

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT

PATOFÜSIOLOOGIA OSAKOND

**IGF1 SIGNAALIRAJA UURIMINE WFS1-  
PUUDULIKKUSEGA HIIRTEL**

Erkki Kull

Magistritöö (30 EAP)

Juhendajad Prof. Margus Pooga

MSc Marilin Ivask

TARTU 2017

## **IGF1 signaaliraja uurimine *Wfs1*-puudulikkusega hiirtel**

Wolframi sündroom on haruldane autosomaalne retsessiivne haigus, mille põhjuseks on mutatsioonid *WFS1* geenis. Haiguse peamisteks sümptomiteks on varajane suhkurtõbi, nägemisnärvide atroofia, kurtus ning erinevad psühhiaatrilised häired. *WFS1* geen kodeerib WFS1 valku, mida leidub nii inimesel kui hiirel kõige rohkem ajus, südames, kopsudes ja pankrease insuliini sekreteerivates  $\beta$ -rakkudes. *Wfs1*-puudulikel hiirtel on näidatud nende märkimisväärselt väiksem kasv võrreldes nende metsiktüüpi pesakonnakaaslastega, samas nende kasvuhormooni ja IGF1 tase on kõrge. Selle tõttu uuriti *Wfs1*-puudulikel hiirtel kasvuhormooni ja IGF1 signaaliraja geenide *Igf1r* ja *Akt1* ekspressiooni taset ning määrati vereseerumist IGF1 ja tema kandjavalgude tasemed.

**Märksõnad:** *Wfs1*, kasvuhormoon, IGF1, *Igf1r*, *Akt1*

**CERCS kood:** B470 Füsioloogia

## **IGF1 signalling pathway in *Wfs1*-deficient mice**

Wolfram syndrome is a rare autosomal recessive disorder mainly caused by mutations in the *WFS1* gene. The disease is primarily characterized by diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy, deafness and various psychiatric disorders. *WFS1* gene encodes the WFS1 protein, which levels are highest in brain, heart, lungs and pancreatic  $\beta$ -cells. *Wfs1*-deficient mice have shown to be significantly smaller than their wild-type littermates, whereas their growth hormone and IGF1 levels are high. Because of that the expression of growth hormone and IGF1 pathway genes *Igf1r* and *Akt1* and the levels of IGF1 and its binding proteins in serum were studied.

**Keywords:** *Wfs1*, growth hormone, IGF1, *Igf1r*, *Akt1*

**CERCS code:** B470 Physiology

# SISUKORD

|   |    |
|---|----|
| KASUTATUD LÜHENDID .....                                    | 5  |
| SISSEJUHATUS .....  | 7  |
| 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....                                 | 8  |
| 1.1. WFS1 iseloomustus .....                                | 8  |
| 1.1.1 Wolframi sündroom.....                                | 8  |
| 1.1.2 <i>Wfs1</i> geen ja volframiin .....                  | 9  |
| 1.1.3 <i>Wfs1</i> -puudulikkusega hiired .....              | 10 |
| 1.2. Kasvuhormoon ja tema signaalirada.....                 | 11 |
| 1.3. Insuliinisarnased kasvufaktorid ja nende süsteem ..... | 13 |
| 1.3.1 IGF1 retseptor.....                                   | 13 |
| 1.3.2 IGF kandjavalgud .....                                | 14 |
| 1.4. AKT1 .....   | 15 |
| 2. EKSPERIMENTAALNE OSA .....                               | 16 |
| 2.1. Töö eesmärgid.....                                     | 16 |
| 2.2. Materjalid ja meetodid .....                           | 16 |
| 2.2.1 Katseloomad .....                                     | 16 |
| 2.2.2 Kudede ja seerumite prepareerimine .....              | 16 |
| 2.2.3 Kvantitatiivne reaalaaja PCR .....                    | 17 |
| 2.2.4 ELISA meetod .....                                    | 17 |
| 2.2.5 Statistiline analüüs.....                             | 17 |
| 2.3. Tulemused.....   | 18 |
| 2.3.1 <i>Wfs1</i> ekspressioon .....                        | 18 |
| 2.3.2 <i>Igflr</i> ekspressioon .....                       | 19 |
| 2.3.3 <i>Akt1</i> ekspressioon .....                        | 20 |
| 2.3.4 IGF1 taseme võrdlus.....                              | 21 |
| 2.3.5 IGF1 kandjavalgude tasemete võrdlus .....             | 22 |
| 2.3.5.1 IGFBP2.....   | 22 |

|                           |               |    |
|---------------------------|---------------|----|
| 2.3.5.2                   | IGFBP3.....   | 23 |
| 2.3.5.3                   | IGFBP5.....   | 24 |
| 2.4.                      | Arutelu ..... | 25 |
| KOKKUVÕTE.....            |               | 28 |
| SUMMARY .....             |               | 30 |
| TÄNUAVALDUSED.....        |               | 32 |
| KASUTATUD KIRJANDUS ..... |               | 33 |
| LIHTLITSENTS.....         |               | 40 |

## KASUTATUD LÜHENDID

AKT1 – Akt seriin/treoniin kinaas 1 (*Akt serine/threonine kinase 1*)

*Akt1* – Akt seriin/treoniin kinaas 1 geen hiirel (*mouse Akt serine/threonine kinase 1*)

*AKT1* – Akt seriin/treoniin kinaas 1 geen inimesel (*human Akt serine/threonine kinase 1*)

ATF6 $\alpha$  – aktiveeriv transkriptsioonifaktor 6 $\alpha$  (*activating transcription factor 6 $\alpha$* )

DIDMOAD – magediabeet, suhkurtõbi, nägemisnärv atroofia, kurtus (*Diabetes Insipidus, Diabetes Mellitus, Optic Atrophy, Deafness*)

ELISA – ensüüm-immuunsorptsioonimeetod (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

ER – endoplasmaatiline retiikulum (*endoplasmic reticulum*)

GH – kasvuhormoon (*growth hormone*)

GHR – kasvuhormooni retseptor (*growth hormone receptor*)

GHRH – kasvuhormooni vabastav hormoon (*growth hormone releasing hormone*)

*Hprt1* – hüpoksaantiin-guaaniin fosforibosüül transferaas 1 geen hiirel (*mouse hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 gene*)

IGF – insuliinisarnane kasvufaktor (*insulin-like growth factor*)

IGF1,2R – tüüp I ja II IGF retseptor (*type I and II IGF receptors*)

*Igf1r* – tüüp I IGF retseptori geen hiirel (*mouse type I IGF receptor gene*)

IGFBP – IGF seondumisvalk (*IGF binding protein*)

IR – insuliini retseptor (*insulin receptor*)

JAK2 – Janus kinaas 2 (*Janus kinase 2*)

PDK - fosfoinositool-sõltuv kinaas (*phosphoinositide-dependent kinase*)

PI3K - fosfatidüülinositol 3-kinaas (*phosphatidylinositol 3-kinase*)

PKB – proteiinkinaas B (*protein kinase B*)

SRIF – somatostatiin (*somatotropin release-inhibiting factor*)

WFS1 – volframiin (*wolframin*)

*Wfs1* – volframiin-1 geen hiirel (*mouse wolframin-1 gene*)

*WFS1* – volframiin-1 geen inimesel (*human wolframin-1 gene*)

Wfs1KO – Wfs1 geen inaktiveeritud (*Wfs1 knock-out*)

WS – Wolframi sündroom (*Wolfram syndrome*)

## SISSEJUHATUS

Wolframi sündroomi kirjeldati esmakordselt Saksa teadlaste Wolframi ja Wageneri poolt 1938. aastal kui varases eas avalduvat suhkurtõbe koos nägemise nõrgenemisega. Wolframi sündroom on haruldane autosomaalne retsessiivne haigus, mille peamisteks sümptomiteks on varajane suhkurtõbi, nägemisnärvide atroofia, magediabeet, kurtus ning erinevad endokrinoloogilised ja psühhiaatrilised häired. Wolframi sündroomi peamiseks põhjuseks on mutatsioonid 4. kromosoomi p16 piirkonnas asuvas *WFS1* geenis. *WFS1* geen kodeerib valku wolframiini (WFS1), mida leidub nii inimesel kui hiirel kõige rohkem ajus, südames, kopsudes ja pankrease insuliini sekreteerivates  $\beta$ -rakkudes ning vähem maksas ja neerudes. WFS1 valgu täpne funktsioon ei ole siiani teada. WFS1 lokalisatsioonimuster ajus vihjab tema mõjule emotsionaalse käitumise reguleerimises. WFS1 lokaliseerub rakus peamiselt endoplasmaatilises retiikulumis (ER), mis tähendab, et ta võib osaleda membraantranspordis, valkude protsessimisel ja ER-i  $\text{Ca}^{2+}$  homöostaasi reguleerimisel. Uuringud on näidanud, et WFS1 reguleerib negatiivse tagasiside kaudu ER stressi vastust, millest tulenevalt võivad WFS1 funktsiooni häirivad mutatsioonid põhjustada Wolframi sündroomile iseloomulikke neuronite ja  $\beta$ -rakkude apoptoosi. Seetõttu võib WFS1 olla tähtis kroonilise ER stressiga seotud haiguste patogeneesis, nagu näiteks diabeet.

Tartu Ülikoolis valmistatud *Wfs1*-puudulikkusega hiire abil on võimalik uurida kuidas WFS1 funktsionaalse valgu puudumine mõjutab hiire anatoomiat, füsioloogiat, arengut ja käitumist. *Wfs1*-puudulike hiirte puhul on näidatud, et nad on märkimisväärselt väiksemad kui nende metsiktüüpi pesakonnakaaslased, kuid nende kasvuhormooni ja insuliinisarnase kasvufaktor 1 (IGF1) tase on kõrge. See viitab probleemile kasvuhormooni või IGF1 signaalirajas, mida ei ole veel lähemalt uuritud.

Käesoleva magistritöö kirjanduse osas antakse ülevaade Wolframi sündroomist, WFS1 geeni ja valgu omadustest ja funktsioonidest ning kirjeldatakse lähemalt kasvuhormooni ja IGF1 signaalirada. *Wfs1*-puuduliku hiire kasvuprobleemide tuvastamiseks uuriti antud töö eksperimentaalses osas kasvuhormooni ja IGF1 signaalirajaga seotud geenide ekspressiooni ning IGF1 ja tema kandjavalgude taset veres. Magistritöö eesmärgiks oli uurida, kas *Wfs1*-puudulike hiirte väiksema kasvu võivad põhjustada kasvuhormooni ja IGF1 signaaliraja geenide alaeekspressioon või IGF1 ja tema kandjavalgude madalam tase.

Magistritöö on valminud Tartu Ülikooli Bio- ja siirdemeditsiini instituudis patofüsioloogia osakonnas.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1. WFS1 iseloomustus

### 1.1.1 Wolframi sündroom

Wolframi sündroomi (*Wolfram syndrome*, WS) (OMIM 222300) kirjeldasid esmakordselt Wolfram ja Wagener aastal 1938 kui varajast suhkurdiabeeti koos tugeva nägemisnärv atroofiaga (Wolfram ja Wagener, 1938). Haigus on kõige täpsemalt kirjeldatav kui neurodegeneratiivne häire, mis mõjutab kesknärvisüsteemi, perifeerseid närve ning neuroendokriinset kude (Strom jt., 1998).

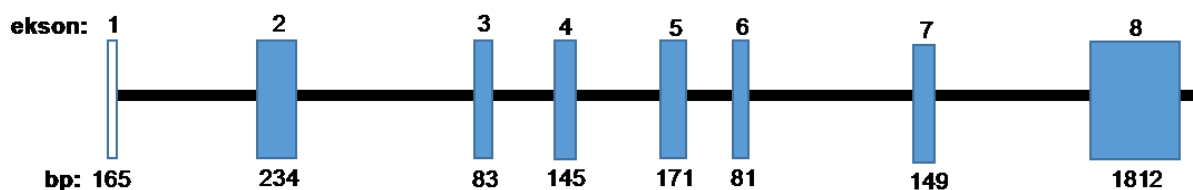
Wolframi sündroom on haruldane autosomaalne retsessiivne haigus, mille peamised sümptomid on varajane suhkurtõbi, magediabeet, nägemisnärv atroofia ja kurtus, millest tuleneb ka akronüüm DIDMOAD (*Diabetes Insipidus, Diabetes Mellitus, Optic Atrophy, Deafness*). Lisaks nendele sümptomitele võib esineda ka mitmeid erinevaid endokrinoloogilisi ja neuroloogilisi probleeme nagu näiteks vaimset alaarengut, psühhiaatrilisi haiguseid või ka ataksiat ning kuseteede atooniat (Strom jt., 1998; Hofmann jt., 2003). Wolframi sündroomi peamiseks põhjuseks on mutatsioonid 4. kromosoomi p16 piirkonnas asuvas *WFS1* geenis (Collier jt, 1996; Maleki jt, 2015).

