

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

ja

MEDITSIINITEADUSTE VALDKOND  
BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT  
FÜSIOLOOGIA OSAKOND

***Wfs1*-puuduliku roti suhkurdiabeedi fenotüübi kirjeldamine**

Magistritöö

40 EAP

Tuuliki Koppel

Juhendajad prof Eero Vasar

PhD Mario Plaas

MSc Maarja Toots

MSc Martin Kärner

TARTU 2017

## INFOLEHT

### ***Wfs1*-puuduliku roti suhkurdiabeedi fenotüübi kirjeldamine**

Wolframi sündroom (WS) on autosomaalne retsessiivne neurodegeneratiivne haigus, mida põhjustavad mutatsioonid *WFS1* geenis. Sündroomi põhisümptomid on magediabeet, suhkurdiabeet, nägemisnärv atroofia ja sensorineuraalne kurtus. Et uurida WS-i ja võimalikke WS-i vastaseid raviteraapiaid, on praegu disainitud eri laborites kolm *Wfs1*-puudulikku hiiremudelit. Asjaolu, et nimetatud hiirtel pole seni selgelt näidatud suhkurdiabeedi kujunemist, ajendas Tartu Ülikooli teadlasi konstrueerima *Wfs1*-mutantse roti. Käesolevas töös uuriti *Wfs1*-mutantsel *Wfs1*-ex5-KO232 rotil suhkurdiabeedi fenotüüpi ja selle tekkepõhjuseid. Leiti, et *Wfs1*-puuduliku roti pankrease beeta-rakkudes on tõusnud ER-i stressitase, mistõttu beeta-rakud hävivad ja 11. elukuul tekib insuliinist sõltuv suhkurdiabeet. Seega võib *Wfs1*-puudulik rott olla uus mudel suhkurdiabeedi ja võimalike WS-i vastaste ravimite uurimiseks.

**Märksõnad:** *Wfs1*-puudulikkusega rott, Wolframi sündroom, *Wfs1*, wolframiin 1, *diabetes mellitus*

**CERCS kood:** B470 Füsioloogia

### **The diabetic phenotype of *Wfs1*-deficient rat**

Wolfram syndrome (WS) is a rare autosomal recessive neurodegenerative disorder caused by mutations in the *WFS1* gene. The common manifestations of WS are *diabetes insipidus*, *diabetes mellitus*, optic atrophy and deafness. To study WS and develop potential therapeutic approaches against WS, three *Wfs1*-deficient mouse models have been designed in different laboratories. However, to the best of our knowledge, none of those *Wfs1*-mutant mice show signs of fasting hyperglycemia and development of *diabetes mellitus*. Therefore, the scientists of University of Tartu constructed a *Wfs1*-deficient rat. In the current thesis, we studied the diabetic phenotype of *Wfs1*-mutant rat (*Wfs1*-ex5-KO232) and found that *Wfs1*-mutant rat develops insulin-dependent *diabetes mellitus* and mimics human pathology of WS. Thus, *Wfs1*-ex5-KO232 rat is a valuable new model to study potential treatments for WS.

**Keywords:** *Wfs1*-deficient rat, Wolfram syndrome, *Wfs1*, wolframin, *diabetes mellitus*

**CERCS code:** B470 Physiology

## **SISUKORD**

<b>KASUTATUD LÜHENDID</b>	<b>5</b>
<b>SISSEJUHATUS</b>	<b>7</b>
<b>1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE</b>	<b>8</b>
1.1 Wolframi sündroom	8
1.2 Wolframiin 1 geen ja valk	9
1.2.1 WFS1 funktsioonid	10
1.2.2 WFS1 roll glükoosi homöostaasi säilitamises	11
1.3 Transgeensed wolframiin 1 mutantsed loomudelid	14
1.3.1 Wfs1-puudulikkusega hiiremodelid	14
1.3.2 Wfs1-puudulikkusega rotimudel	15
<b>2. EKSPERIMENTAALOSA</b>	<b>16</b>
2.1 Töö eesmärk	16
2.2 Materjal ja meetodika	16
2.2.1 Katseloomad	16
2.2.2 Intraperitoneaalne glükoositolerantsi test	16
2.2.3 Insuliinitaseme määramine	17
2.2.4 Insuliinitolerantsi test	17
2.2.5 Uriinianalüüs	17
2.2.6 Langerhansi saarekeste eraldamine	17
2.2.7 RNA eraldamine	18
2.2.8 cDNA süntees	18
2.2.9 Kvantitatiivne reaalkaaja- polümeraasi ahelreaktsioon	18
2.2.10 Polümeraasi ahelreaktsioon	19
2.2.11 Statistika	19
2.3 Tulemused	20
2.3.1 Kehakaal	20
2.3.2 Veresuhkru baastase	20
2.3.3 Vereseerumi insuliini baastase	21
2.3.4 Uriini glükoositase	22
2.3.5 Glükoositundlikkus	22
2.3.6 Glükoosi stimuleeritud insuliini sekretsioon	22
2.3.7 Insuliinitundlikkus	24
2.3.8 Langerhansi saarekeste geeniekspressioon	24
2.4 Arutelu	27
<b>KOKKUVÕTE</b>	<b>31</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>32</b>
<b>TÄNUSÕNAD</b>	<b>35</b>
<b>KASUTATUD KIRJANDUS</b>	<b>36</b>
<b>KASUTATUD VEEBILEHED</b>	<b>43</b>

