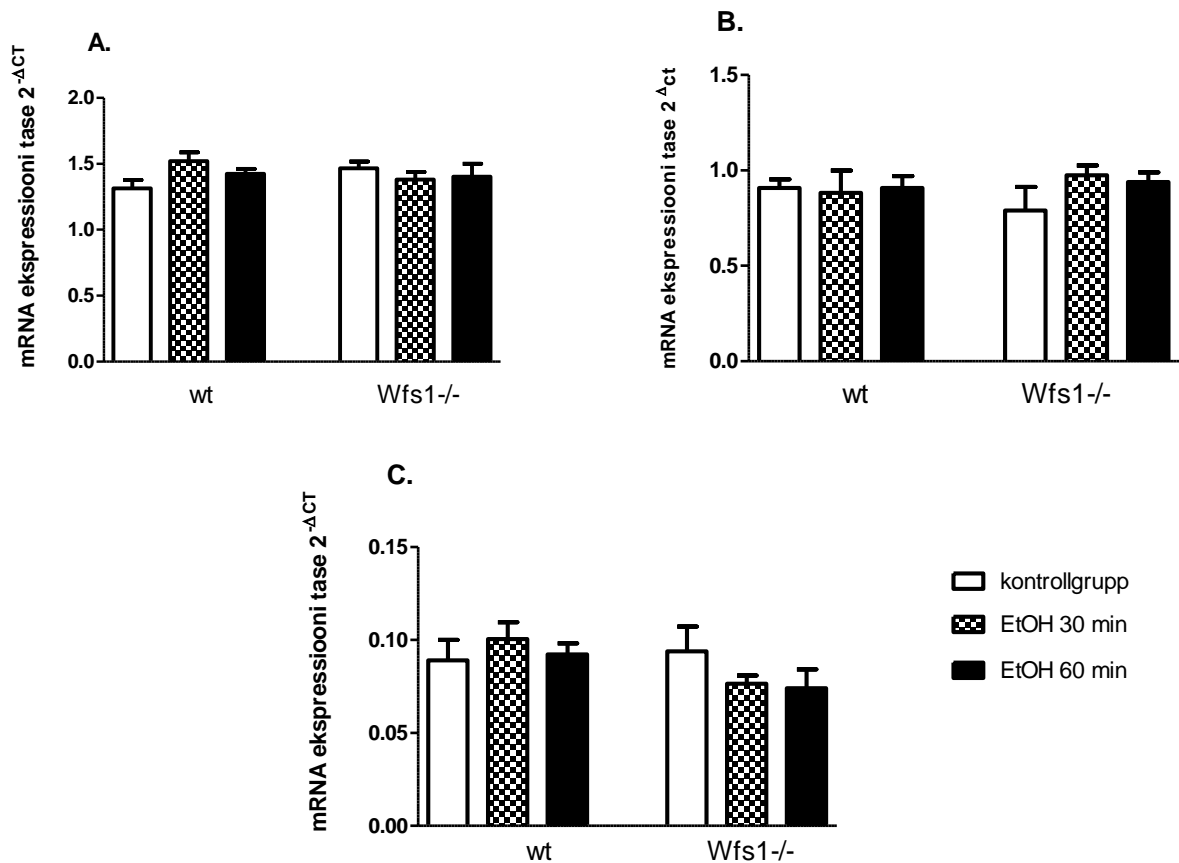
\* $p < 0.05$ , võrreldes sama genotüübi kontrollgrupiga.

# $p < 0.05$  võrreldes metsiktüüpi 30 minuti etanooli manustamisega.

& $p < 0.05$  võrreldes sama genotüübi 30 minuti etanooli manustamisega.

### 2.3.3 Gabra alühikute ekspressioon hipokampuses

Hipokampuses ei olnud statistiliselt olulist erinevust genotüüpide vahel, samuti ei mõjutanud etanooli manustamine 30 minuti või 60 minuti jooksul Gabra1, Gabra2 ega Gabra3 ekspressiooni (joonis 6). Gabra1 ekspressioon: genotüüp ( $F(1,38)=0.005$ ,  $p=0.944$ ), etanooli manustamine ( $F(2,38)=0.462$ ,  $p=0.633$ ), genotüüp  $\times$  etanool ( $F(2,38)=2.589$ ,  $p=0.088$ ). Gabra2 ekspressioon: genotüüp ( $F(1,37)=0.003$ ,  $p=0.986$ ), etanooli manustamine ( $F(2,37)=0.521$ ,  $p=0.598$ ), genotüüp  $\times$  etanool ( $F(2,37)=0.8028$ ,  $p=0.456$ ). Gabra3 ekspressioon: genotüüp ( $F(1,40)=2.519$ ,  $p=0.12$ ), etanooli manustamine ( $F(2,40)=0.367$ ,  $p=0.695$ ), genotüüp  $\times$  etanool ( $F(2,40)=1.314$ ,  $p=0.28$ ).