Esimeseks sümptomiks on tavaliselt suhkurtõbi elu esimesel kümnendil ja nägemisnärv atroofia teisel kümnendil, mis on ka minimaalsed kriteeriumid Wolframi sündroomi diagnoosimiseks. Wolframi sündroomiga patsientide eluiga on 25-49 aastat. Surma põhjuseks on harilikult ajutüve atroofiast tingitud hingamisseiskus (Barrett jt., 1995; Strom jt., 1998; Rigoli jt., 2011). Lisaks füüsilistele sümptomitele kannatab umbes 60% Wolframi sündroomiga patsientidest psühhiaatriliste häirete käes. Kõige sagedamini esineb depressiooni, psühhoosi ning impulsiivset verbaalset ja füüsilist agressiooni (Swift jt., 1990; Swift ja Swift, 2000).

Wolframi sündroomi keskmine levimus populatsioonis on Suurbritannias hinnanguliselt 1/770 000 ning Põhja-Ameerikas 1/100 000 (Fraser ja Gunn, 1977; Barrett jt., 1995; Strom jt, 1998).

### 1.1.2 *Wfs1* geen ja volframiin

*WFS1* geen (joonis 1) asub inimesel neljanda kromosoomi 4p16.1 lookuses ning hiirel on *Wfs1* geen 5qB3 lookuses. *WFS1* geen kogupikkusega 33,4 kb koosneb ühest mittekodeerivast ja seitsmest kodeerivast eksonist, millest viimane, kaheksas ekson, on kõige suurem (2,6 kb) (Inoue jt., 1998; Strom jt., 1998). Kaheksandas eksonis on täheldatud kõige rohkem haigust tekitavaid mutatsioone, kuid kindlat genotüübi ja fenotüübi vahelist suhet ei ole täheldatud (Rigoli jt., 2011).



**Joonis 1.** *WFS1* geen, mis koosneb kaheksast eksonist. Ekson 1 on mittekodeeriv ja ekson 8 kõige suurem (Rigoli jt., 2011, muudatustega).

*WFS1* geen kodeerib 890 aminohappe pikkust ja umbes 100 kDa molekulmassiga transmembraanset endoplasmaatilise retiikulumi (ER) glükoproteiini volframiini (WFS1). WFS1 on hüdrofoobne valk, millel on üheksa hüdrofoobset transmembraanset domeeni ning hüdrofiilsed alad N- ja C-terminustes (Hofmann jt., 2003; Phibrook jt., 2005). Inimese ja hiire järjestused on kõrge homoloogiaga: 83% DNA ja 87% valgu tasemel. WFS1 ekspresseerub mitmetes kudedes. Kõige rohkem leidub valku ajus, südames, kopsudes ja pankrease insuliini sekreteerivates  $\beta$ -rakkudes ning vähem maksas ja neerudes (Strom jt., 1998; Hofmann jt., 2003). WFS1 on ajus ekspresseerunud eelkõige erinevates struktuurides, mis on seotud emotsionaalse käitumisega (Takeda jt., 2001; Luuk jt., 2008), mistõttu võib WFS1 olla seotud muutustega emotsionaalses käitumises.

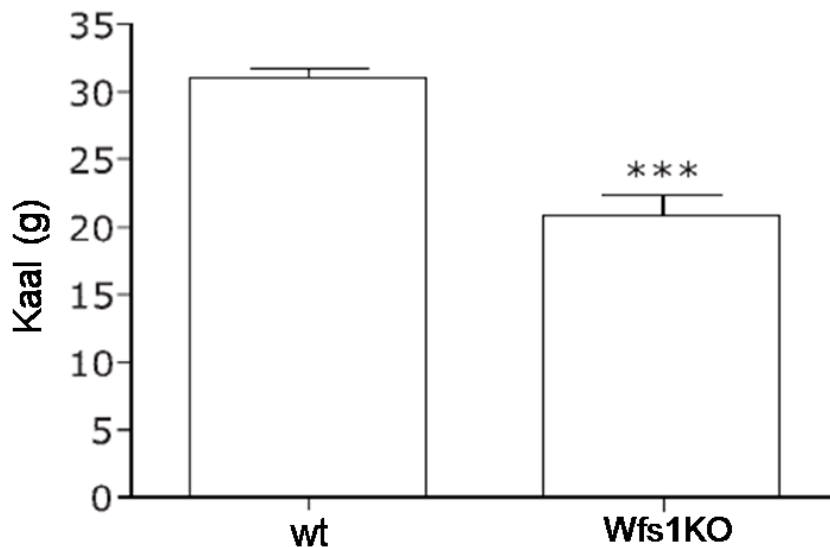
WFS1 lokaliseerub peamiselt ER-is, mis vihjab asjaolule, et ta osaleb membraantranspordi reguleerimisel, valkude protsessimisel ning ER-i  $\text{Ca}^{2+}$  homöostaasi reguleerimisel (Takeda jt., 2001). WFS1 võib ise käituda ER  $\text{Ca}^{2+}$  kanalina või selle regulaatorina (Osman jt., 2003). Imetajarakkudes on ER peamine  $\text{Ca}^{2+}$  hoiustamise asukoht ning  $\text{Ca}^{2+}$  on oluline valkude pakkimisel.  $\text{Ca}^{2+}$  kontsentratsiooni langus ER-is võib põhjustada valkude valesti pakkumise ja kogunemise, aktiveerides rakkudes ER stressi ning lõpuks põhjustada apoptoosi (Schroder ja Kaufman, 2005). Häiritud WFS1 ekspressioon võib seega ER-is esile kutsuda ebanormaalse rakusisese  $\text{Ca}^{2+}$  homöostaasi. Mutatsioonid, mis häirivad WFS1 funktsiooni, võivad selle tõttu põhjustada näiteks neuronite või  $\beta$ -rakkude degeneratsiooni, mis on iseloomulik WS-ile.

WFS1 vahendatud rakusisene  $\text{Ca}^{2+}$  regulatsioon võib seega kaitsta sekretoorseid rakke, mis on sõltuvad ER vahendatud  $\text{Ca}^{2+}$  signalisatsioonist (Osman jt., 2003).

Fonseca jt (2010) näitasid, et WFS1 reguleerib negatiivse tagasiside kaudu üht peamist ER stressi signaaliraja transkriptsioonifaktorit ATF6 $\alpha$ , surudes alla tema ekspressiooni ning soodustades lagundamist. ER stressi korral translokeerub ATF6 $\alpha$  tuuma ning tekitab seal ER stressi signaali sihtmärkide ülesregulatsiooni. Normaalse ER homöostaasi taastumise järgselt on WFS1 ülesandeks ATF6 $\alpha$  lagundamine. WFS1 puudumisel toimub ATF6 $\alpha$  ülesregulatsioon, mis põhjustab puudulikku ER stressi signalisatsiooni. WS patsientidel ja *Wfs1*-puudulikel hiirtel (*Wfs1*KO) on näidatud pöördumatu ER stressi kujunemine  $\beta$ -rakkudes ja neuronites, mis suunab need rakud apoptoosi. Sellest võib järeldada, et WFS1 üheks ülesandeks on ER stressi signaliseerimise negatiivne regulatsioon, mis omakorda viitab tema rollile haiguste patogeneesis, millele on iseloomulik krooniline ER stress, nagu näiteks pankrease  $\beta$ -rakkude apoptoos diabeedi korral (Fonseca jt., 2010).

### **1.1.3 *Wfs1*-puudulikkusega hiired**

*Wfs1*-puudulikkusega hiirte liine on loodud kolmes erinevas laboris (Ishihara jt., 2004; Riggs jt., 2005; Luuk jt., 2008). Tartu Ülikooli Bio- ja siirdemeditsiini instituudi füsioloogia osakonnas on loodud *Wfs1*-puudulikkusega hiired 8. eksoni väljalülitamise teel, mis on lähedane mudel WS sündroomiga patsientidele, sest enamik WS mutatsioone on leitud *WFS1* geeni 8. eksonis (Luuk jt., 2008). *Wfs1*-puudulikud hiired on märkimisväärselt väiksemad kui nende metsiktüüpi (wt) pesakonnakaaslased (joonis 2), samas nende kasvuhormooni rada on aktiveeritud ning insuliinisarnase kasvufaktori (IGF1) hormooni tase võrreldes wt hiirtega vereplasmas kõrge, mistõttu oleks vaja täpsemalt uurida muutusi kasvuhormooni ja teiste hormoonide signaalradades (Kõks jt., 2009). Samuti on *Wfs1*-puudulikel hiirtel häireid veresuhkru taseme regulatsioonis. Glükoositaluvuse testiga näidati, et *Wfs1*-puudulikel hiirtel oli veresuhkru tase 2-3 korda normaalsest kõrgem pärast glükoosi manustamist (Luuk jt., 2009).



**Joonis 2. *Wfs1*-puudulike ja wt hiirte kehakaalude võrdlus.** Mutantsed hiired on märkimisväärselt väiksema kehakaaluga. *Wfs1KO* – *Wfs1*-puudulikud hiired, wt – metsiktüüpi hiired, \*\*\* -  $p < 0,001$  (Kõks jt, 2009, muudatustega).

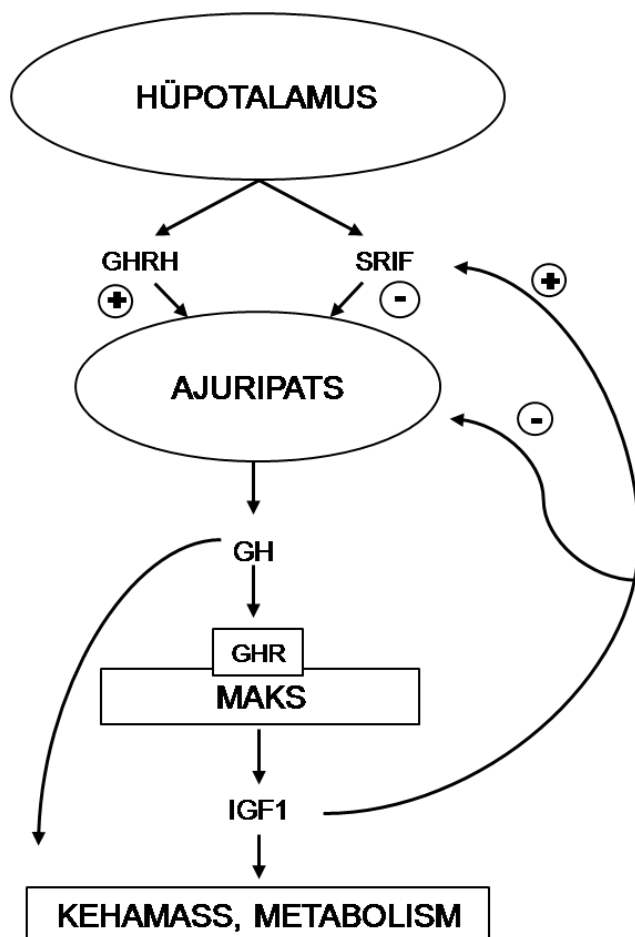
Luuk jt. (2008) on näidanud, et hiirtel on *Wfs1* ekspressioonitase kõrge ventraalses juttkehas ja mandelkehas, mis viitab tema mõjule emotsionaalsele käitumisele, eriti hirmule ja ärevusele. WFS1 ekspressioonimustri uurimisel hiire ajus on leitud, et see korreleerub psühhiaatriliste sümptomite, kuulmiskahjustuste ja magediabeedi esinemisega WS patsientidel, viidates sarnasustele hiire ja inimese WFS1 ekspressioonimustrites (Luuk jt., 2008; Kõks jt, 2011). *Wfs1*-puudulikel hiired on madalama lokomotoorse aktiivsusega, kuid stressirohketes tingimustes on neil tuvastatud probleeme käitumusliku kohanemisega. Uudsetesse ja stressirikastes keskkondadesse paigutatud *Wfs1*-puudulikel hiirtel esines märkimisväärselt ärevuse laadse käitumise suurenemist (Luuk jt, 2009).

Lisaks on näidatud, et *Wfs1*-puudulikkudel hiirtel on võrreldes wt hiirtega vähenenud fertiilsus, kuigi spermide liikuvuses häireid ei täheldatud. See on tõenäoliselt põhjustatud vähenenud spermatogeensete rakkude hulgast ja muutustest spermide morfoloogias (Noormets jt., 2009).