**LISAD**

**44**

**LIHTLITSENTS**

**47**

## KASUTATUD LÜHENDID

5-HT	5-hüdroksütrüptamiin; <i>5-hydroxytryptamine</i>
ANOVA	dispersioonanalüüs; <i>analysis of variance</i>
ATF6-alfa	aktiveeriv transkriptsioonifaktor 6 alfa; <i>activating transcription factor 6 alpha</i>
BSA	veise seerumi albumiin; <i>bovine serum albumin</i>
cAMP	tsükliline adenosiinmonofosfaat; <i>cyclic adenosine monophosphate</i>
D	kurtus; <i>deafness</i>
DIDMOAD	magediabeet, suhkurdiabeet, nägemisnärv atroofia, sensorineuraalne kurtus; <i>diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy, sensorineural deafness</i>
DI	magediabeet; <i>diabetes insipidus</i>
DM	suhkurdiabeet; <i>diabetes mellitus</i>
DTT	ditiotreitol; <i>dithiothreitol</i>
Epac	cAMP aktiveeritud vahetusvalk; <i>exchange protein activated by cAMP</i>
ER	endoplasmaatiline retiikulum; <i>endoplasmic reticulum</i>
GABAA	gamma-aminovõihappe A; <i>gamma-aminobutyric acid A receptor</i>
GLP-1	glükagoonitaoline valk 1; <i>glucagon like peptide 1</i>
GLUT 1/2	glükoosi transporter 1/2; <i>glucose transporter 1/2</i>
HBSS	Hanki tasakaalustatud soolalahus; <i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HPRT1	hüpoksantiini fosforibosüül-transferaas 1; <i>hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i>
HSPA5	kuumašoki valkude perekonna A (Hsp70) liige 5; <i>heat shock protein family A (Hsp70) member 5</i>
i.p.	Intraperitoneaalne; <i>intraperitoneal</i>
IP3	inositool-1,4,5-trisfosfaat; <i>inositol trisphosphate</i>
IP3R	inositool-1,4,5-trisfosfaadi retseptor; <i>inositol trisphosphate receptor</i>
IPGTT	intraperitoneaalne glükoosi tolerantsi test
ITT	insuliini tolerantsi test
K+ ATP	ATP-tundlik kaaliumikanal; <i>ATP-sensitive potassium channel</i>
KO	<i>knock-out</i>
Kv	pingetundlik kaaliumikanal; <i>voltage-gated potassium channel</i>
MQ	Milli-Q vesi

NLS-LacZ	tuuma lokalisatsiooni signaal beeta-galaktosidaas; <i>nuclear location signal beta-galactosidase</i>
OA	nägemisnärv atroofia; <i>optic atrophy</i>
PCR	polümeraasi ahelreaktsioon; <i>polymerase chain reaction</i>
PI3K	fosfatidüülinositol-4,5-bisfosfaat 3-kinaas; <i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase</i>
PKA	valgu kinaas A; <i>protein kinase A</i>
ROS	reaktiivne hapnikuühend; <i>reactive oxygen species</i>
qRT-PCR	kvantitatiivne reaalaaja polümeraasi ahelreaktsioon; <i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i>
RyR	rüanodiini retseptor; <i>ryanodine receptor</i>
s.c.	subkutaanne; <i>subcutaneous</i>
SEM	standardviga; <i>standard error of measurement</i>
SERCA	sarko/endoplasmaatilise retiikulumi Ca <sup>2+</sup> -ATPaas
SERT	serotoniini transporter; <i>serotonin transporter</i>
SLC2A2	<i>solute carrier family 2 member 2</i>
SYVN1	sünovioliin 1; <i>synoviolin 1</i>
ZFN	tsink- sõrmede tehnoloogia; <i>zinc finger nuclease</i>
UPR	voltumata valkude vastus; <i>unfolded protein response</i>
VDCC	pingetundlik kaltsiumikanal; <i>voltage-dependent calcium channel</i>
WFS1	wolframiin 1 geen inimesel
<i>Wfs1</i>	wolframiin 1 geen inimesest erineval liigil
WFS1	wolframiin 1 valk inimesel ja inimesest erineval liigil
WS	Wolframi sündroom; <i>Wolfram syndrome</i>
WT	metsiktüüp; <i>wild type</i>
XBP1	X-box-iga seonduv valk 1; <i>X-box binding protein 1</i>
XBP1 S	splaissitud X-box-iga seonduv valk 1