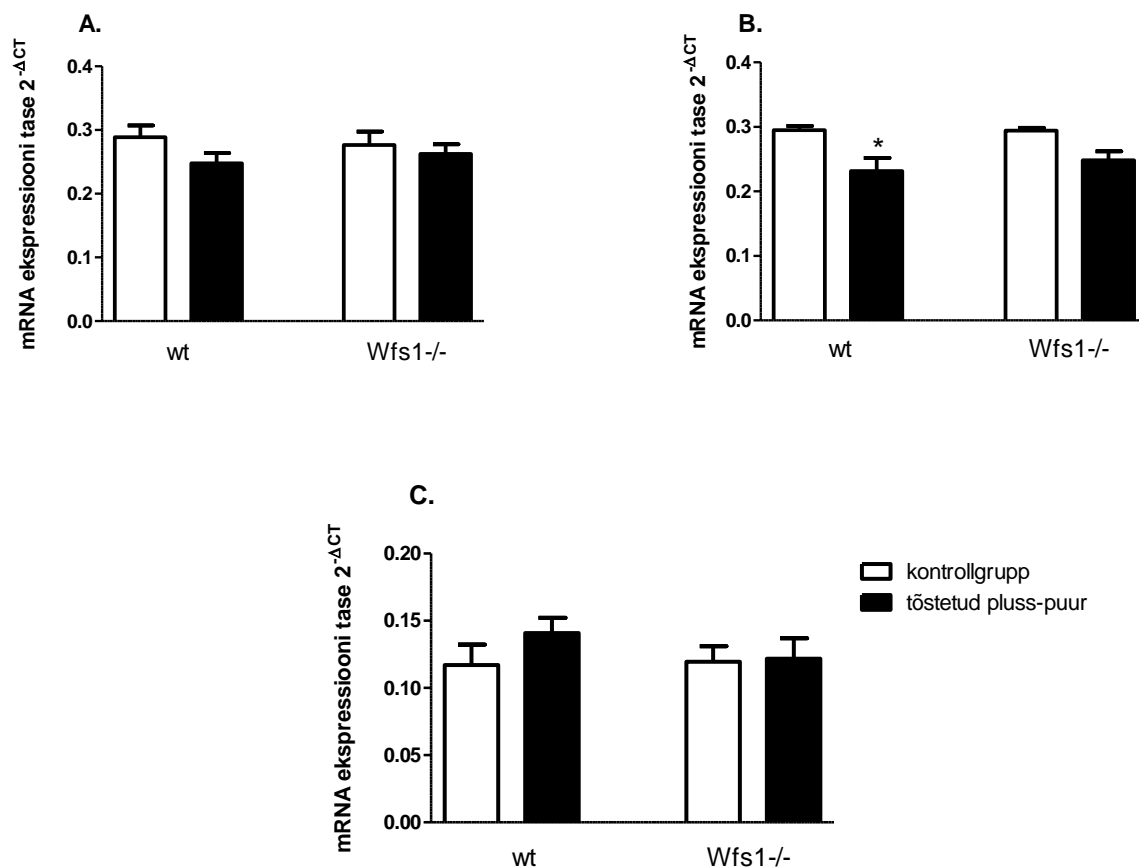
**Joonis 4.** Geeni ekspresiooni muutused Gabra1 (A), Gabra2 (B) ja Gabra3 (C) 30 minuti ja 60 minuti jooksul peale etanool manustamist hipokampuses metsiktüüp (wt) ja Wfs1 homosügootsetel hiirtel (Wfs1<sup>-/-</sup>). Igas grupis oli 6-8 looma.

### 2.3.4 Gabra3 alaühiku ekspresioon tõstetud pluss-puuri katses

Tõstetud pluss-puuri katse hiirtega oli varasemalt teostatud (Raud *et al.*, 2009). Gabra3 ekspresiooni analüüsid viidi läbi Post hoc Tukey HSD testi kasutades. Tõstetud pluss-puuri katses Gabra3 ekspresioon oimusagaras ei olnud oluliselt muutunud erinevate genotüüpide vahel: genotüüp ( $F(1,25)=0.004$ ,  $p=0.95$ ), tõstetud pluss-puur ( $F(1,25)=2.5$ ,  $p=0.13$ ), genotüüp  $\times$  eksponeerimine ( $F(1,25)=0.60$ ,  $p=0.44$ ) (joonis 5A).