## 1.2. Kasvuhormoon ja tema signaalirada

Kasvuhormoon (GH) on peptiidhormoon, mis stimuleerib kasvu, rakkude paljunemist ning regeneratsiooni inimestes ja teistes loomades. Kasvuhormooni sekretsiooni reguleerivad hüpotalamuse rakud (Martin ja Millard, 1986). Kasvuhormooni sekretsiooni ajuripatsist reguleerivad GH-vabastav hormoon (GHRH) ning somatostatiin (SRIF), mis omakorda on

reguleeritud vere GH ja IGF1 tasemete poolt. GHRH tõstab rakulist cAMP taset ning aktiveerib signaaliraja, mis aktiveerib GH ekspressiooni ja sekretsiooni (Bilezikjian ja Vale, 1983; Labrie jt., 1983). SRIF omakorda inhibeerib GHRH poolt aktiveeritud adenülaadi tsüklaasi, mis langetab cAMP taset ja inhibeerib GH vabanemist (Yamada jt., 1992). GH vabanemisel vereringesse suurendab ta paljudes kudedes, eelkõige maksas, IGF1 produktsiooni, millest tulenevalt tõuseb vere IGF1 tase. Kõrgenenud IGF1 tase inhibeerib edaspidist GH sekretsiooni (Roelfsema ja Clark, 2001) (joonis 3).



**Joonis 3. Kasvuhormooni regulatsioon.** GH – kasvuhormoon, IGF1 – insuliinisarnane kasvufaktor 1, GHR – kasvuhormooni retseptor, GHRH – GH-vabastav hormoon, SRIF – somatostatiin, (+) – signaaliraja stimulatsioon, (-) – signaaliraja inhibitsioon (Carvallo, 1997, muudatustega).

Kasvuhormooni signaaliraja aktiveerumiseks on vajalik kasvuhormooni seondumine kasvuhormooni retseptorile (GHR). Kui GH on oma retseptoriga seondunud, aktiveerub GHR-iga seotud JAK2 (Janus kinaas) türosiinkinaas. JAK2 aktiveerumisega kaasneb JAK2 ja GHR türosiini jääkide fosforüleerimine ning moodustub JAK2/GHR kompleks. Fosforüleeritud türosiinide abil tuuakse JAK2/GHR kompleksidesse signaalvalke, reguleerimaks GH-tundlike geenide transkriptsiooni. Selle tulemusena aktiveeruvad mitmed

signaalrajad ja rakuliste vastuste mehhanismid, näiteks IGF1 ekspressiooni eest vastutava geeni ekspressioon ning AKT1 (Akt seriin/treoniin kinaas 1) signaalrada. Kõikide nende tegurite koosmõjul tekitatakse erinevad vastused kasvuhormooni tasemele, kaasaarvatud kehamassi suurenemine ning metabolismi reguleerimine (Carter-Su, 2016).

### **1.3. Insuliinisarnased kasvufaktorid ja nende süsteem**

Insuliinisarnaseid kasvufaktoreid (IGF) ekspresseeritakse üle kogu organismi ning nende peamiseks ülesandeks on rakkude kasvu ja diferentseerumise reguleerimine. Antud süsteemi peamised tuvastatud komponendid on IGF1 ja IGF2, tüüp I ja II IGF retseptorid (IGF1R ja IGF2R) ning IGF siduvad valgud (IGFBP-d). IGF1 ja IGF2 on kaks kõrge homoloogiaga väikest hormoonvalku, mis on struktuurilt sarnased insuliinile (Hwa jt., 1999). IGF-ide sünteesi stimuleerib peamiselt kasvuhormoon ning nende vahendusel realiseerub kasvuhormooni toime kudedes (Spagnoli ja Rosenfeld, 1996). IGF-ide mitogeenseid mõjusid vahendatakse peamiselt läbi tüüp I IGF retseptori, mis omab türosiinkinaasi aktiivsust ning mille tulemusena aktiveeritakse rakkudes mitoos (Nissley ja Lopaczynski, 1999).

IGF-id on essentsiaalsed normaalse kasvu tagamiseks imetajatel ja teistel selgroogsetel. IGF1 tase on sõltuv vanusest (Harrela jt., 1996). IGF1 manustamisel rottidele suureneb nende kasv ja valgusünteesi tase (Tomas jt., 1992). Hiirtel on näidatud IGF1 üleekspressiooni tulemusena kuni 30% suuremat kehakaalu (Mathews jt., 1988). *Igf1*- ja *Igf2*-puudulikud hiired on jällegi kuni 60% väiksema sünnikaaluga võrreldes wt hiirtega. Lisaks on *Igf1*-puudulikel hiirtel suurenenud sünnijärgne suremus ning ellujäämise korral vähenenud sünnijärgne kasvukiirus, millest võib järeldada, et IGF-id on vajalikud normaalseks kasvuks ja ellujäämiseks (Baker jt., 1993; Liu jt., 1993; Wang jt., 1999).

#### **1.3.1 IGF1 retseptor**

IGF1 retseptor on peamiseks IGF-ide bioloogiliste mõjude vahendajaks. IGF1R on transmembraanne glükoproteiin, mis omab ekstratsellulaarseid ligand-siduvaid ja intratsellulaarseid türosiinkinaasi domeene (Ullrich jt., 1986). IGF1R omab kõrget struktuurilist ja järjestuslikku sarnasust insuliini retseptoriga (IR) (De Meyts ja Whittaker, 2002). Ligandile seondumine indutseerib IGF1R autofosforülatsiooni, mis omakorda aktiveerib mitmeid signaali transduktsiooni kaskaade, näiteks fosfatidüülinoositol 3-kinaas (PI3K)-Akt kaskaadi (Dupont ja LeRoith, 2001). Aktiveeritud PI3K sünteesib

membraanseoselisi fosforüleeritud inositoole, mis omakorda aktiveerivad fosfoinositool-sõltuvad kinaasid (PDK). PDK-d seejärel aktiveerivad teised proteiinkinaasid, sealhulgas Akt/Proteiin Kinaas B (Akt/PKB) (Cianfarani jt., 2007).

*Igflr*-puudulikud vastsündinud hiired kaaluvad keskmiselt 45% vähem kui wt pesakonnakaaslased ning surevad vahetult pärast sündimist (Baker jt., 1993; Liu jt., 1993). Hiirte ajudes takistab *Igflr* inaktivatsioon aksonite remüeliniseerumist (Mason jt., 2003). Pankrease  $\beta$ -rakkudes põhjustab *Igflr* deletsioon glükoos-stimuleeritud insuliini sekretsiooni defekte ja langenud glükoositaluvust (Kulkarni jt., 2002).

### 1.3.2 IGF kandjavalgud

IGF-id on *in vivo* reeglina seotud IGFBP-de külge, mille funktsioonideks on olla IGF-ide kandjavalgudeks, pikendada nende poolestusaega ning reguleerida nende kättesaadavust ja aktiivsust. Käesoleva hetkeni on iseloomustatud kuus imetaja IGFBP-d (IGFBP1-6) (Jones ja Clemmons, 1995). Veres on suurem osa IGF-dest (70-80%) seotud IGFBP3 külge, ülejäänud IGF-id on seotud kas teiste IGFBP-dega või ringlevad vabas vormis. IGFBP3 tase on sõltuv vanusest (Harrela jt., 1996). Vabalt ringleb veres alla 5% IGF-idest (Yakar jt., 2002).

IGFBP1, 2, 3 ja 5 üleekspressioon põhjustab hiirtes üldjuhul kasvu aeglustumist. Fertiilsuse vähenemist ja glükoosi homöostaasi häireid on leitud IGFBP1 ja IGFBP3 üleekspressiooni puhul (Kadaba jt., 1995; Modric jt., 2001; Salih jt., 2004). IGFBP4 üleekspressioon silelihaskudedes põhjustab silelihaste kasvu- ja arenguhäireid (Wang jt., 1998). IGFBP5 üleekspressioon inhibeerib inimese rinnavähi rakkude kasvu (Butt jt., 2003). IGFBP-de alaekspressiooni puhul on fenotüübilisi muutusi vähem täheldatud. *Igfbp1*-puudulikel hiirtel on näidatud maksa suurenenud tundlikkust apoptootilistele stiimulitele (Leu jt., 2003). *Igfbp2*-puudulikkuse puhul on hiired normaalse kehakaaluga, kuid neil on väiksem põrn ning suurem maks, mis vihjab IGFBP2 rollile kudede ja organite kasvu reguleerimises (Wood jt., 2000). Sebrakalade puhul on näidatud, et *Igfbp3*-puudulikel kaladel on hilineunud kõriluustiku ja kõhre areng ning märkimisväärselt vähenenud sisekõrva suurus (Li jt., 2005). Närilistel toodetakse IGFBP-sid erinevate koe- ja rakutüüpide poolt, mistõttu kompenseeritakse puudujääk arvatavasti teiste valkude abil. Wood jt., on näidanud, et *Igfbp2*-puudulike hiirte puhul oli IGFBP1, 3 ja 4 tase seerumis suurenenud (Wood jt., 2000).

## 1.4. AKT1

*AKT1* geen kodeerib seriin-treoniin kinaasi AKT1 (tuntud ka kui proteiinkinaas B alfa, *Protein Kinase B Alpha*, PKBa), mis on oluline efektor PI3K signalisatsiooni reguleerimises. Äädikakärbses on näidatud, et AKT1 on oluline rakkude kasvu ja ellujäämise reguleerimises läbi PI3K/Akt signaaliraja (Weinkove jt., 1999; Scanga jt., 2000). Hiirtes leidub konserveerunud signaalirada, kus IGF1 stimuleerib AKT1 aktiivsust, millest võib järeldada, et hiirtes on AKT1 oluline vahelüli signaalirajas, mis reguleerib rakkude ja organismi kasvu. *Akt1*-puudulikud hiired olid wt hiirtest umbes 20% väiksema sünnikaaluga. Kaaluerinevus säilis hiirte täiskasvanuikka jõudmiseni ning ei varieerunud sugude vahel. *Akt1*-puudulikel hiirtel esineb fenotüübilisi sarnasusi *Igf1*-puudulike hiirtega, mistõttu on tõenäoline, et IGF1 kontrollib organismi kasvu läbi AKT1/PKBa (Liu jt., 1993; Cho jt., 2001).

## **2. EKSPERIMENTAALNE OSA**

### **2.1. Töö eesmärgid**

*Wfs1* geeni välja lülitamise tõttu on mutantsed hiired oma metsiktüüpi pesakonnakaaslastest väiksemad, kuid nende kasvuhormooni signaalirada on aktiveeritud ja vereplasma IGF1 tase kõrge. Seetõttu oligi antud töö eesmärgiks uurida, kas väiksema kasvu põhjuseks võiks olla IGF1R ja AKT1 kodeerivate geenide alaekspressioon või IGF1 ja IGF1BP-de madalam tase.

### **2.2. Materjalid ja meetodid**

#### **2.2.1 Katseloomad**

Katseloomadena kasutati Tartu Ülikooli bio- ja siirdemeditsiini instituudis valmistatud ja paljundatud *Wfs1*-puudulikkusega homosügootseid (*Wfs1*KO) hiiri (Luuk jt., 2009) ning kontrolliks wt hiiri. Katsetes kasutati 7-8-kuu vanuseid F2 põlvkonna isasloomi, kelle geneetiline taust oli 129S6/SvEvTu x 129S6/SvEvTu. Hiiri hoiti puurides 8-10 kaupa 22°C juures, 12-h/12-h valge-/pimetsükliga ning neil oli vaba juurdepääs veele ja toidule. Mõlemas katsegrupis kasutati 8 hiirt. Loomkatsete teostamiseks oli luba number 71, 08.04.2011.

#### **2.2.2 Kudede ja seerumite prepareerimine**

Katseloomad surmati dekapitatsiooniga antud magistritöö juhendaja Marilyn Ivaski poolt, kes omab ka vastavat loomakatse läbiviimise tunnistust. Hiirtelt koguti veri ning eemaldati maks, kopsud, süda ja neerud. Eemaldatud kudedega tuubid asetati koheselt vedelasse lämmastikku ning säilitati kuni analüüside teostamiseni -80°C juures. Lisaks eraldati kogutud täisverest seerum. Tuubidel lasti seista toatemperatuuril 15 min ja seejärel fuugiti 1000 g 10 min 4°C juures. Läbipaistev seerumi osa koguti uude tuubi ning säilitati analüüside teostamiseni -80°C juures.

### 2.2.3 Kvantitatiivne reaalaaja PCR

RNA eraldamiseks kudedest kasutati TRIzol reagenti (15596026, Invitrogen/Thermo Fisher Scientific) ning cDNA sünteesimiseks High Capacity cDNA Reverse Transcriptase komplekti (4368814, Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific) vastavalt tootja protokollidele. Kvantitatiivse reaalaaja PCR-i läbiviimiseks kasutati Taqman Gene Expression komplekti (Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific) ja ViiA™ 7 Real-Time PCR süsteemi (Thermo Fisher Scientific). Kontrollina kasutati koduhoidja geeni *Hprt1*, mida peetakse kõige efektiivsemalt ja stabiilsemalt ekspresseeruvaks geeniks (Raud jt., 2009). Kõik reaktsioonid tehti neljas korduses, et vältida võimalikke ebatäpsusi. Reaktsioonide lõppmahuks oli 10 µl, kasutades 220 ng cDNA-d.