## SISSEJUHATUS

Wolframi sündroom (WS/DIDMOAD) on autosomaalne retsessiivne neurodegeneratiivne haigus, mida põhjustavad mutatsioonid wolframiin 1 valku kodeerivas *WFS1* geenis. Sündroomi põhisümptomid on magediabeet, suhkurdiabeet, nägemisnärv atroofia ja sensorineuraalne kurtus (Wolfram ja Wagener, 1938; Swift jt., 1990). Lisaks esineb umbes 60%-l WS-i patsientidest (homosügootsed mutatsioonikandjad) psühhiaatrilisi häireid, nagu depressioon, psühhos ja agressiivsus (Swift jt., 1990). Võrreldes tervete indiviididega, on heterosügootsetel *WFS1* mutatsiooni kandjatel 26 korda suurem tõenäosus psühhiaatriliste häirete tekkimiseks (Kesner jt., 2009; Swift ja Swift, 2000).

WS-ga kaasnevate patoloogiate, *WFS1* geeni funktsiooni ja potentsiaalsete WS-i vastaste ravimite uurimiseks on praeguseks eri laborites disainitud kolm transgeenset *Wfs1*-puudulikkusega hiiremudelit (Ishihara jt., 2004; Riggs jt., 2005; Luuk jt., 2009). Võrreldes metsiktüüpi pesakaaslastega, esinevad neil mutantsetel hiirtel häired glükoosi stimuleeritud insuliini sekretsioonis, kõrgem beeta-rakkude apoptoosimäär, progresseeruv glükoositalumatus ning madalam insuliinitase (Ishihara jt., 2004; Riggs jt., 2005; Luuk jt., 2009; Noormets jt., 2011; Terasmaa jt., 2011). Samas pole seni selgelt näidatud, et *Wfs1*-puudulikkus põhjustaks neil hiirtel humaanmeditsiinis WS-i diagnoosimiseks kasutatava sümptomi, suhkurdiabeedi olemasolu. See ajendas Tartu Ülikooli teadlasi konstrueerima *Wfs1*-puudulikkusega roti (Plaas jt., avaldamisel).

Käesoleva töö eesmärgiks on uurida, kas *Wfs1*- puudulikel *Wfs1*-ex5-KO232 rottidel areneb suhkurdiabeedi-sarnane seisund ning kirjeldada selle tekkepõhjuseid.

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

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 Wolframi sündroom

Wolframi sündroomi kirjeldasid esmakordselt 1938. aastal Don J. Wolfram ja H. P. Wagener. Wolframi sündroomi põhisümptomid on magediabeet (DI, *diabetes insipidus*), suhkurdiabeet (DM, *diabetes mellitus*), nägemisnärv atroofia (OA, *optic atrophy*) ja sensorineuraalne kurtus (D, *deafness*) (Wolfram ja Wagener, 1938; Swift jt., 1990). WS esineb keskeltläbi ühel inimesel 160 000–770 000-st (Barrett jt., 1995; Kinsley jt., 1995). WS-i põhjustavad mutatsioonid wolframiin 1 valku kodeerivas geenis *WFS1* (Barrett jt., 1995).

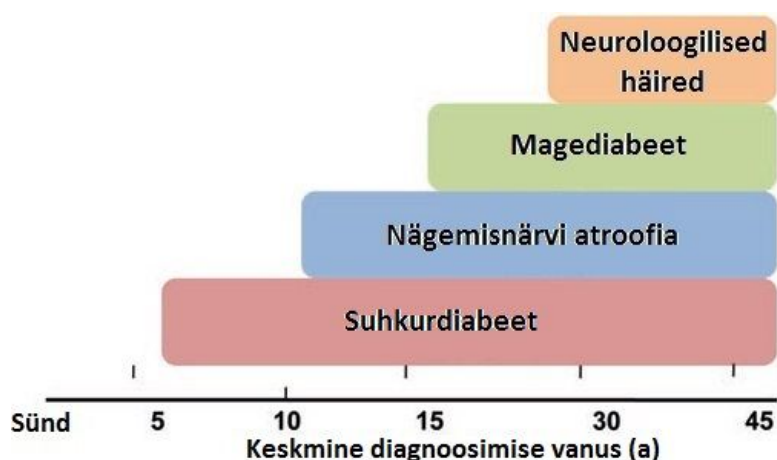
Lisaks põhisümptomitele kaasnevad WS-iga progresseeruv neurodegeneratsioon, perifeerne neuropaatia, ataksia, vaimse arengu peetus ja dementsus. Samuti võivad esineda kusetrakti atoonia, epilepsia, nüstagmid ja lõhnataju vähenemine. WS-i puhul on kirjeldatud ka südamerütmihäireid, kuid nende otsene seos wolframiin 1 ekspressiooniga kardiomüotsüütides on ebaselge (Swift jt., 1990; Swift jt., 1991; Barrett jt., 1995; Kinsley jt., 1995; Strom jt., 1998; Swift ja Swift, 2000; Smith jt., 2004).