Prefrontaalses koos täheldati olulist muutust Gabra3 mRNA ekspresioonis metsiktüüpi loomadel tõstetud pluss-puuri katses võrreldes kontrollgrupiga ( $F(1,23)=8.6$ ,  $p<0.01$ ). Genotüüpide vahel erinevusi ei tuvastatud ( $F(1,23)=0.0001$ ,  $p=0.99$ ), samuti ei olnud interaktsiooni genotüübi ja eksponeerimise vahel ( $F(1,23)=1.2$ ,  $p=0.29$ ) (joonis 5B).

Hipokampuses ei olnud Gabra3 ekspressioonis olulisi erinevusi genotüüpide vahel tõstetud pluss-puuri katses (joonis 5C).



**Joonis 5.** Gabra3 ekspressioon metsiktüüpi ja Wfs1<sup>-/-</sup> hiirtel naiivsetel ja pluss-puuris käinud loomadel oimusalgaras (A), prefrontaalses koores (B) ja hipokampuses (C). Igas grupis oli 6-8 looma. \*p<0.05 võrreldes metsiktüüpi ja Wfs1<sup>-/-</sup> kontrollgrupi loomadega.

## 2.4 Arutelu

Antud bakalaureusetöö eesmärkideks oli välja selgitada etanooli mõju GABA-ergilise süsteemi GABA<sub>A</sub> retseptori  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  ja  $\alpha 3$  alahikute geenide ekspressiooni muutustele homosügootsetel Wfs1-puudulikkusega hiirtel ja metsiktüüpi loomadel peale etanooli manustamist 30 minuti ja 60 minuti jooksul. Samuti GABA<sub>A</sub> retseptori  $\alpha 3$  alahiku ekspressiooni tõstetud pluss-puuris käinud Wfs1-homosügootsetel ja metsiktüüp hiirtel.

Käesolevas töös leidsime, et Wfs1-puudulikkusega hiirtel on GABA-ergilise süsteemi geenide ekspressioon muutunud ajus regioonspetsiifiliselt etanooli manustamisel 30 ja 60 minuti jooksul võrreldes metsiktüüpi hiirtega. Nimelt on tõusnud Gabra2 retseptori ekspressioon oimusagaras 60 minutit peale etanooli manustamist Wfs1-puudulikkusega hiirtel võrreldes sama genotüüpi naivsete loomadega. Prefrontaalses koos seevastu tõstab 30 minuti etanooli manustamine Gabra2 mRNA ekspressiooni taset Wfs1-puudulikkusega hiirtel võrreldes sama grupi metsiktüüpi hiirtega. Tõstetud pluss-puuris käinud loomadel (Raud *et al.*, 2009) oli GABA<sub>A</sub> retseptori  $\alpha 3$  alahiku ekspressioon vähenenud metsiktüüpi hiirtel prefrontaalses koos, samas Wfs1-puudulikkusega hiirtel muutust ei täheldatud.

Varasemalt teostatud katsed Wfs1-puudulikkusega hiirtega tõestavad, et nad on ärevamad võrreldes metsiktüüpi pesakaaslastega. Samas diasepaami manustamine vähendab Wfs1-puudulikkusega hiirtel ärevust tõstetud pluss-puuri katses (Luuk *et al.*, 2009). GABA-ergiline süsteem osaleb ärevuse regulatsioonis ja GABA<sub>A</sub> retseptorite kaudu toimivad nii diasepaam kui ka etanool (Whiting *et al.*, 1995; Crews *et al.*, 1996; Korpi *et al.*, 2002; de Almeida *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2009). Varasemas Tartu Ülikooli Bio- ja siirdemeditiini instituudis füsioloogia osakonnas tehtud töös on näidatud, et Wfs1-puudulikkusega hiirtel on vähenenud Gabra1 ja Gabra2 ekspressioon nii oimusagaras kui prefrontaalses koos (Raud *et al.*, 2009). Etanool toimib GABA-ergilise süsteemi kaudu, seetõttu püüdsime käesolevas töös välja selgitada, kas Wfs1-puudulikkusega hiirtele toimib etanool erinevalt võrreldes metsiktüüp loomadega.

GABA-ergilise süsteemi geenide ekspressiooni uurisime, kuna etanooli toime oli oluliselt tugevam Wfs1-puudulikkusega hiirtel võrreldes metsiktüüpi hiirtega. Nimelt, tõstetud pluss-puuri katses peale etanooli manustamist (2.0 g/kg) sisenesid Wfs1-puudulikkusega hiired oluliselt rohkem avatud õlgadele kui metsiktüüpi hiired, samuti oli pikem avatud õlgadel viibimise aeg (avaldamata andmed). On näidatud, et etanool suurendab GABA-ergilist närviülekanne suurendades GABA presünaptilist vabanemist ja GABA<sub>A</sub> retseptori desfosforülatsiooni, millega kaasneb tundlikkus GABA suhtes (Kumar *et al.*, 2009). Selleks, et välja selgitada kas etanooli toime erinevused genotüüpide vahel on seotud GABA-ergilise

süsteemi muutustega aju erinevates struktuurides teostasime kvantitatiivse reaalaaja PCR-i uurimaks Gabra1, Gabra2 ja Gabra3 geenide ekspressiooni oimusagaras, prefrontaalses kooses ja hipokampuses. Võimalikke muutusi geenide ekspressioonis vaatasime Wfs1-puudulikkusega hiirte ja metsiktüüp hiirte kontrollrühmal ja etanooli manustamisel 30 ja 60 minuti jooksul.