### 2.2.4 ELISA meetod

Vereseerumitest IGF1, IGFBP2, IGFBP3, IGFBP5 valkude taseme määramiseks kasutati vastavalt Mouse IGF1 ELISA (ab100695), Mouse IGFBP2 ELISA (ab100691), Mouse IGFBP3 ELISA (ab100692) ning Mouse IGFBP5 ELISA (ab100693) (Abcam) süsteeme. Kõik katsed teostati vastavalt tootja poolt ettekirjutatud juhistele. Kõiki proove ja standardeid analüüsiti kahes korduses. Optiline tihedus mõõdeti 450 nm juures.

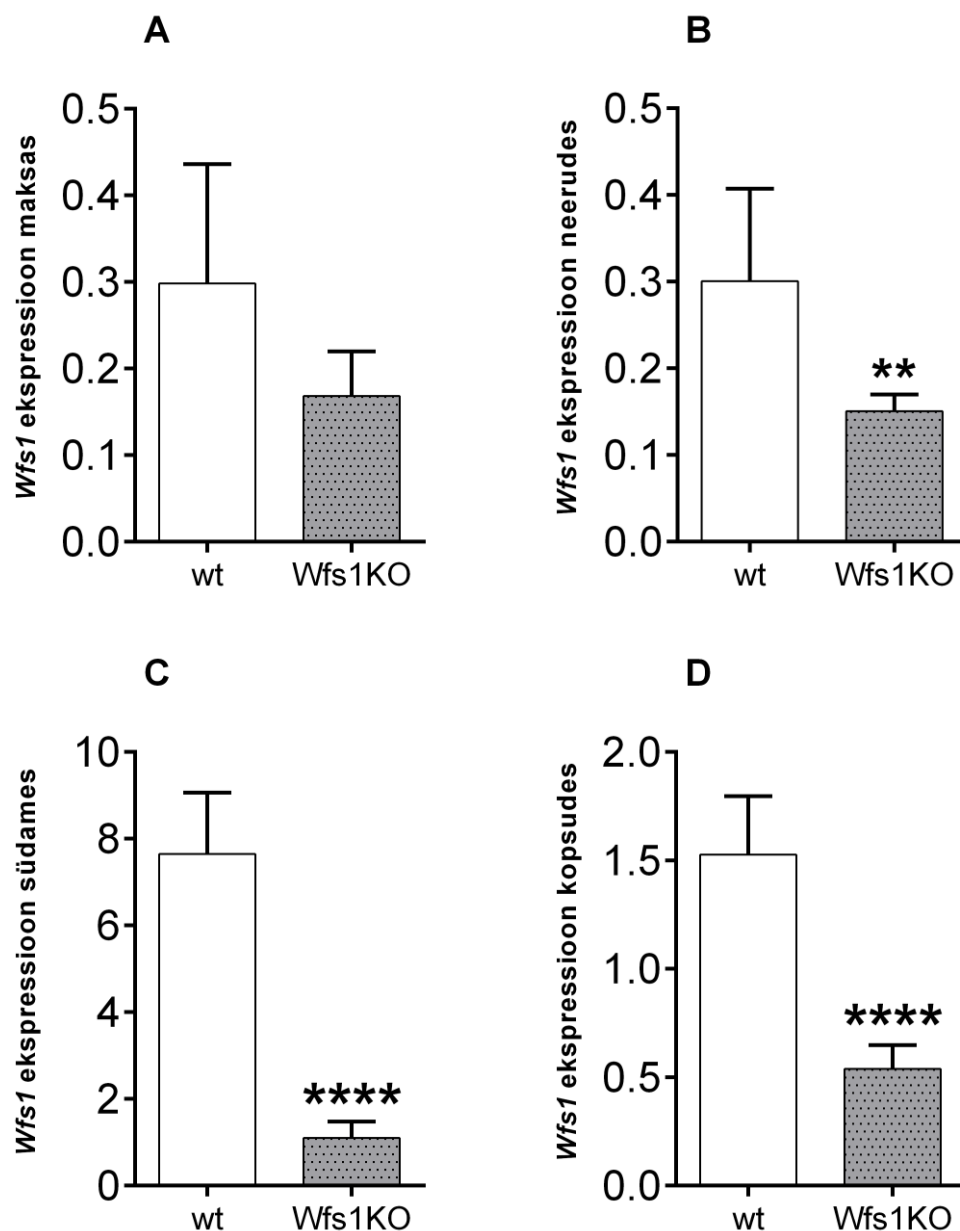
### 2.2.5 Statistiline analüüs

Geeniekspressiooni analüüsiks kasutati  $2^{-\Delta CT}$  meetodit. Nii geeniekspressiooni kui ka ELISA andmed on esitatud kui keskmine  $\pm$  standardhälve. Andmete analüüsimiseks kasutati sõltumatut Welchi t-testi (*Welch's t-test/unequal variances t-test*). Oluliseks loeti p-väärtust, mis oli väiksem kui 0,05 ( $p < 0,05$ ). Tulemuste analüüs teostati GraphPad Prism versioon 5 tarkvaraga (GraphPad Software, Inc.).

## 2.3. Tulemused

### 2.3.1 *Wfs1* ekspressioon

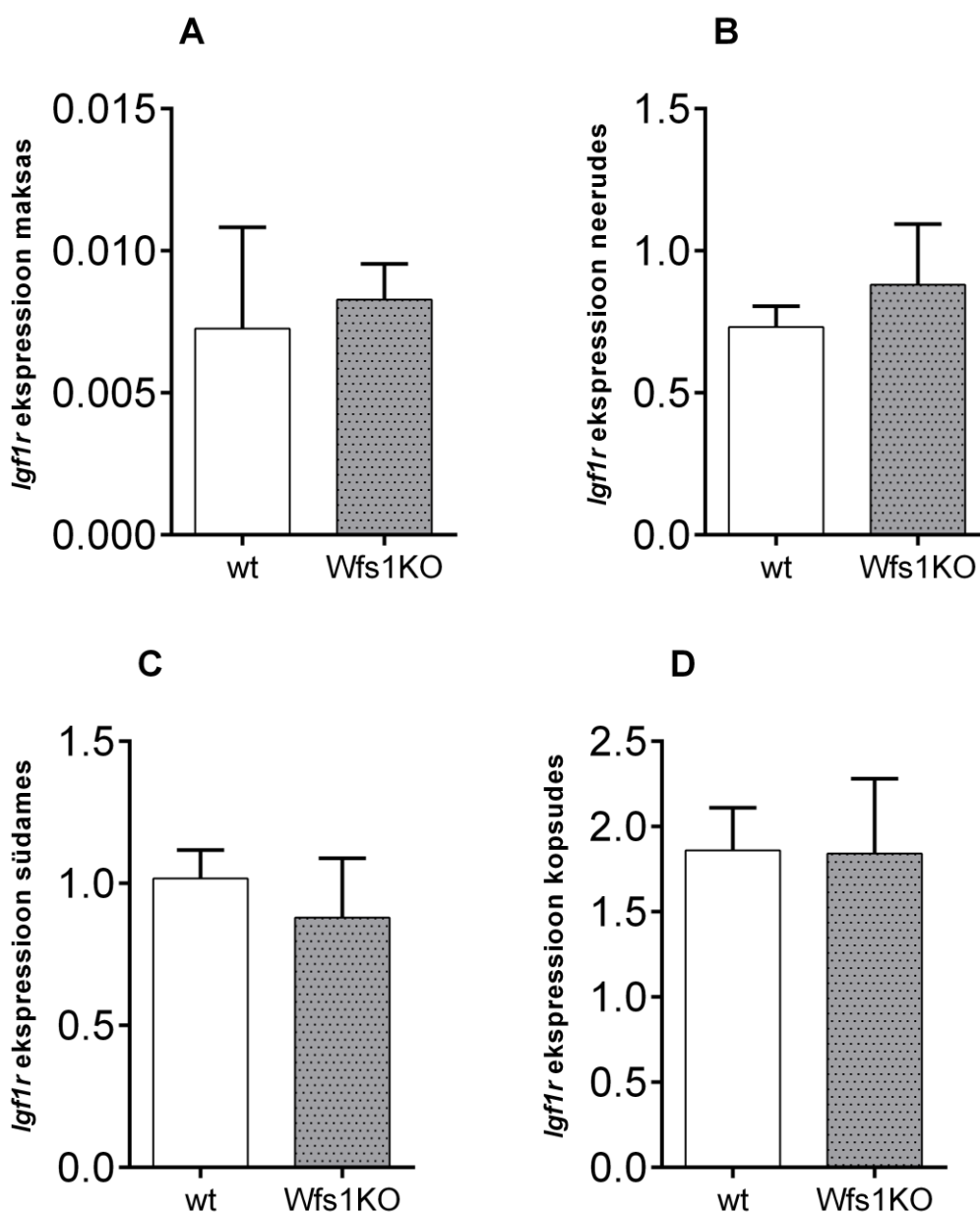
*Wfs1* ekspressiooni tase oli *Wfs1*-puudulikel hiirtel võrreldes metsiktüüpi hiirtega kõikides uuritud kudedes langenud, kuid maksas ei olnud tulemus statistiliselt oluline ( $p > 0,05$ ) (joonis 4A). Neerudes oli erinevus statistiliselt oluline ( $p < 0,05$ ) (joonis 4B). Südames ja kopsudes oli *Wfs1*KO ja wt hiirte vahel väga suur statistiline erinevus ( $p < 0,0001$ ) (joonis 4C ja D).



**Joonis 4.** *Wfs1* ekspressiooni tase *Hprt1* suhtes maksas (A), neerudes (B), südames (C) ja kopsudes (D). Neerudes, südames ja kopsudes oli *Wfs1*KO hiirte *Wfs1* ekspressiooni tase madalam ning statistiliselt oluline ( $p < 0,05$ ). Maksas ei esinenud statistilist erinevust. wt – metsiktüüpi hiirte *Wfs1* ekspressiooni tase, *Wfs1*KO – *Wfs1*-puudulike hiirte *Wfs1* ekspressiooni tase. \*\* -  $p < 0,05$  võrreldes wt hiirtega (Welch'i t-test), \*\*\*\* -  $p < 0,0001$  võrreldes wt hiirtega (Welch'i t-test).

### 2.3.2 *Igf1r* ekspressioon

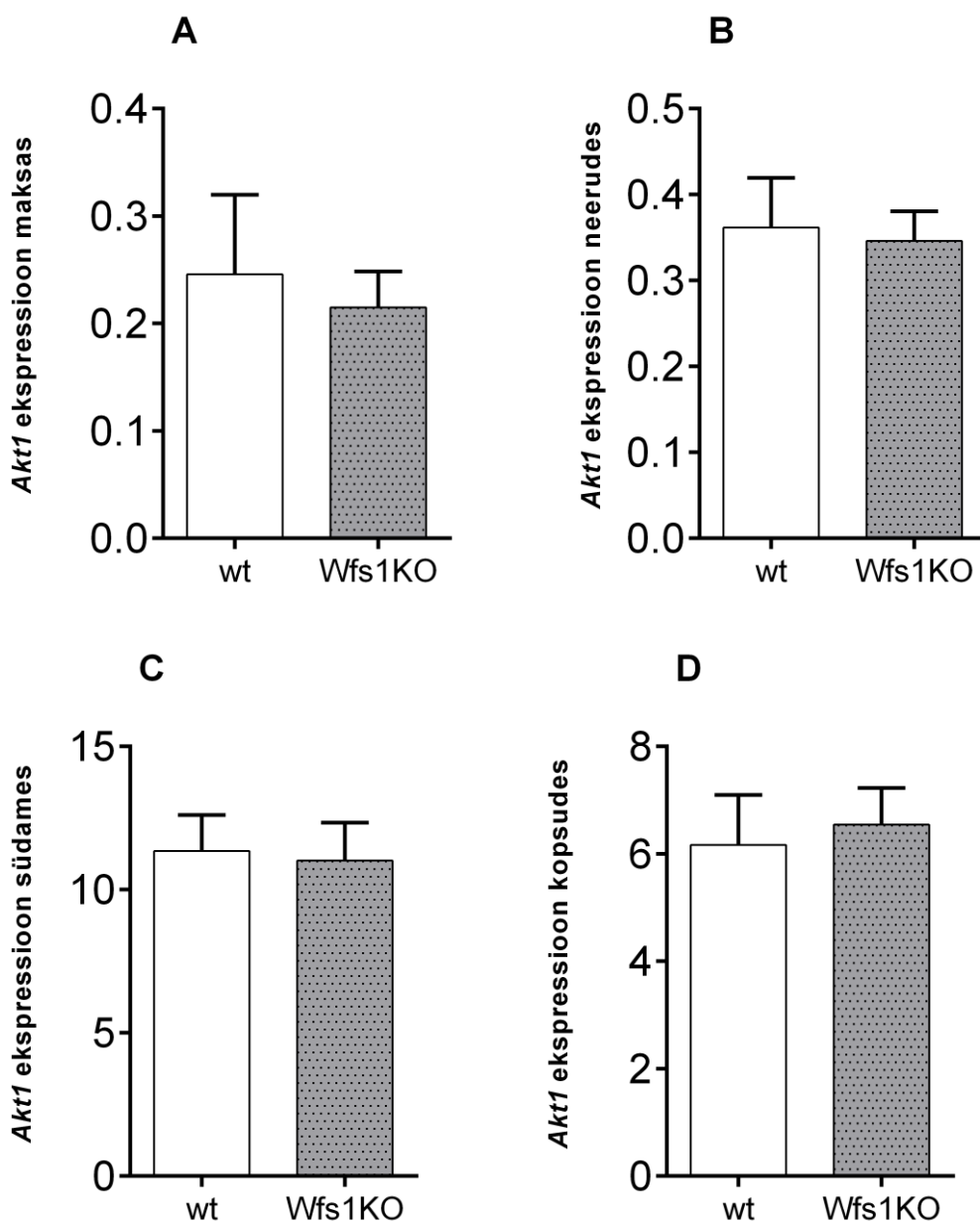
*Igf1r* ekspressioon ei olnud uuritud kudedes statistiliselt olulisel määral muutunud (joonis 5). Maksas ja neerudes oli Wfs1KO hiirtel näha *Igf1r* ekspressiooni taseme suurenemise trendi, kuid statistilist erinevust ei esinenud ( $p > 0,05$ ) (joonis 5A ja B). Südames oli Wfs1KO hiirtel *Igf1r* ekspressioon langevas trendis, kuid mitte statistiliselt oluline ( $p > 0,05$ ) (joonis 5C). Kopsudes ei esinenud olulisi erinevusi *Igf1r* ekspressiooni tasemes (joonis 5D).