Umbes 60%-l WS-i patsientidest (homosügootsed mutatsioonikandjad) esineb psühhiaatrilisi häireid, nagu depressioon, psühhoos ja agressiivsus (Swift jt., 1990). Polümorfismid *WFS1* geenis muudavad inimesed vastuvõtlikumaks meeleluuhäiretele (Swift ja Swift, 2000; Koido jt., 2005; Swift ja Swift, 2005), mida seostatakse muutustega serotonergilises, noradrenergilises ja dopamiinergilises süsteemis (Matto jt., 2011; Visnapuu jt., 2013a; Visnapuu jt., 2013b). Umbes 1%-l kogu inimpopulatsioonist on *WFS1* geenis eri mutatsioone. Heterosügootsetel *WFS1* mutatsiooni kandjatel on võrreldes tervete indiviididega 26 korda suurem tõenäosus psühhiaatriliste häirete tekkimiseks (Kesner jt., 2009; Swift ja Swift, 2000).

WS on kiirelt arenev progressiivne neurodegeneratiivne haigus (Joonis 1). Esimene sümptom on keskmiselt 6-aastaselt avalduv suhkurdiabeet (Barrett jt., 1995). DM hõlmab endas metaboolseid häireid, mis tulenevad pankrease beeta-rakkude hävimisest või nende ebapiisavast insuliini tootmisest (Urano, 2012; Wiley jt., 2013). Tekkinud hüperglükeemia (Butler jt., 2003; Donath ja Halban, 2004) võib kahjustada südant, veresooni, silmi, neerusid ja närve. Järgneb umbes 11. eluaastal avalduv nägemisnärv atroofia (Barrett jt., 1995; Barrett ja Bunday, 1997), mille esmased sümptomid on nägemisteravuse vähenemine ja

värvipimedus (Barrett jt., 1995; Rigoli jt., 2011). Suhkurdiabeedi ja nägemisteravuse või nägemise kaotuse koosinemine on minimaalne kriteerium võimaliku WS-i diagnoosimiseks (Strom jt., 1998; Rendtorff jt., 2011).

Magediabeet tekib tõrgetest hüpofüüsi vasopressiini tootmises (Wiley jt., 2013) või neerutorukestest vee tagasi-imendumises (Fenske ja Allolio, 2012). See esineb umbes 70%-l WS-i patsientidest ning avaldub ligikaudu 14 aasta vanuselt. Viimane levinud sümptom (65%-l patsientidest) on sensorineuraalne kurtus, mis varieerub oma tõsidusastmelt: alates teismeeas tekkivast progresseeruvast kuulmiskaost kuni täieliku kurtuseni juba sünnil (Barrett jt., 1995; Barrett ja Bunday, 1997; Rigoli jt., 2011).



**Joonis 1. Wolframi sündroomi kulg.** Mutatsioonid *WFS1* geenis põhjustavad Wolframi sündroomi, mida iseloomustavad vastavalt umbes 6- ja 11-aastaselt avalduvad suhkurdiabeet ja nägemisnärv atroofia. Haiguse hilisemas faasis ilmnevad magediabeet ja neuroloogilised häired. Jooniselt puudub WS-i viimane põhisümptom, sensorineuraalne kurtus, kuna see varieerub oma tõsidusastmelt ning võib avalduda täieliku kurtusena juba sünnil või teismeeas tekkiva progresseeruva kuulmiskaona (kohandatud; Fonseca jt., 2010b).

WS-i patsientide keskmine eluiga on 25–49 aastat. Surma põhjus on tavaliselt ajutüve atroofiast tingitud hingamiskeskuse neurodegeneratsioon, mille tõttu hingamine seiskub (Barrett jt., 1995; Barrett ja Bunday, 1997).

## 1.2 Wolframiin 1 geen ja valk

Inimesel paikneb *WFS1* geen neljanda kromosoomi 4p16.1 lookuses, hiirel viienda kromosoomi 5qB3 lookuses ning rottil 14. kromosoomi 14q21 lookuses. Nii hiire kui roti *Wfs1* geenidel on inimese *WFS1* geeniga 86%-line homoloogia (NCBI, 2017). *WFS1* geeni

kogupikkus on 33,4 kb ning see koosneb kaheksast eksonist. Esimene ekson on mittekodeeriv, mistõttu hakkab translatsioon teisest eksonist. Kaheksas ekson on kõige suurem (2,6 kb) ning seal paikneb 60% kogu wolframiin 1 valku kodeerivast järjestusest (Strom jt., 1998; Hofmann jt., 2003). Viimases eksonis paikneb ka valdav osa WS-i tekitavaid mutatsioone (Inoue jt., 1998; Strom jt., 1998).