Tulemusteks saime, et ainult Gabra2 mRNA ekspressioon oli muutunud peale etanooli manustamist Wfs1-puudulikkusega hiirtel. Nimelt oli oimusagaras oluliselt suurenenud etanooli süstitud (60 minuti jooksul) Wfs1-puudulikkusega hiirtel Gabra2 ekspressioon võrreldes sama genotüüpi kontrollgrupiga. Prefrontaalses kooses tõusis Gabra2 mRNA ekspressiooni tase homosügootsetel Wfs1-puudulikkusega loomadel, kellele süstiti etanooli 30 minuti jooksul, võrreldes kontrollgrupiga ja metsiktüüpi hiirtega, samas etanooli manustamine 60 minuti jooksul vähendas Gabra2 mRNA ekspressiooni. Kui Gabra1 on seotud peamiselt etanoolist tingitud lokomotoorse aktiivsuse muutusega, siis Gabra2 on seotud etanooli sedatiivse toimega (Kumar *et al.*, 2009). On leitud, et polümorfismid Gabra2 geenis võivad suurendada alkoholismi riski (Soyka *et al.*, 2008) ja muutused Gabra2 ekspressioonis mõjutavad etanooli toimet (Hurley *et al.*, 2009). Seega võib Wfs1-puudulikkusega hiirtel etanooli tugevam efekt võrreldes metsiktüüp loomadega olla seotud Gabra2 taseme tõusuga prefrontaalkooses ja oimusagaras.

Hipokampuses ei olnud aga statistiliselt olulisi erinevusi Gabra1, Gabra2 ja Gabra3 ekspressioonis ei genotüüpide vahel ega etanooli manustamisel. Kuna hipokampuses on Wfs1 ekspresseerunud vaid CA1 piirkonnas, siis ilmselt Wfs1 väljalülitamine ei mõjuta oluliselt Gabra alaühikute ekspressiooni.

Tõstetud pluss-puur kui üks ärevuse mudeleid põhjustas Gabra3 ekspressiooni muutust prefrontaalses kooses metsiktüüp loomadel võrreldes kontrollgrupiga, samas Wfs1-puudulikkusega hiirtel Gabra3 ekspressiooni muutust ei täheldatud. See võib tuleneda Wfs1-puudulikkusega hiirte juba algselt suuremast ärevusest.

Kokkuvõtteks on Wfs1-puudulikkusega hiirtel etanooli manustamisel 30 või 60 minuti jooksul muutunud Gabra2 ekspressiooni tase prefrontaalkooses ja oimusagaras, samas metsiktüüp hiirtel muutusi GABA<sub>A</sub> retseptori alatüüpides etanooli manustamisel ei esinenud. Järelikult esineb Wfs1-puudulikkusega hiirtel häireid GABA-ergilises närviüleandes nii, nagu varasemates töödes on näidatud häireid serotonergilises (Visnapuu *et al.*, 2013) ja dopamiinergilises süsteemis (Visnapuu *et al.*, 2013). Täpne mehhanism, kuidas Wfs1 neid virgatsainete süsteeme reguleerib on hetkel selgusetu, kuid tõenäoliselt võib see olla seotud Ca<sup>2+</sup> modulatsiooniga rakus.

## KOKKUVÕTE

Käesolevas töös uurisime etanooli mõju GABA<sub>A</sub> retseptori alaühikute geenide ekspressiooni muutustele oimusagaras, hipokampuses ja prefrontaalses koores homosügootsetel Wfs1-puudulikkusega ja metsiktüüpi hiirtel. Samuti uurisime tõstetud pluss-puuri mõju Gabra3 alaühiku ekspressioonile erinevate genotüüpide vahel.