**Joonis 5. *Igf1r* ekspressiooni tase *Hprt1* suhtes maksas (A), neerudes (B), südames (C) ja kopsudes (D).** Maksas ja neerudes oli Wfs1KO hiirtel näha *Wfs1* ekspressiooni tõusu ning südames languse trendi võrreldes wt hiirtega. Muutused ei olnud statistiliselt olulised ( $p > 0,05$ ). Kopsudes ei esinenud genotüüpide vahel erinevusi. wt – metsiktüüpi hiirte *Igf1r* ekspressiooni tase, Wfs1KO – *Wfs1*-puudulike hiirte *Igf1r* ekspressiooni tase.

### 2.3.3 *Akt1* ekspressioon

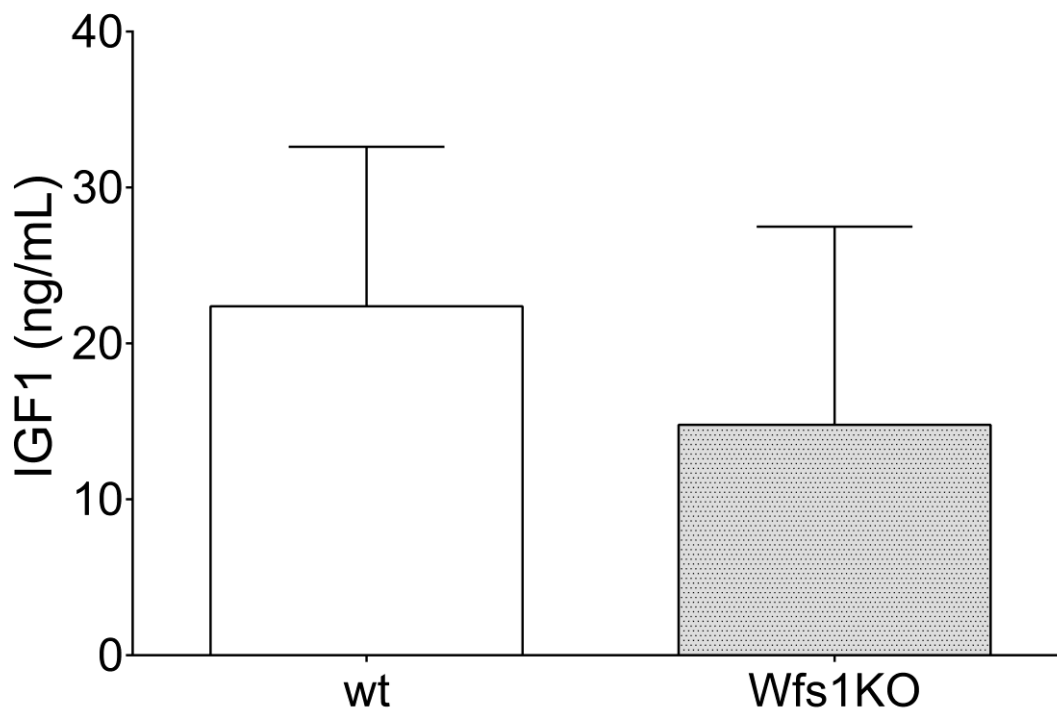
*Akt1* ekspressiooni tase ei olnud uuritud kudedes statistiliselt olulisel määral muutunud (joonis 6). Maksas ja neerudes oli Wfs1KO hiirtel näha *Akt1* ekspressiooni languse trendi võrreldes metsiktüüpi hiirtega, kuid mitte statistiliselt olulisel määral ( $p>0,05$ ) (joonis 6A ja B). Kopsudes oli Wfs1KO hiirtel näha *Akt1* ekspressiooni taseme suurenemise trendi aga statistilist erinevust ei esinenud ( $p>0,05$ ) (joonis 6D). Südames ei olnud Wfs1KO ja wt hiirte *Akt1* ekspressiooni tasemes olulisi erinevusi (joonis 6C).



Joonis 6. *Akt1* ekspressiooni tase *Hprt1* suhtes maksas (A), neerudes (B), südames (C) ja kopsudes (D). Maksas ja neerudes oli Wfs1KO hiirtel näha *Akt1* languse ning kopsudes tõusu trendi. Muutused ei olnud statistiliselt olulised. Südames ei esinenud genotüüpide vahel muutusi. wt – metsiktüüpi hiirte *Akt1* ekspressiooni tase, Wfs1KO – *Wfs1*-puudulike hiirte *Akt1* ekspressiooni tase.

### 2.3.4 IGF1 taseme võrdlus

IGF1 tase määrati vereseerumitest ELISA meetodiga. Wfs1KO ja wt hiirte IGF1 tasemete võrdlemisel oli näha mutantsetel hiirtel IGF1 taseme languse trendi, kuid mitte statistiliselt olulisel määral ( $p > 0,05$ ) (joonis 7).



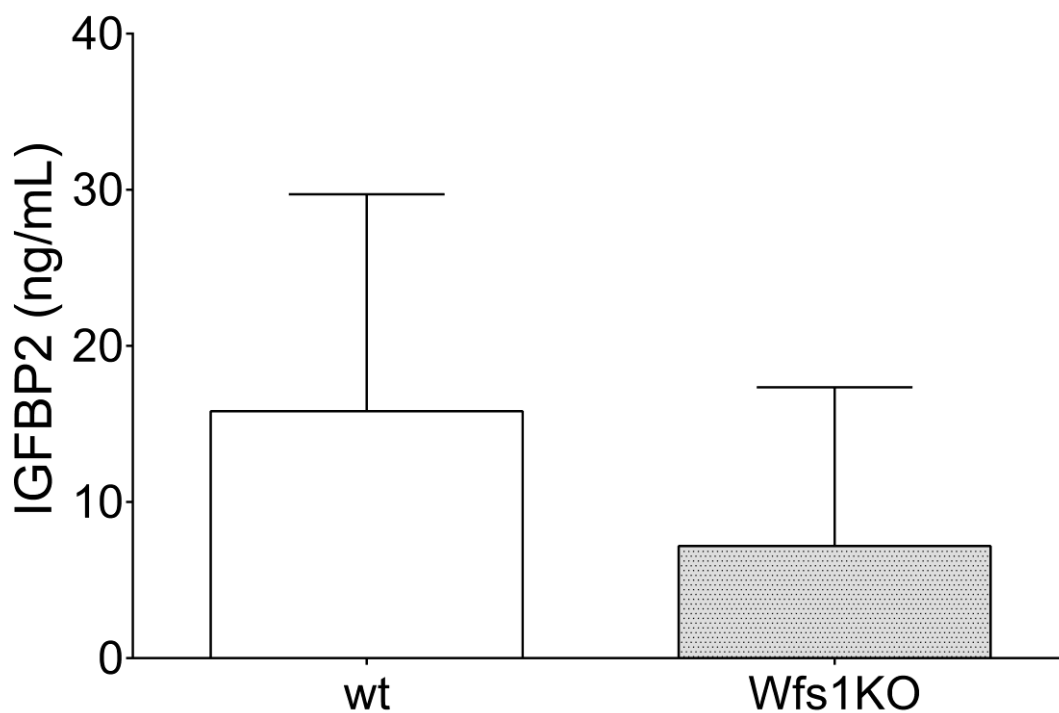
**Joonis 7. IGF1 tasemed *Wfs1*-puudulike ja metsiktüüpi hiirte vereseerumis.** Wfs1KO hiirtel on näha IGF1 taseme languse trendi, kuid vahe ei ole statistiliselt oluline ( $p > 0,05$ ). wt – metsiktüüpi hiirte IGF1 tase vereseerumites, Wfs1KO – *Wfs1*-puudulike hiirte IGF1 tase vereseerumites.

### 2.3.5 IGF1 kandjavalgude tasemete võrdlus

Määrati IGFBP2, IGFBP3 ja IGFBP5 tasemed vereseerumitest.

#### 2.3.5.1 IGFBP2

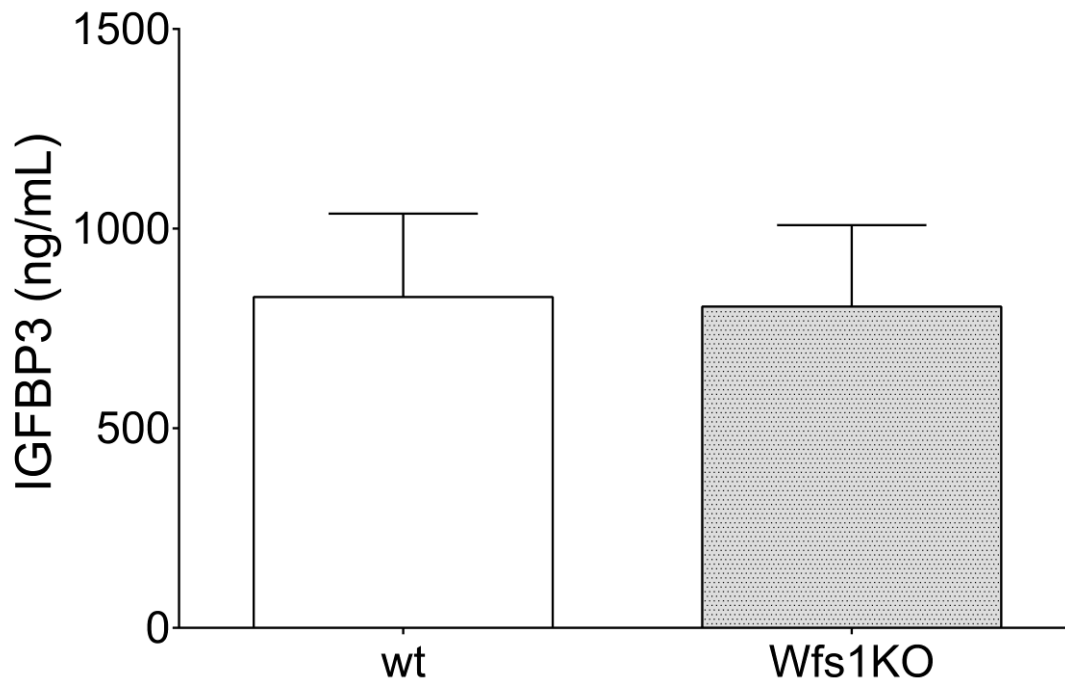
IGFBP2 sisalduse võrdlemisel oli *Wfs1*KO hiirtel võrreldes wt hiirtega näha IGFBP2 languse trendi, kuid muutus ei olnud statistiliselt oluline ( $p > 0,05$ ) (joonis 8).



**Joonis 8. IGFBP2 tasemed *Wfs1*-puudulike ja metsiktüüpi hiirte vereseerumis.** *Wfs1*KO hiirtel on näha IGFBP2 taseme languse trendi, kuid vahe ei ole statistiliselt oluline ( $p > 0,05$ ). wt – metsiktüüpi hiirte IGFBP2 tase vereseerumites, *Wfs1*KO – *Wfs1*-puudulike hiirte IGFBP2 tase vereseerumites.