Inimese *WFS1* geen kodeerib 890 aminohappe pikkust ja ligikaudu 100 kDa molekulmassiga valku nimega wolframiin 1 (Lisa 1; Hofmann jt., 2003). Tegemist on endoplasmiidse retiikulumi (ER) membraanis paikneva hüdrofoobse glükoproteiiniga (Strom jt. 1998; Takeda jt., 2001; Osman jt., 2003), millel on üheksa transmembraanset segmenti ja otstes pikad hüdrofiilsed piirkonnad (Takeda jt., 2001; Hofmann jt., 2003). Valgu N-terminaalne ots asub tsütoplasmas ja C-terminaalne ots ER-i luumenis (Hofmann jt., 2003). Leitud on, et *WFS1* valk lokaliseerub ka pankrease beeta-rakkude sekretoorsetes graanulites (Hatanaka jt., 2011).

### **1.2.1 *WFS1* funktsioonid**

*WFS1* on kõrgelt ekspresseeritud ajus, südames, maksas ja pankrease beeta-rakkudes ning vähemal määral ka skeletilihastes, neerudes ja põrnas (Ishihara jt., 2004; Philbrook jt., 2005; Inoue jt., 1998; Strom jt., 1998; Hofmann jt., 2003).

*WFS1* täpset funktsiooni ei teata, kuid arvatavasti osaleb see ER-stressi vastuses, valkude post-translatsioonilises modifitseerimises ja pakkimises ning  $Ca^{2+}$  taseme regulatsioonis (Hofmann jt., 2003).

*WFS1* on voltumata valkude vastuse (UPR) komponent, olles oluline beeta-rakkude ER-i stressi reguleerimisel. Arvatakse, et wolframiin 1 kontrollib transkriptsioonifaktori 6 alfa (ATF6-alfa) taset ja aktivatsiooni. Normaalingimustel liidab wolframiin 1 ATF6-alfa ja sünoviaalse apoptoosi inhibiitoriga 1 (SYVN1), mis omakorda märgib ATF6-alfa ubikvitiiniga ja saadab selle proteasoomidesse lagundamisele. ER-i stressi korral vabaneb ATF6-alfa *WFS1* küljest ning indutseerib ER-i stressi märklaud-molekulide, näiteks kuumašoki valkude perekonna A (HSP70) liikme 5 (HSPA5) ja X-box-iga seonduva valgu 1 (XBP1), ekspressiooni. Kui ER-i homöostaas on taastunud, degradeeritakse *WFS1* abil ATF6-alfa. *WFS1*-puudulikkus põhjustab aga ATF6-alfa hüperaktivatsiooni, mistõttu suunatakse beeta-rakud apoptoosi (Fonseca jt., 2010a).

Samuti on näidatud, et *Wfs1* geeniekspressiooni vaigistamine roti primaarsetes neuronites põhjustab ER-i stressi, mille tagajärjel häirub inositol-1,4,5-trisfosfaadi (IP3) tundliku kaltsiumikanali IP3-retseptori (IP3R) töö. Väheneb Ca<sup>2+</sup> vabanemine IP3R-i kaudu ning rakusisene Ca<sup>2+</sup> tasakaal läheb paigast (Cagalinec jt., 2016).