Tulemusteks saime, et oimusagaras oli Gabra2 mRNA ekspressioon tõusnud 60 minuti jooksul peale etanooli manustamist homosügootsetel Wfs1-defitsiitsetel loomadel võrreldes sama grupi kontrollhiirtega. Frontaalkoores tõusis Gabra2 mRNA ekspressioon homosügootsetel Wfs1-hiirtel, kellele manustati etanooli 30 minutiks, võrreldes metsiktüüpi pesakaaslastega. Hipokampuses Gabra1, Gabra2 ja Gabra3 ekspressiooni erinevusi gruppide vahel ei täheldatud. Peale selle ei olnud statistiliselt olulisi erinevusi ka Gabra1 ja Gabra3 mRNA ekspressioonis oimusagaras ja prefrontaalses koores. Tõstetud pluss-puuri katses oli statistiliselt oluline Gabra3 ekspressioon vaid prefrontaalses koores, kus Gabra3 mRNA ekspressioon langes metsiktüüpi loomadel võrreldes sama grupi pesakaaslastega.

Tulemuste põhjal võib järeldada, et Wfs1-puudulikkusega hiirtel esineb häireid GABA-ergilises närviülekanandes.

## **Stress-related changes in expression of GABAergic system genes in Wfs1-deficient mice**

Agnes Rikk

### **SUMMARY**

Wolfram syndrome is an autosomal recessive disorder caused by a mutation in the *WFS1* gene (Strom *et al.*, 1998). *WFS1* encodes an 890 amino-acid glycoprotein wolframin (Hofmann *et al.*, 2003). Wolfram syndrome causes diabetes, optic atrophy and deafness. Around 60% of Wolfram syndrome patients suffer from psychiatric disorders (Swift *et al.*, 1990; Strom *et al.*, 1998).

The goal of the present work was to determine the levels of gene expression of GABA<sub>A</sub> receptor subunits in homozygous Wfs1-deficient mice and wild type littermates, and to obtain more information about Wfs1 functions in organism. We analyzed the expression levels of Gabra1, Gabra2 and Gabra3 in the temporal lobe, prefrontal cortex and hippocampus.

We discovered that there were differences in the expression levels of Gabra2 in the temporal lobe and frontal cortex. Gabra2 mRNA expression level was elevated in temporal lobe of Wfs1-deficient mice who were injected with ethanol for 60 minutes compared to control mice of the same group. A similar effect of Gabra2 mRNA expression was seen in the prefrontal cortex of Wfs1-deficient mice injected with ethanol for 30 minutes, but in rodents who were injected with ethanol for 60 minutes the Gabra2 expression level was reduced. In hippocampus there were no statistically significant differences in Gabra1, Gabra2 and Gabra3 expression levels.

In the elevated plus-maze test Gabra3 expression level was statistically significant only in the prefrontal cortex where Gabra3 mRNA expression level was decreased in wild type mice compared to control mice of the same group.

In conclusion, based on the results, Wfs1-deficient mice have a disruption of GABAergic neurotransmission.

## **KASUTATUD KIRJANDUS**

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

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

Baum, A. (1990). Stress, intrusive imagery, and chronic distress. *Health Psychol.* 9(6): 653-675.

Calver, A. R., Robbins, M. J., Cosio, C., Rice, S. Q., Babbs, A. J., Hirst, W. D., Boyfield, I., Wood, M. D., Russell, R. B., Price, G. W., Couve, A., Moss, S. J. and Pangalos, M. N. (2001). The C-terminal domains of the GABA(b) receptor subunits mediate intracellular trafficking but are not required for receptor signaling. *J Neurosci.* 21(4): 1203-1210.

Cano, A., Rouzier, C., Monnot, S., Chabrol, B., Conrath, J., Lecomte, P., Delobel, B., Boileau, P., Valero, R., Procaccio, V., Paquis-Flucklinger, V., French Group of Wolfram, S. and Vialettes, B. (2007). Identification of novel mutations in WFS1 and genotype-phenotype correlation in Wolfram syndrome. *Am J Med Genet A.* 143A(14): 1605-1612.

Couve, A., Filippov, A. K., Connolly, C. N., Bettler, B., Brown, D. A. and Moss, S. J. (1998). Intracellular retention of recombinant GABAB receptors. *J Biol Chem.* 273(41): 26361-26367.

Crews, F. T., Morrow, A. L., Criswell, H. and Breese, G. (1996). Effects of ethanol on ion channels. *Int Rev Neurobiol.* 39: 283-367.

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

de Almeida, R. M., Rowlett, J. K., Cook, J. M., Yin, W. and Miczek, K. A. (2004). GABAA/alpha1 receptor agonists and antagonists: effects on species-typical and heightened



aggressive behavior after alcohol self-administration in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 172(3): 255-263.

File, S. E., Kenny, P. J. and Cheeta, S. (2000). The role of the dorsal hippocampal serotonergic and cholinergic systems in the modulation of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav*. 66(1): 65-72.