### 2.3.5.2 IGFBP3

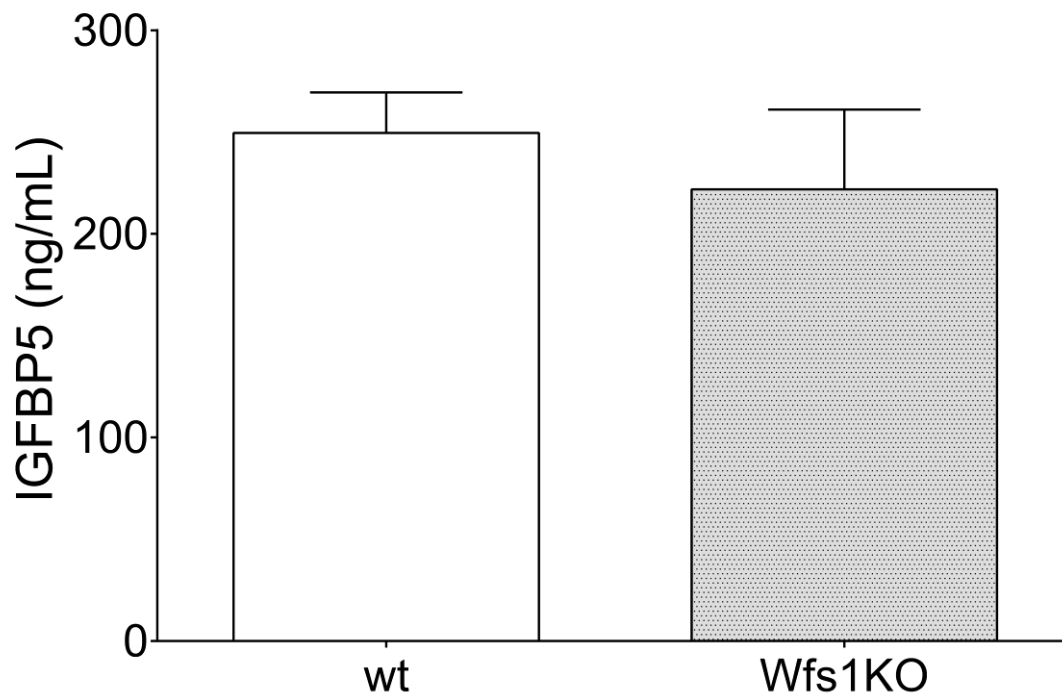
IGFBP3 taseme määramisel vereseerumitest ELISA meetodiga ei olnud märgata olulisi erinevusi *Wfs1*KO ja wt hiirte vahel (joonis 9).



**Joonis 9. IGFBP3 tasemed *Wfs1*-puudulike ja metsiktüüpi hiirte vereseerumis.** Genotüüpide vahel ei ole märgata erinevusi IGFBP3 tasemes. wt – metsiktüüpi hiirte IGFBP3 tase vereseerumites, *Wfs1*KO – *Wfs1*-puudulike hiirte IGFBP3 tase vereseerumites.

### 2.3.5.3 IGFBP5

IGFBP5 tasemes oli *Wfs1*KO hiirtel võrreldes wt hiirtega näha IGFBP5 langevat trendi, kuid muutus ei olnud statistiliselt oluline ( $p > 0,05$ ) (joonis 10).



**Joonis 10. IGFBP5 tasemed *Wfs1*-puudulike ja metsiktüüpi hiirte vereseerumis.** *Wfs1*KO hiirtel on näha IGFBP5 taseme languse trendi, kuid vahe ei ole statistiliselt oluline ( $p > 0,05$ ). wt – metsiktüüpi hiirte IGFBP5 tase vereseerumites, *Wfs1*KO – *Wfs1*-puudulike hiirte IGFBP5 tase vereseerumites.

## 2.4. Arutelu

Antud töös uuriti hiirte kasvuhormooni ja IGF1 signaaliraja geenide, *Igf1r* ja *Akt1*, ekspressiooni erinevates kudedes ning IGF1 ja IGFBP-de tasemete erinevusi vereseerumites *Wfs1*-puudulike ja metsiktüüpi hiirte vahel. Eelnevad uuringud (Köks jt., 2009; Noormets jt., 2010) on näidanud, et *Wfs1*-puudulikud hiired on enda metsiktüüpi pesakonnakaaslastest märkimisväärselt väiksemad, aga nende kasvuhormooni signaalrada on aktiivne ja IGF1 tase kõrgem kui metsiktüüpi pesakonnakaaslastel.

Puuduliku *Wfs1* geeni ekspressiooni kinnituseks kontrolliti *Wfs1* ekspressiooni taset *Hprt1* suhtes maksas, neerudes, südames ja kopsudes. *Wfs1* ekspressioon oli *Wfs1*-puudulikel hiirtel kõikides uuritud kudedes madalam kui metsiktüüpi hiirtes. Neerudes, südames ja kopsudes oli ekspressiooni tase statistiliselt oluline ( $p < 0,05$ ), kuid maksas statistilist erinevust ei esinenud ( $p > 0,05$ ). See võib olla tingitud vähesest loomade arvust grupis, samuti grupisisest varieeruvusest. Edaspidistes uuringutes oleks vaja läbi viia korduskatseid suurema arvu loomadega ning mitmes korduses.

IGF1 retseptor on oluline kasvu soodustavate IGF-ide bioloogiliste mõjude vahendaja (Ullrich jt., 1986), seega uuriti *Wfs1*-puudulikel hiirtel kasvuhormooni ja IGF signaaliraja geenide ekspressiooni taset. *Igf1r* ekspressiooni tase oli *Wfs1*-puudulikel hiirtel maksas ja neerudes mõnevõrra kõrgem kui metsiktüüpi hiirtel, kuid mitte statistiliselt olulisel määral ( $p > 0,05$ ). Südames oli *Igf1r* ekspressioon *Wfs1*-puudulikel hiirtel veidi madalam kui metsiktüüpi hiirtel, kuid samuti mitte statistiliselt olulisel määral ( $p > 0,05$ ). Kopsudes ei esinenud genotüüpide vahel *Igf1r* ekspressioonis olulisi erinevusi. *Akt1* ekspressiooni tase oli *Wfs1*-puudulikel hiirtel maksas ja neerudes mõnevõrra madalam kui metsiktüüpi hiirtel, kuid erinevus ei olnud statistiliselt oluline ( $p > 0,05$ ). Kopsudes oli *Wfs1*-puudulikel hiirtel *Akt1* ekspressioon mõnel määral kõrgem kui metsiktüüpi hiirtel, kuid mitte statistiliselt olulisel määral ( $p > 0,05$ ). Südames ei leitud genotüüpide vahel *Akt1* ekspressiooni tasemes olulisi erinevusi. *Igf1r* ekspressiooni taseme tõusust maksas ja neerudes võib oletada, et nendes kudedes tekib *Wfs1*-puudulikkuse tagajärjel *Igf1r* ekspressiooni ülesregulatsioon, sama võib oletada ka *Akt1* taseme tõusust kopsudes. Vastupidiselt oli maksas ja neerudes *Akt1* ning südames *Igf1r* ekspressioon langenud, millest võib oletada, et nendes kudedes on *Wfs1*-puudulikel hiirtel vastavalt *Akt1* ja *Igf1r* alaekspressioneeritud. Sellisest ekspressioonitasemete varieeruvusest võib oletada, et neid gene ekspresseeritakse kudedes erinevalt. Teisalt võib statistilise erinevuse puudumine viidata sellele, et *Wfs1*-puudulikkusest tulenevad kasvuprobleemid ei ole seotud *Igf1r* ja *Akt1* geenide ekspressiooniga mutantsetes hiirtes, kuid kõiki neid oletusi on vaja

kinnitada, tehes korduskatseid suuremate loomade arvuga ning geeniekspressiooni analüüsi mitmes korduses.

IGF-ide peamiseks funktsiooniks on normaalse kasvu tagamine. IGF-id on reeglina *in vivo* IGFBP-de küljes, mis reguleerivad nende aktiivsust ja kaitsevad lagundamise eest (Tomas jt., 1992; Jones ja Clemmons, 1995). Selle tõttu analüüsiti *Wfs1*-puudulikel hiirtel IGF1 ja IGFBP-de tasemeid vereseerumis. IGF1, IGFBP2, IGFBP3 ja IGFBP5 määramisel vereseerumitest ei esinenud *Wfs1*-puudulike ja metsiktüüpi hiirte vahel statistiliselt olulisi erinevusi. IGF1 tase vereseerumites oli *Wfs1*-puudulikel hiirtel võrreldes metsiktüüpi hiirtega mõnevõrra madalam, kuid mitte statistiliselt olulisel määral ( $p > 0,05$ ). *Wfs1* mutantidel on varem näidatud märkimisväärselt kõrgem IGF1 tase vereplasmas (Kõks jt., 2009), mis on käesoleva uuringuga vastuolus. Samas on näidatud, et IGF1 tase plasma ja seerumi vahel oluliselt ei varieeru (Houghton jt., 2015). Lisaks on näidatud, et IGF1 või IGFBP-de tasemete mõõtmiseks on soovituslik kasutada vereseerumit, sest vereplasma kogumisel võivad antikoagulandid interakteeruda IGF1 ja tema kandjavalikutega ning põhjustada analüüsides ebatäpsusi (Renehan jt., 2003). *Igf1*-puudulikel hiirtel esineb kuni 60%-list kehakaalu vähenemist, mistõttu võib oletada, et *Wfs1*-puudulike hiirte IGF1 madalam hulk viitab sellele, et üheks mutantsete hiirte kasvuprobleemide põhjuseks võib olla *Wfs1*-puudulikkusest põhjustatud vähenenud IGF1 tase. Selle oletuse kinnitamiseks tuleks võimalikult täpsete tulemuste saamiseks edasistes katsetes suurendada uuritavate hiirte ning korduskatsete arvu. On näidatud, et IGFBP-de üleekspressioon põhjustab hiirtes üldjuhul kasvu aeglustumist (Kadaba jt., 1995; Modric jt., 2001; Salih jt., 2004). IGFBP-de alaekspressiooni korral on fenotüübilisi muutusi vähe kirjeldatud, sest puudujääk kompenseeritakse teiste IGFBP-de poolt, mida on ülehulgas (Salih jt., 2004). IGFBP2 puhul on leitud, et *Igfbp2*-puudulikud hiired on normaalse kasvuga, aga neil vähenenud põrna suurus ning suurenenud maks, mis viitab, et IGFBP2 reguleerib kudede ja organite kasvu erinevalt (Wood jt., 2000). IGFBP2 tase oli *Wfs1*-puudulike hiirte vereseerumites madalam kui metsiktüüpi hiirtel, kuid tulemus ei olnud statistiliselt oluline ( $p > 0,05$ ). Nende andmete põhjal võiks edaspidistes katsetes võrrelda ka *Wfs1*-puudulike hiirte organite suuruseid, et välja selgitada, kas *Wfs1*-puudulikkusest tulenev madalam IGFBP2 tase mõjutab kudede ja organite suurust. Sarnaselt IGF1-le ja IGFBP2-le oli ka IGFBP5 tase *Wfs1*-puudulike hiirte vereseerumites madalam kui metsiktüüpi hiirtel, kuid ka sel puhul ei olnud erinevus statistiliselt oluline ( $p > 0,05$ ). Salih jt (2004) on näidanud, et IGFBP5 võib üleekspressiooni korral hakata endaga siduma rohkem IGF-e, mis võivad takistada nende seondumist kudede retseptoritele. Selle põhjal võib järeldada, et IGFBP5 alaekspressioon ei põhjusta hiirtel väiksemat kasvu (Salih jt., 2004).

Antud töös saadud tulemuste statistilise mitteolulisuse põhjal on alust arvata, et *Wfs1*-puudulikkus ei põhjusta hiirtel IGF1 ja analüüsitud IGFBP-de tasemete langust ning sellest tulenevaid kasvuprobleeme. Siiski, oleks selle kinnitamiseks vaja uurida, kas *Wfs1*-puudulikkus põhjustab hiirtel madalamat IGFBP-de taset ning selle fenotüübilist mõju. Seega, oleks vaja korrata ELISA katseid mitmes korduses ja suuremate hiirte arvuga, et välja selgitada, kas IGFBP-de taseme muutus on statistiliselt oluline. IGFBP3 taseme mõõtmisel vereseerumitest ei leitud *Wfs1*-puudulike ja metsiktüüpi hiirte vahel olulisi erinevusi.