### **1.2.2 WFS1 roll glükoosi homöostaasi säilitamises**

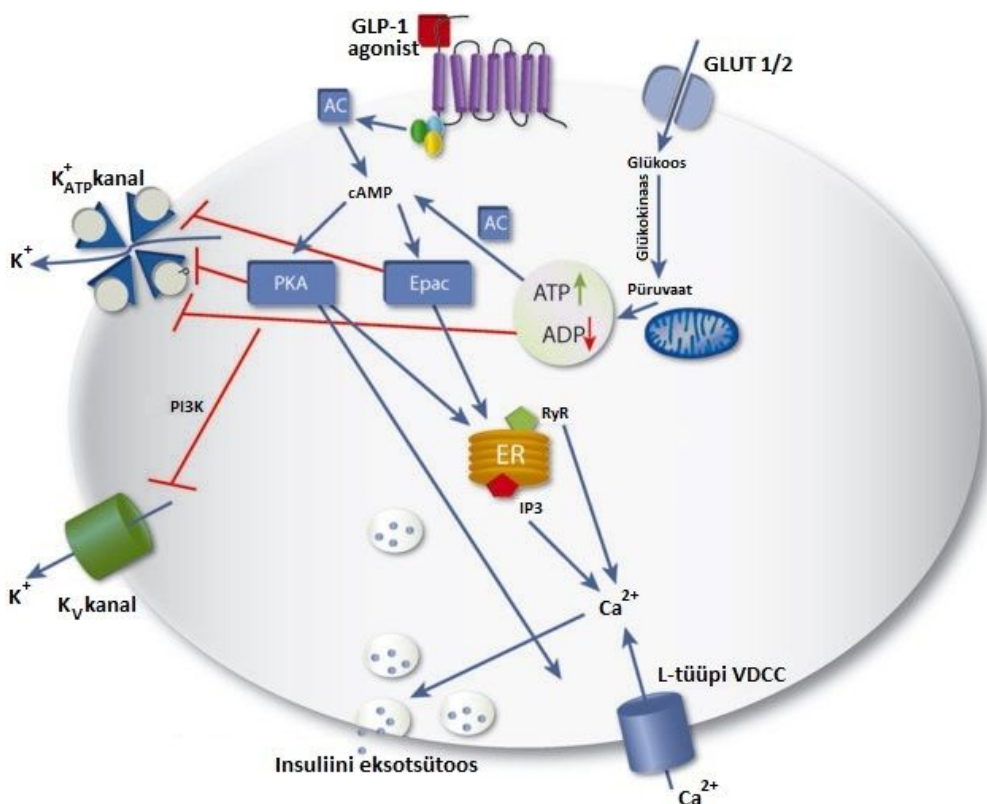
Põhiliselt vastutavad organismi glükoosi homöostaasi eest pankrease Langerhansi saarekestes asuvad alfa- ja beeta-rakud (Röder jt., 2016). Saarekesed ja väikesed veresooned moodustavad tiheda võrgustiku, võimaldades kiirelt tunnetada vere glükoosisisaldust (Fu jt., 2013). Vastavalt sellele toodavad alfa-rakud veresuhkru taset tõstvat glükagooni või beeta-rakud veresuhkru taset langetavat insuliini, hoides inimesel nii vere glükoositaset 4–6 mM juures (Röder jt., 2016).

Põhiliseks insuliini vabastavaks stiimuliks on pärast sööki tõusev vere glükoositase (Komatsu jt., 2013). Beeta-rakkude pinnal paikneb glükoosi transporter 2 (GLUT2), mis transpordib veres oleva glükoosi beeta-rakkude sisse. Seal toimub glükolüüs, mistõttu tekib adenosiin trifosfaat (ATP) ning ATP/ADP suhe kasvab. Muutunud ATP/ADP suhte tõttu sulguvad rakumembraani ATP- tundlikud K<sup>+</sup>-kanalid, membraan depolariseerub ning avanevad pingetundlikud- kaltsiumikanalid (VDCC). Rakusisese Ca<sup>2+</sup> kontsentratsiooni tõus põhjustab insuliini sisaldavate graanulite ja rakumembraani kokkusulamise ning insuliin vabastatakse (Joonis 2; Henquin, 2000). Tegemist on insuliini sekretsiooni esimese faasiga.

Raku sisenenud kaltsiumi teiseks ülesandeks on indutseerida rakusisestest kaltsiumihoidlatest, ER-ist (Graves ja Hinkle, 2003; Kang ja Holz, 2003) ja sekretoorsetest graanulitest (Nakagaki jt., 2000; Kang ja Holz, 2003) kaltsiumi vabastamist. Raku sees oleva vaba kaltsiumi kontsentratsiooni tõus võimendab insuliini sisaldavate graanulite eksotsütoosi ja seeläbi ka insuliini sekretsiooni. Nii leiab aset insuliini sekretsiooni teine faas (Meloni jt., 2013).

*WFS1* on tähtis insuliini biosünteesis ja sekretsioonis. *WFS1* ekspresseeritakse glükoosi vahendatud insuliini sekretsiooni ajal (Fonseca jt., 2005; Lipson jt., 2006), mistõttu võib *WFS1* osa võtta beeta-rakkude ER-is toimuvast proinsuliini voltimisest ja töötlemisest (Fonseca jt., 2010b). On näidatud, et ER-i stressi aktiveeritud *ATF6-alfa* vähendab insuliini geeniekspressiooni (Seo jt., 2008). *WFS1* kui *ATF6-alfa* regulaator, saab seega ennetada

insuliini geeni maha surumist (Fonseca jt., 2010b). Wolframiin 1 mängib rolli ka ER-i  $Ca^{2+}$  taseme säilitamisel (Urano, 2016), millest sõltub näiteks insuliini sekretsioon insuliini sisaldavatest graanulitest (Henquin, 2000).