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

Grobin, A. C., Matthews, D. B., Devaud, L. L. and Morrow, A. L. (1998). The role of GABA(A) receptors in the acute and chronic effects of ethanol. *Psychopharmacology (Berl)*. 139(1-2): 2-19.

Hansen, L., Eiberg, H., Barrett, T., Bek, T., Kjaersgaard, P., Tranebjaerg, L. and Rosenberg, T. (2005). Mutation analysis of the WFS1 gene in seven Danish Wolfram syndrome families; four new mutations identified. *Eur J Hum Genet*. 13(12): 1275-1284.

Hardy, C., Khanim, F., Torres, R., Scott-Brown, M., Seller, A., Poulton, J., Collier, D., Kirk, J., Polymeropoulos, M., Latif, F. and Barrett, T. (1999). Clinical and molecular genetic analysis of 19 Wolfram syndrome kindreds demonstrating a wide spectrum of mutations in WFS1. *Am J Hum Genet*. 65(5): 1279-1290.

Harrison, N. J. and Lummis, S. C. (2006). Molecular modeling of the GABA(C) receptor ligand-binding domain. *J Mol Model*. 12(3): 317-324.

Hevers, W. and Luddens, H. (1998). The diversity of GABAA receptors. Pharmacological and electrophysiological properties of GABAA channel subtypes. *Mol Neurobiol*. 18(1): 35-86.

Hofmann, S., Philbrook, C., Gerbitz, K. D. and Bauer, M. F. (2003). Wolfram syndrome: structural and functional analyses of mutant and wild-type wolframin, the WFS1 gene product. *Hum Mol Genet*. 12(16): 2003-2012.

Hurley, J. H., Ballard, C. J. and Edenberg, H. J. (2009). Altering the relative abundance of GABA A receptor subunits changes GABA- and ethanol-responses in *Xenopus* oocytes. *Alcohol Clin Exp Res*. 33(6): 1089-1096.

- Ishihara, H., Takeda, S., Tamura, A., Takahashi, R., Yamaguchi, S., Takei, D., Yamada, T., Inoue, H., Soga, H., Katagiri, H., Tanizawa, Y. and Oka, Y. (2004). Disruption of the WFS1 gene in mice causes progressive beta-cell loss and impaired stimulus-secretion coupling in insulin secretion. *Hum Mol Genet.* 13(11): 1159-1170.
- Jelitai, M. and Madarasz, E. (2005). The role of GABA in the early neuronal development. *Int Rev Neurobiol.* 71: 27-62.
- Joels, M. (2006). Corticosteroid effects in the brain: U-shape it. *Trends Pharmacol Sci.* 27(5): 244-250.
- Karasik, A., O'Hara, C., Srikanta, S., Swift, M., Soeldner, J. S., Kahn, C. R. and Herskowitz, R. D. (1989). Genetically programmed selective islet beta-cell loss in diabetic subjects with Wolfram's syndrome. *Diabetes Care.* 12(2): 135-138.
- Kaupmann, K., Malitschek, B., Schuler, V., Heid, J., Froestl, W., Beck, P., Mosbacher, J., Bischoff, S., Kulik, A., Shigemoto, R., Karschin, A. and Bettler, B. (1998). GABA(B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature.* 396(6712): 683-687.
- Kilb, W. (2012). Development of the GABAergic system from birth to adolescence. *Neuroscientist.* 18(6): 613-630.
- Kinsley, B. T., Swift, M., Dumont, R. H. and Swift, R. G. (1995). Morbidity and mortality in the Wolfram syndrome. *Diabetes Care.* 18(12): 1566-1570.
- Klausberger, T., Roberts, J. D. and Somogyi, P. (2002). Cell type- and input-specific differences in the number and subtypes of synaptic GABA(A) receptors in the hippocampus. *J Neurosci.* 22(7): 2513-2521.
- Koido, K., Koks, S., Nikopensius, T., Maron, E., Altmae, S., Heinaste, E., Vabrit, K., Tammekivi, V., Hallast, P., Kurg, A., Shlik, J., Vasar, V., Metspalu, A. and Vasar, E. (2005). Polymorphisms in wolframin (WFS1) gene are possibly related to increased risk for mood disorders. *Int J Neuropsychopharmacol.* 8(2): 235-244.
- Korpi, E. R., Grunder, G. and Luddens, H. (2002). Drug interactions at GABA(A) receptors. *Prog Neurobiol.* 67(2): 113-159.