Käesolevas töös ei leitud hiirte kasvuhormooni signaalraja uuritud geenide ekspressiooni tasemes *Wfs1*-puudulike ja metsiktüüpi hiirte vahel statistiliselt olulisi muutusi. Kõks jt (2009) on näidanud, et *Wfs1* geeni välja lülitamine stimuleerib kasvuhormooniga seotud geenide komplekti ülesregulatsiooni (Kõks jt, 2009), mistõttu tuleks nii ELISA kui ka geeniekspressiooni katseid korrata mitmes korduses. Sellele viitab ka asjaolu, et maksas ei ole *Wfs1* ekspressiooni taseme langus *Wfs1*-puudulikes hiirtes võrreldes metsiktüüpi hiirtega statistiliselt oluline ( $p > 0,05$ ). Samuti ei leitud selles töös tehtud katsetega, et IGF1 või testitud IGFBP-de tase oleks *Wfs1*-puudulike ja metsiktüüpi hiirte vahel oluliselt erinev. Geeniekspressiooni ja ELISA analüüside tulemuste statistiline mitteolulisus *Wfs1*-puudulike ja metsiktüüpi hiirte vahel viitab asjaolule, et *Wfs1*-puudulikkus ei mõjuta käesolevas töös uuritud geenide ekspressiooni ning IGF1 ja IGFBP2, -3 ja -5 taset. Samas näitavad tulemused, et vähemalt osades kudedes on mõnel määral geeniekspressiooni tasemes toimunud muutused. Samuti on *Wfs1*-puudulikes hiirtes näha IGF1, IGFBP2 ja IGFBP5 tasemete languse trendi, võrreldes metsiktüüpi hiirtega. Seetõttu tasuks edaspidistes katsetes mõõtmisi korrata, kaasates rohkem katseloomi ning kasutades erinevaid lahjendusi.

## KOKKUVÕTE

Wolframi sündroom, mida kirjeldati esmakordselt aastal 1938, on haruldane autosomaalne retsessiivne haigus, mille põhilisteks sümptomiteks on varajane suhkurtõbi, nägemisnärv atroofia, magediabeet, kurtus ning erinevad neurodegeneratiivsed ja psühhiaatrilised häired. Wolframi sündroom tekib inimesel 4. kromosoomi p16 piirkonnas asuva *WFS1* (volframiini) geeni mutatsioonide tagajärjel. *WFS1* geeni produktiks on valk volframiin (WFS1), mida leidub nii inimesel kui hiirel peamiselt ajus, südames, kopsudes, pankrease  $\beta$ -rakkudes ning vähem maksas ja neerudes. WFS1 valgu täpne funktsioon ei ole praeguse hetkeni teada. Ajus on WFS1 peamiselt lokaliseerunud struktuuridesse, mis reguleerivad emotsionaalset käitumist. Rakkudes lokaliseerub WFS1 eelkõige endoplasmaatilises retiikulumis (ER) ning selle tõttu arvatavasti osaleb membraantranspordis, valkude protsessimisel ja ER-i  $\text{Ca}^{2+}$  homöostaasi reguleerimisel. ER-i  $\text{Ca}^{2+}$  homöostaasi häirumine võib esile kutsuda ER stressi ja rakkude apoptoosi. WFS1 reguleerib negatiivse tagasiside kaudu ER stressi vastust, mistõttu WFS1 funktsiooni häirivad mutatsioonid võivad põhjustada neuronite või pankrease  $\beta$ -rakkude apoptoosi, mis on iseloomulik Wolframi sündroomile.

Tartu Ülikoolis on valmistatud *Wfs1*-puudulikkusega hiir, mille abil on võimalik uurida puuduliku WFS1 valgu mõju hiire anatoomiale, füsioloogiale, arengule ja käitumisele. *Wfs1*-puudulike hiirte puhul on näidatud nende märkimisväärselt väiksem kasv võrreldes nende metsiktüüpi pesakonnakaaslastega, kuid nende kasvuhormooni ja insuliinisarnase kasvufaktor 1 (IGF1) tase on kõrge. Selle tõttu uuriti kasvuhormooni ja IGF1 signaaliraja geenide, *Igf1r* ja *Akt1*, ekspressiooni ning IGF1 ja IGFBP2, -3 ja 5 tasemete erinevusi vereseerumites eesmärgiga välja selgitada, kas probleem võib olla kasvuhormooni või IGF1 signaalirajas.

*Wfs1* geeni välja lülitamise kontrollimiseks uuriti *Wfs1* ekspressiooni taset erinevates kudedes. *Wfs1* oli oluliselt alaekspresseerunud kõikides kudedes peale maksa, millest tulenevalt on vajalik korduskatsete tegemine suurema arvu katseloomadega.

*Igf1r* ekspressioonis ei leitud olulisi erinevusi *Wfs1*-puudulike ja metsiktüüpi hiirte vahel, kuigi maksas ja neerudes oli *Wfs1*-puudulikel hiirtel ekspressiooni tase mõnevõrra kõrgem ja südames madalam. *Akt1* ekspressioonitasemes ei leitud samuti olulisi erinevusi, kuid maksas ja neerudes oli *Akt1* ekspressioon mutantsetel hiirtel mõnel määral madalam ja kopsudes kõrgem. Nende tulemuste põhjal võib oletada, et *Wfs1*-puudulikkus mõjutab spetsiifilistes kudedes *Igf1r* ja *Akt1* ekspressiooni erineval moel, kuid nende oletuste kinnitamiseks on vaja teha mitmes korduses geeniekspressiooni lisakatseid suurema katseloomade arvuga, et

elimineerida võimalik statistiline mõõtmisviga. *Igf1r* puhul kopsudes ja *Akt1* puhul südames ei leitud geeniekspressiooni tasemes olulisi muutusi.

IGF1 ja IGFBP-de tasemete määramisel vereseerumitest leiti, et *Wfs1*-puudulike ja metsiktüüpi hiirte vahel ei esinenud olulisi erinevusi. Siiski oli IGF1, IGFBP2 ja IGFBP5 tase *Wfs1*-puudulikel hiirtel madalam kui metsiktüüpi hiirtel. *Igf1* geeni välja lülitamine põhjustab hiirtel väiksemat kasvu, mistõttu võib oletada, et madalam IGF1 hulk *Wfs1*-puudulikel hiirtel võib teatud määral olla väiksema kasvu põhjuseks, samas on see vastuolus varasemate tulemustega. IGFBP2 tase oli madalam *Wfs1*-puudulikel hiirtel, kuid kirjanduse põhjal ei põhjusta IGFBP2 alaekspressioon hiirte väiksemat kasvu, vaid ta reguleerib spetsiifiliselt kudede ja organite kasvu. Kirjanduse andmetel põhjustab hoopis IGFBP5 valgu üleekspressioon hiirte väiksemat kasvu. Seetõttu oleks oluline uurida kas *Wfs1*-puudulikkus põhjustab IGF1, IGFBP2 ja IGFBP5 tasemete muutust, tehes selleks korduskatseid suurema hiirte arvuga, määrata valkude taset nii seerumist kui plasmast ning kasutades ka teisi meetodeid, näiteks *Western blot* analüüsi või immuunohistokeemiat. IGFBP3 mõõtmisel ei leitud *Wfs1*-puudulike ja metsiktüüpi hiirte vahel olulisi muutusi.

Kokkuvõtvalt võib öelda, et *Wfs1*-puudulike hiirte uuritud geenide ekspressioonis ega IGF1 ja tema kandjavalgude tasemes antud töös olulisi erinevusi ei leitud, mis võisid tuleneda liiga vähestest katsete kordusest või liiga väikesest katseloomade hulgast. Tehtud analüüside tulemused annavad alust arvata, et *Wfs1*-puudulike hiirte kasvuprobleemid ei ole põhjustatud uuritud geenide ekspressiooni ega valkude tasemete muutustest. Samas on saadud tulemused heaks aluseks põhjalikumale uuringule läbiviimiseks, selgitamaks välja miks *Wfs1*-puudulikud hiired on oma metsiktüüpi pesakonnakaaslastest väiksemad.

## IGF1 signalling pathway in *Wfs1*-deficient mice

Erkki Kull

### SUMMARY

Wolfram syndrome, which was first described in 1938, is a rare autosomal recessive disease. The disease is primarily characterized by diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy and deafness in addition to various neurodegenerative and psychiatric disorders. In humans, Wolfram syndrome is caused by the mutations in the *WFS1* gene. The Wolfram syndrome (*WFS1*) gene encodes wolframin (WFS1), which is a transmembrane endoplasmic reticulum (ER) glycoprotein. In humans and mice WFS1 is mainly expressed in heart, lungs, pancreatic  $\beta$ -cells and at lower level in liver and kidneys. The exact function of the protein is not known. In the brain, WFS1 is primarily expressed in structures that regulate emotional behaviour. In cells, WFS1 is localized in the ER and its function is probably to regulate membrane transport, protein processing and  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis. Disruption of normal  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis in ER can induce ER stress and cellular apoptosis. WFS1 regulates ER stress response by negative feedback. Because of that, mutations that disturb WFS1 function can cause apoptosis of neurons and pancreatic  $\beta$ -cells, which is characteristic for Wolfram syndrome.

The *Wfs1*-deficient mouse model has been created in University of Tartu that can be used to study the anatomical, physiological, developmental and behavioural effect caused by the dysfunction of WFS1 protein. *Wfs1*-deficient mice have been shown to be significantly smaller than their wild-type littermates, whereas their growth hormone and IGF1 levels are high. To find out if the problems with growth retardation are triggered by the growth hormone or IGF1 signalling pathway, the expression of insulin-like growth factor (IGF1) pathway genes *Igf1r* and *Akt1* were analyzed. In addition, IGF1 and insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP) levels were measured from serum.

To confirm the deficiency of the *Wfs1* gene, *Wfs1* expression levels were estimated in various tissues. *Wfs1* was significantly underexpressed in all analyzed tissues, except in the liver. Due to this, additional experiments with a larger group of animals are required.

The expression of *Igf1r* did not show statistically significant differences between *Wfs1*-deficient and wild-type mice. *Wfs1*-deficient mice showed lower expression of *Igf1r* in the liver and kidneys and higher expression in the heart. Expression of *Akt1* did also not show any remarkable differences, although mutant mice showed lower expression of *Akt1* in the liver

and kidneys and higher expression in the lungs. Based on these results *Wfs1*-deficiency may cause different expression levels of *Igf1r* and *Akt1* in specific tissues, but these assumptions need to be confirmed by additional gene expression experiments with a larger group of animals in order to eliminate a possible statistical error. *Igf1r* expression in the lungs and *Akt1* expression in the heart did not indicate any differences in gene expression levels.

IGF1 and IGFBP levels in serum did not show any significant differences between *Wfs1*-deficient and wild-type mice. IGF1, IGFBP2 and IGFBP5 levels were lower for *Wfs1*-deficient mice, but not statistically significant. Lack of the *Igf1* gene causes growth retardation in mice, which indicates that lower levels of IGF1 may cause smaller growth in *Wfs1*-deficient mice. IGFBP2 underexpression does not cause growth retardation but it has been shown to regulate specific tissue and organ growth. Levels of IGFBP5 were lower for *Wfs1*-deficient mice but previous studies show that growth retardation is caused by overexpression of this protein. Therefore it would be important to investigate if *Wfs1*-deficiency causes decreased levels of IGF1 and IGFBP5 by repeating experiments with a larger group of animals, determining protein levels from serum and plasma and with other experiments such as Western blot or immunohistochemistry. IGFBP3 levels did not show any differences between *Wfs1*-deficient and wild type mice.

To sum up, *Wfs1*-deficient mice did not show significant differences in gene expression or protein levels, which may have been caused by too small number of repeated experiments or animals. The results of this work suggest that growth retardation problems of *Wfs1*-deficient mice are not caused by changes of the investigated gene expression or protein levels. Nevertheless, these results provide good grounds for a more thorough study to analyze why *Wfs1*-deficient mice are smaller than their wild-type littermates.

## **TÄNUAVALDUSED**

Sooviksin avaldada tänu oma juhendajale Marilin Ivaskile, kelle kasulikud nõuanded ja soovitused olid suureks abiks käesoleva töö valmimisele. Samuti tahaksin tänada oma juhendajat professor Margus Poogat, kelle asjakohaste näpunäidete abil sai see töö viimase lihvi. Tänan ka professor Sulev Kõksi, kes andis soovitusi töö parandamiseks.

## KASUTATUD KIRJANDUS

- Bajpai, A. and Menon, P.S. (2006). Insulin like growth factors axis and growth disorders. *Indian Journal of Pediatrics*, 73(1): 67-71.
- Baker, J., Liu, J.P., Perkins, A.S., Robertson, E.J. and Efstratiadis, A. (1993). Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell*, 75: 73–82.
- 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.
- Bilezikjian, L. M. and Vale, W. W. (1983). Stimulation of adenosine 3', 5'-monophosphate production by growth hormone-releasing factor and its inhibition by somatostatin in anterior pituitary cells in vitro. *Endocrinology*, 113(5): 1726-1731.
- Butt, A. J., Dickson, K. A., McDougall, F. and Baxter, R. C. (2003). Insulin-like growth factor-binding protein-5 inhibits the growth of human breast cancer cells in vitro and in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 278(32): 29676-29685.
- Carter-Su, C., Schwartz, J. and Argetsinger, L. S. (2016). Growth hormone signaling pathways. *Growth Hormone & IGF Research*, 28: 11-15.
- Carvalho, P. (1997). Molecular bases of growth hormone deficiency. *Brazilian Journal of Genetics*, 20(3).
- Cho, H., Thorvaldsen, J. L., Chu, Q., Feng, F. and Birnbaum, M. J. (2001). Akt1/PKB $\alpha$  is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *Journal of Biological Chemistry*, 276(42): 38349-38352.
- Cianfarani, S., Geremia, C., Puglianiello, A., Maiorana, A. and Germani, D. (2007). Late effects of disturbed IGF signaling in congenital diseases, p. 16-27. In *Congenital Endocrinopathies*, Vol. 11. Karger Publishers.
- Collier, D. A., Barrett, T. G., Curtis, D., Macleod, A., Arranz, M. J., Maassen, J. A. and Bunday, S. (1996). Linkage of Wolfram syndrome to chromosome 4p16. 1 and evidence for heterogeneity. *American journal of human genetics*, 59(4): 855.