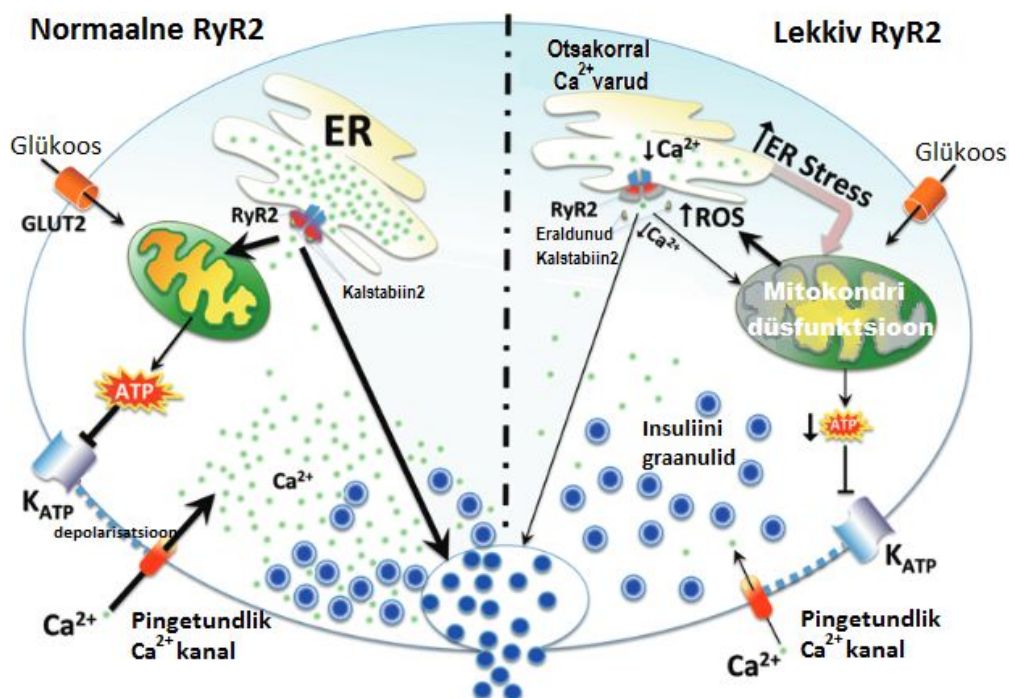


**Joonis 2. Skemaatiline ülevaade insuliini sekretsioonist.** Glükoos siseneb beeta-raku läbi glükootransporterite (GLUT 1/2) ja muudetakse seejärel ATP-ks. Vastusena glükoosile sekreteerivad soolestiku L-rakud glükagoonitaolist valku 1 (GLP-1). Glükoos seondub GLP-1 retseptorile, põhjustades tsüklilise adenosinmonofosfaadi (cAMP) taseme tõusu ning Epaci (*exchange protein activated by cAMP*) ja valgu kinaasi A (PKA) aktivatsiooni. Glükoosi metabolism suurendab ATP/ADP suhet, mis inhibeerib ATP-tundlikke kaaliumikanaleid ( $K^+$  ATP-kanal). Võimetus beeta-rakkudest  $K^+$  välja pumbata põhjustab membraani depolarisatsiooni ja pingetundlike kaltsiumikanalite (VDCC) avanemise. GLP-1 aktiveeritud PKA ja Epac inhibeerivad samuti  $K^+$  ATP- ja pingetundlike ( $K_v$ )kanaleid, takistades beeta-raku repolarisatsiooni. PKA ja Epac muudavad endoplasmaatilise retiikulumi (ER) kaltsiumikanaliteks töötavaid inositol-1,4,5-trisfosfaadi (IP3) ja rüanodiini retseptoreid (RyR). Seetõttu vabastatakse rakusisestest varudest kaltsiumi, vaba  $Ca^{2+}$  kontsentratsioon tõuseb ning viimane aitab kaasa insuliini eksotsütoosile (kohandatud; Meloni jt., 2013). PI3K, fosfatidüülinositol-4,5 bisfosfaat 3-kinaas

ER-i stress ja krooniliselt kõrge glükoositaseme vähendavad pankrease beeta-rakkude ER-is oleva  $Ca^{2+}$  taset, põhjustades beeta-rakkude surma (Ishihara jt., 2004; Yamada jt., 2006; Akiyama jt., 2009; Hara jt., 2014). ER-i kaltsiumitaset reguleerivad kolme tüüpi valgud:

- SERCA (sarko/endoplasmaatilise retiikulumi kaltsiumi-ATPaas), mis pumpab kaltsiumit tsütosoolist ER-i sisse
- ER-i luumenis asuvad kaltsiumit siduvad valgud aitavad kaltsiumitaset säilitada
- IP3R (inositool-1,4,5-trisfosfaadi) ja rüanodiini retseptorid (RyR) on kaltsiumikanalid, mis vabastavad ER-is oleva  $\text{Ca}^{2+}$  tsütosooli (Pozzan jt., 1994).