- Kumar, S., Porcu, P., Werner, D. F., Matthews, D. B., Diaz-Granados, J. L., Helfand, R. S. and Morrow, A. L. (2009). The role of GABA(A) receptors in the acute and chronic effects of ethanol: a decade of progress. *Psychopharmacology (Berl)*. 205(4): 529-564.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 25(4): 402-408.
- Luuk, H., Plaas, M., Raud, S., Innos, J., Sutt, S., Lasner, H., Abramov, U., Kurrikoff, K., Koks, S. and Vasar, E. (2009). Wfs1-deficient mice display impaired behavioural adaptation in stressful environment. *Behav Brain Res*. 198(2): 334-345.
- Majchrowicz, E. (1975). Induction of physical dependence upon ethanol and the associated behavioral changes in rats. *Psychopharmacologia*. 43(3): 245-254.
- Matto, V., Terasmaa, A., Vasar, E. and Koks, S. (2011). Impaired striatal dopamine output of homozygous Wfs1 mutant mice in response to [K<sup>+</sup>] challenge. *J Physiol Biochem*. 67(1): 53-60.
- McEwen, B. S. (2007). Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol Rev*. 87(3): 873-904.
- Nusser, Z., Sieghart, W., Benke, D., Fritschy, J. M. and Somogyi, P. (1996). Differential synaptic localization of two major gamma-aminobutyric acid type A receptor alpha subunits on hippocampal pyramidal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93(21): 11939-11944.
- Reichardt, H. M. (2008). Gluco-mineralocorticoid Receptors, p. 543-547. *In* Offermanns, S. and Rosenthal, W., *Encyclopedia of molecular pharmacology*, 2nd ed. Springer, Berlin; New York.
- Rudolph, U. (2008). GABAergic System, p. 515-519. *In* Offermanns, S. and Rosenthal, W., *Encyclopedia of molecular pharmacology*, 2nd ed. Springer, Berlin; New York.
- Okada, M., Onodera, K., Van Renterghem, C., Sieghart, W. and Takahashi, T. (2000). Functional correlation of GABA(A) receptor alpha subunits expression with the properties of IPSCs in the developing thalamus. *J Neurosci*. 20(6): 2202-2208.
- Olsen, R. W. and Sieghart, W. (2008). International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acid(A) receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update. *Pharmacol Rev*. 60(3): 243-260.

Owens, W. A., Sevak, R. J., Galici, R., Chang, X., Javors, M. A., Galli, A., France, C. P. and Daws, L. C. (2005). Deficits in dopamine clearance and locomotion in hypoinsulinemic rats unmask novel modulation of dopamine transporters by amphetamine. *J Neurochem.* 94(5): 1402-1410.

Pratt, J. A. (1992). The neuroanatomical basis of anxiety. *Pharmacol Ther.* 55(2): 149-181.

Raud, S., Sutt, S., Luuk, H., Plaas, M., Innos, J., Koks, S. and Vasar, E. (2009). Relation between increased anxiety and reduced expression of alpha1 and alpha2 subunits of GABA(A) receptors in Wfs1-deficient mice. *Neurosci Lett.* 460(2): 138-142.

Riggs, A. C., Bernal-Mizrachi, E., Ohsugi, M., Wasson, J., Fatrai, S., Welling, C., Murray, J., Schmidt, R. E., Herrera, P. L. and Permutt, M. A. (2005). Mice conditionally lacking the Wolfram gene in pancreatic islet beta cells exhibit diabetes as a result of enhanced endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Diabetologia.* 48(11): 2313-2321.

Robbins, M. J., Calver, A. R., Filippov, A. K., Hirst, W. D., Russell, R. B., Wood, M. D., Nasir, S., Couve, A., Brown, D. A., Moss, S. J. and Pangalos, M. N. (2001). GABA(B2) is essential for g-protein coupling of the GABA(B) receptor heterodimer. *J Neurosci.* 21(20): 8043-8052.

Rozanski, A., Blumenthal, J. A. and Kaplan, J. (1999). Impact of psychological factors on the pathogenesis of cardiovascular disease and implications for therapy. *Circulation.* 99(16): 2192-2217.

Rudolph, U., Crestani, F., Benke, D., Brunig, I., Benson, J. A., Fritschy, J. M., Martin, J. R., Bluethmann, H. and Mohler, H. (1999). Benzodiazepine actions mediated by specific gamma-aminobutyric acid(A) receptor subtypes. *Nature.* 401(6755): 796-800.

Sapolsky, R. M., Romero, L. M. and Munck, A. U. (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev.* 21(1): 55-89.

Schneiderman, N., Ironson, G. and Siegel, S. D. (2005). Stress and health: psychological, behavioral, and biological determinants. *Annu Rev Clin Psychol.* 1: 607-628.

Sieghart, W. (1995). Structure and pharmacology of gamma-aminobutyric acidA receptor subtypes. *Pharmacol Rev.* 47(2): 181-234.