- De Meyts, P. and Whittaker, J. (2002). Structural biology of insulin and IGF1 receptors: implications for drug design. *Nature Reviews Drug Discovery*, 1(10): 769-783.
- Dupont, J. and LeRoith, D. (2001). Insulin and insulin-like growth factor I receptors: similarities and differences in signal transduction. *Hormone Research in Paediatrics*, 55(Suppl. 2): 22-26.
- Fonseca, S. G., Ishigaki, S., Osowski, C. M., ... Urano, F. (2010). Wolfram syndrome 1 gene negatively regulates ER stress signaling in rodent and human cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(3): 744-755.
- Fraser F. C. and Gunn T. (1977). Diabetes mellitus, diabetes insipidus, and optic atrophy. An autosomal recessive syndrome? *Journal of Medical Genetics*, 14: 190-193.
- Harrela, M., Koistinen, H., Kaprio, J. ... Seppälä, M. (1996). Genetic and environmental components of interindividual variation in circulating levels of IGF-I, IGF-II, IGFBP-1, and IGFBP-3. *Journal of Clinical Investigation*, 98(11): 2612.
- 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. *Human Molecular Genetics*, 12(16).
- Houghton, L. C., Pollak, M. N., Tao, Y., Tu, Y. G., Black, A., Bradwin, G., Hoover, R. N. and Troisi, R. (2015). Similarity of Serum and Plasma Insulin-like Growth Factor Concentrations. *Biomarkers In Cancer*, 7: 13.
- Hwa, V., Oh, Y. and Rosenfeld, R. G. (1999). The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily 1. *Endocrine Reviews*, 20(6): 761-787.
- Jones, J. I. and Clemmons, D.R. (1995). Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocrine reviews*, 16(1): 3-34.
- 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.
- Kulkarni, R. N., Holzenberger, M., Shih, D. Q., Ozcan, U., Stoffel, M., Magnuson, M. A. and Kahn, C. R. (2002).  $\beta$ -cell-specific deletion of the IGF1 receptor leads to hyperinsulinemia and glucose intolerance but does not alter  $\beta$ -cell mass. *Nature Genetics*, 31(1): 111-115.

- Kõks, S., Soomets, U., Paya-Cano, J. L., ... Schalkwyk, L. C. (2009). *Wfs1* gene deletion causes growth retardation in mice and interferes with the growth hormone pathway. *Physiological Genomics*, 37(3): 249-259.
- Kõks, S., Soomets, U., Plaas, M., Terasmaa, A., Noormets, K., Tillmann, V., Vasar, E., Fernandes, F. and Schalkwyk, L. C. (2011). Hypothalamic gene expression profile indicates a reduction in G-protein signalling in the *Wfs1* mutant mice. *Physiological genomics*, 43: 1351-1358.
- Labrie, F., Gagné, B. and Lefèvre, G. (1983). Growth hormone-releasing factor stimulates adenylate cyclase activity in the anterior pituitary gland. *Life Sciences*, 33(22): 2229-2233.
- Leu, J. I., Crissey, M. A. S. and Taub, R. (2003). Massive hepatic apoptosis associated with TGF- $\beta$ 1 activation after Fas ligand treatment of IGF binding protein-1-deficient mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 111(1): 129-139.
- Li, Y., Xiang, J. and Duan, C. (2005). Insulin-like growth factor-binding protein-3 plays an important role in regulating pharyngeal skeleton and inner ear formation and differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 280(5): 3613-3620.
- Liu, J.P., Baker, J., Robertson, E.J. and Efstratiadis, A. (1993). Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and type-1 IGF receptor (IGF1R). *Cell*, 75: 59-72
- Luuk, H., Kõks, S., Plaas, M., Hannibal, J., Rehfeld, J. F. and Vasar, E. (2008). Distribution of *Wfs1* protein in the central nervous system of the mouse and its relation to clinical symptoms of the Wolfram syndrome. *Journal of Comparative Neurology*, 509(6): 642-660.
- Luuk, H., Plaas, M., Raud, S., Innos, J., Sütt, S., Lasner, H., Abramov, U., Kurrikoff, K., Kõks, S. and Vasar, E. (2009). *Wfs1*-deficient mice display impaired behavioural adaptation in stressful environment. *Behavioural Brain Research*, 198(2): 334-345.
- Maleki, N., Bashardoust, B., Zakeri, A., Salehifar, A. and Tavosi, Z. (2015). Diabetes mellitus, diabetes insipidus, optic atrophy, and deafness: A case of Wolfram (DIDMOAD) syndrome. *Journal of Current Ophthalmology*, 27(3): 132-135.
- Martin, J. B. and Millard, W. J. (1986). Brain regulation of growth hormone secretion. *Journal of Animal Science*, 63(Supplement\_2): 11-26.

- Mason, J. L., Xuan, S., Dragatsis, I., Efstratiadis, A. and Goldman, J. E. (2003). Insulin-like growth factor (IGF) signaling through type 1 IGF receptor plays an important role in remyelination. *Journal of Neuroscience*, 23(20): 7710-7718.
- Mathews, L. S., Hammer, R. E., Behringer, R. R., Dercole, A. J., Bell, G. I., Brinster, R. L. and Palmiter, R. D. (1988). Growth enhancement of transgenic mice expressing human insulin-like growth factors-I. *Endocrinology*, 123: 2827–2833.
- Modric, T., Silha, J. V., Shi, Z., Gui, Y., Suwanichkul, A., Durham, S. K., Powell, D. R. and Murphy, L. J. (2001). Phenotypic Manifestations of Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-3 Overexpression in Transgenic Mice. *Endocrinology*, 142(5): 1958-1967.
- Nissley, P. and Lopaczynski, W. (1991). Insulin-like growth factor receptors. *Growth Factors*, 5: 29–43
- Noormets, K., Koks, S., Muldmaa, M., Muring, L., Vasar, E. and Tillmann, V. (2011). Sex differences in the development of diabetes in mice with deleted wolframin (Wfs1) gene. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 119(05): 271-275.
- Osman, A. A., Saito, M., Makepeace, C., Permutt, M. A., Schlesinger, P. and Mueckler, M. (2003). Wolframin expression induces novel ion channel activity in endoplasmic reticulum membranes and increases intracellular calcium. *Journal of Biological Chemistry*, 278(52): 52755-52762.
- Philbrook, C., Fritz, E., and Weiher, H. (2005). Expressional and functional studies of Wolframin, the gene function deficient in Wolfram syndrome, in mice and patient cells. *Experimental Gerontology*, 40(8): 671-678.
- Rajkumar, K., Barron, D., Lewitt, M. S. and Murphy, L. J. (1995). Growth retardation and hyperglycemia in insulin-like growth factor binding protein-1 transgenic mice. *Endocrinology*, 136(9): 4029-4034.
- Raud, S., Sütt, S., Luuk, H., Plaas, M., Innos, J., Kõks, S. and Vasar, E. (2009). Relation between increased anxiety and reduced expression of alpha1 and alpha2 subunits of GABA A receptors in Wfs1-deficient mice. *Neuroscience Letters*, 460(2): 138-142.
- Renahan, A. G., Jones, J., T O'Dwyer, S. and Shalet, S. M. (2003). Determination of IGF-I, IGF-II, IGFBP-2, and IGFBP-3 levels in serum and plasma: comparisons using the Bland–Altman method. *Growth hormone & IGF research*, 13(6): 341-346.

- 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.
- Rigoli, L., Lombardo, F. and Di Bella, C. (2011). Wolfram syndrome and WFS1 gene. *Clinical Genetics*, 79(2): 103-117.
- Roelfsema, V. and Clark, R. G. (2001). The growth hormone and insulin-like growth factor axis: its manipulation for the benefit of growth disorders in renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology*, 12(6): 1297-1306.
- Salih, D. A., Tripathi, G., Holding, C., Szeszak, T. A., Gonzalez, M. I., Carter, E. J., Cobb, L. J., Eisemann, J. E. and Pell, J. M. (2004). Insulin-like growth factor-binding protein 5 (Igfbp5) compromises survival, growth, muscle development, and fertility in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(12): 4314-4319.
- Scanga, S. E., Ruel, L., Binari, R. C., Snow, B., Stambolic, V., Bouchard, D., Peters, M., Calvieri, B., Mak, T. W., Woodgett, J. R. and Manoukian, A. S. (2000). The conserved PI3 [variant prime] K/PTEN/Akt signaling pathway regulates both cell size and survival in *Drosophila*. *Oncogene*, 19(35): 3971.
- Schröder, M. and Kaufman, R. J. (2005). The mammalian unfolded protein response. *Annual Review of Biochemistry*, 74: 739-789.
- Spagnoli, A. and Rosenfeld, R. G. (1996). The mechanisms by which growth hormone brings about growth: The relative contributions of growth hormone and insulin-like growth factors. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 25(3): 615-631.
- 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. *Human Molecular Genetics*, 7(13): 2021-2028.
- Swift, M. and Swift, R. G. (2000). Psychiatric disorders and mutations at the Wolfram syndrome locus. *Biological Psychiatry*, 47(9): 787-793.
- Swift, R. G., Sadler, D. B. and Swift, M. (1990). Psychiatric findings in Wolfram syndrome homozygotes. *Lancet*, 336(8716): 667-669.

- Takeda K., Inoue H., Tanizawa Y., Matsuzaki Y., Oba J., Watanabe Y., Shinoda K. and Oka Y. (2001) WFS1 (Wolfram syndrome 1) gene product: predominant subcellular localization to endoplasmic reticulum in cultured cells and neuronal expression in rat brain. *Human Molecular Genetics*, 10: 477-84.
- Tomas, F. M., Knowles, S. E., Owens, P. C., Chandler, C. S., Francis, G. L., Read, L. C. and Ballard, F. J. (1992). Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and especially IGF-I variants are anabolic in dexamethasone-treated rats. *Biochemical Journal*, 282(1): 91-97.
- Ullrich, A., Gray, A., Tam, A. W., Yang-Feng, T., Tsubokawa, M., Collins, C. and Chen, E. (1986). Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *The EMBO Journal*, 5(10): 2503–2512.
- Wang, J., Niu, W., Witte, D. P., Chernausk, S. D., Nikiforov, Y. E., Clemens, T. L., Sharifi, B., Strauch, A. R. and Fagin, J. A. (1998). Overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-4 (IGFBP-4) in smooth muscle cells of transgenic mice through a smooth muscle  $\alpha$ -actin-IGFBP-4 fusion gene induces smooth muscle hypoplasia. *Endocrinology*, 139(5): 2605-2614.
- Wang, J., Zhou, J., Powell-Braxton, L. and Bondy, C. (1999). Effects of Igf1 gene deletion on postnatal growth patterns. *Endocrinology*, 140(7): 3391-3394.
- Weinkove, D., Neufeld, T. P., Twardzik, T., Waterfield, M. D. and Leever, S. J. (1999). Regulation of imaginal disc cell size, cell number and organ size by *Drosophila* class I A phosphoinositide 3-kinase and its adaptor. *Current Biology*, 9(18): 1019-1029.
- Wetterau, L. A., Moore, M. G., Lee, K. W., Shim, M. L. and Cohen, P. (1999). Novel aspects of the insulin-like growth factor binding proteins. *Molecular Genetics and Metabolism*, 68(2): 161-181.
- Wood, T. L., Rogler, L. E., Czick, M. E., Schuller, A. G. and Pintar, J. E. (2000). Selective alterations in organ sizes in mice with a targeted disruption of the insulin-like growth factor binding protein-2 gene. *Molecular Endocrinology*, 14(9): 1472-1482.
- Yakar, S., Rosen, C. J., Beamer, W. G. ... LeRoith, D. (2002). Circulating levels of IGF-1 directly regulate bone growth and density. *The Journal of Clinical Investigation*, 110(6): 771–781.

Yamada, Y., Post, S. R., Wang, K., Tager, H. S., Bell, G. I. and Seino, S. (1992). Cloning and functional characterization of a family of human and mouse somatostatin receptors expressed in brain, gastrointestinal tract, and kidney. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(1): 251-255.

# LIHTLITSENTS

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

Mina, Erkki Kull (sünnikuupäev: 31.03.1992)

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

IGF1 signaaliraja uurimine *Wfs1*-puudulikkusega hiirtel,

mille juhendajad on Margus Pooga ja Marilin Ivask.

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **01.01.2020** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.2017