- Sieghart, W. and Sperk, G. (2002). Subunit composition, distribution and function of GABA(A) receptor subtypes. *Curr Top Med Chem.* 2(8): 795-816.
- Sigel, E. and Steinmann, M. E. (2012). Structure, function, and modulation of GABA(A) receptors. *J Biol Chem.* 287(48): 40224-40231.
- Soyka, M., Preuss, U. W., Hesselbrock, V., Zill, P., Koller, G. and Bondy, B. (2008). GABA-A2 receptor subunit gene (GABRA2) polymorphisms and risk for alcohol dependence. *J Psychiatr Res.* 42(3): 184-191.
- Strom, T. M., Hortnagel, K., Hofmann, S., Gekeler, F., Scharfe, C., Rabl, W., Gerbitz, K. D. and Meitinger, T. (1998). Diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy and deafness (DIDMOAD) caused by mutations in a novel gene (wolframin) coding for a predicted transmembrane protein. *Hum Mol Genet.* 7(13): 2021-2028.
- Sullivan, G. M., Coplan, J. D., Kent, J. M. and Gorman, J. M. (1999). The noradrenergic system in pathological anxiety: a focus on panic with relevance to generalized anxiety and phobias. *Biol Psychiatry.* 46(9): 1205-1218.
- Swift, M. and Swift, R. G. (2000). Psychiatric disorders and mutations at the Wolfram syndrome locus. *Biol Psychiatry.* 47(9): 787-793.
- Swift, M. and Swift, R. G. (2005). Wolframin mutations and hospitalization for psychiatric illness. *Mol Psychiatry.* 10(8): 799-803.
- Swift, R. G., Sadler, D. B. and Swift, M. (1990). Psychiatric findings in Wolfram syndrome homozygotes. *Lancet.* 336(8716): 667-669.
- Takei, D., Ishihara, H., Yamaguchi, S., Yamada, T., Tamura, A., Katagiri, H., Maruyama, Y. and Oka, Y. (2006). WFS1 protein modulates the free Ca(2+) concentration in the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett.* 580(24): 5635-5640.
- Ulrich-Lai, Y. M. and Herman, J. P. (2009). Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci.* 10(6): 397-409.
- Visnapuu, T., Plaas, M., Reimets, R., Raud, S., Terasmaa, A., Koks, S., Sutt, S., Luuk, H., Hundahl, C. A., Eskla, K. L., Altpere, A., Althoa, A., Harro, J. and Vasar, E. (2013). Evidence for impaired function of dopaminergic system in Wfs1-deficient mice. *Behav Brain Res.* 244: 90-99.

Visnapuu, T., Raud, S., Loomets, M., Reimets, R., Sutt, S., Luuk, H., Plaas, M., Koks, S., Volke, V., Alttoa, A., Harro, J. and Vasar, E. (2013). Wfs1-deficient mice display altered function of serotonergic system and increased behavioral response to antidepressants. *Front Neurosci.* 7: 132.

Watanabe, M., Maemura, K., Kanbara, K., Tamayama, T. and Hayasaki, H. (2002). GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs. *Int Rev Cytol.* 213: 1-47.

Whiting, P. J., McKernan, R. M. and Wafford, K. A. (1995). Structure and pharmacology of vertebrate GABA<sub>A</sub> receptor subtypes. *Int Rev Neurobiol.* 38: 95-138.

Wieland, H. A., Luddens, H. and Seeburg, P. H. (1992). A single histidine in GABA<sub>A</sub> receptors is essential for benzodiazepine agonist binding. *J Biol Chem.* 267(3): 1426-1429.

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

Wood, S. J. and Toth, M. (2001). Molecular pathways of anxiety revealed by knockout mice. *Mol Neurobiol.* 23(2-3): 101-119.

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

Zatyka, M., Ricketts, C., da Silva Xavier, G., Minton, J., Fenton, S., Hofmann-Thiel, S., Rutter, G. A. and Barrett, T. G. (2008). Sodium-potassium ATPase 1 subunit is a molecular partner of Wolframin, an endoplasmic reticulum protein involved in ER stress. *Hum Mol Genet.* 17(2): 190-200.

## LIHTLITSENTS

### Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina \_\_\_\_\_ Agnes Rikk \_\_\_\_\_  
(*autori nimi*)  
(sünnikuupäev: \_\_\_\_\_ 24.05.1992 \_\_\_\_\_)

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

\_\_\_\_\_ GABA-ergilise süsteemi geenide ekspressiooni muutused Wfs1-puudulikkusega hiirtel \_\_\_\_\_

(*lõputöö pealkiri*)

mille juhendajad on \_\_\_\_\_ Silva Sütt ja Lilian Kadaja-Saarepuu \_\_\_\_\_,  
(*juhendaja nimi*)

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, \_\_\_\_\_ 25.05.2014 \_\_\_\_\_ (*kuupäev*)