On näidatud, et WFS1 on beeta-rakkude ER-i  $\text{Ca}^{2+}$  homöostaasi eest vastutava SERCA negatiivne regulaator, olles tavatingimustel sellega seotud. ER-stressi korral WFS1 ja SERCA interaktsioon väheneb, mistõttu pumbatakse SERCA abil tsütosoolist ER-i luumenisse rohkem  $\text{Ca}^{2+}$  ioone. Nii püütakse taastada kaltsiumi homöostaasi ning vältida rakkude apoptoosi minemist (Zatyka jt., 2015). Samuti on vihjatud, et RyR-kanalid mängivad olulist rolli insuliini sekretsioonis ja glükoosi homöostaasi säilitamisel. Lekked RyR-kanalites (Joonis 3) põhjustavad beeta-rakkude ER-is  $\text{Ca}^{2+}$  taseme langust, mistõttu tekivad ER-i stress ja mitokondrite funktsioneerimise häired ning langeb glükoosi vahendatud insuliini vabastamine (Santulli jt., 2015).



**Joonis 3. RyR2-kanali lekkimine põhjustab ER-i stressi ja inhibeerib insuliini vabastamist.** Krooniline kaltsiumi leke kaltsiumikanali rüanodiini retseptori 2 (RyR2) kaudu vähendab raku  $\text{Ca}^{2+}$  taset, mis põhjustab ER-i stressi ja mitokondriaalset düsfunktsiooni. Selle tõttu vähenevad ATP süntees ja glükoosi vahendatud insuliini vabastamine. Häired mitokondrite töös tekitavad reaktiivsete hapnikuühendite (ROS) taseme tõusu, suurendades kaltsiumi lekkimist veelgi (kohandatud; Santulli jt., 2015). GLUT2, glükoosi transporter 2; K<sub>ATP</sub>, ATP-tundlik kaaliumikanal

Lu jt. (2014) näitasid, et rüanodiini retseptori antagonist dantroleen võib ennetada *WFS1*-puudulikkusest tingitud rakusurma. Nad uurisid dantroleeni võimalikku terapeutilist mõju vastavalt hiirte ja rottide *Wfs1*-mutantsetes neuronites ja pankrease beeta-rakkudes. Selgus, et dantroleen vähendas nii wolframiin 1 puudulikes neuronites kui ka beeta-rakkudes raku tsütoplasma kaltsiumitaset ja kaltsiumist sõltuva proteaasi kalpaiini aktiivsust, taastas tsütosoolis oleva  $Ca^{2+}$  hulga ning surus maha apoptoosi. Lisaks aitas dantroleen vähendada WS-i patsientide indutseeritud pluripotentsetest tüvirakkudest saadud neuraalsetes eellasrakkudes apoptoosi. Seega võib dantroleen olla üks potentsiaalne Wolframi sündroomi teraapias kasutatava ravimi kandidaat (Lu jt., 2014).

### **1.3 Transgeensed wolframiin 1 mutantset loomudeliid**

#### **1.3.1 *Wfs1*-puudulikkusega hiiremudeliid**

Et uurida WS-iga kaasnevaid patoloogiaid, *WFS1* geeni funktsiooni ja võimalikke WS-i vastaseid raviteraapiad, on praeguseks eri laborites konstrueeritud kolm transgeenset *Wfs1*-puudulikkusega hiiremudelit (Ishihara jt., 2004; Riggs jt., 2005; Luuk jt., 2009).

Ishihara jt. (2004) valmistasid *Wfs1 knock-out* (KO) hiirte liini, deleteerides hiires *Wfs1* geeni teise eksoni (*Wfs1* null mutant). Leiti, et transgeensetel hiirtel esineb ER-i stressist tingitud progresseeruv beeta-rakkude massi kadu, mille tulemusel areneb neil välja glükoositalumatus (Ishihara jt., 2004).

Riggs jt. (2005) valmistasid konditsionaalse, beeta-raku-spetsiifilise *Wfs1*-mutantse hiire. Selleks lülitasid nad välja Langerhansi beeta-rakkudes oleva *Wfs1* geeni kaheksanda eksoni. Sarnaselt Ishihara jt. (2004) *Wfs1*-mutantse hiirega leiti, et hiirel on ER-i stressist tingitult vähenenud beeta-rakkude mass ning elu jooksul välja kujunev glükoositalumatus (Riggs jt., 2005).

Viimase hiiremudeli valmistasid Tartu Ülikooli bio- ja siirdemeditsiini instituudi füsioloogia osakonnas Luuk jt. (2008). Nendel transgeensetel hiirtel on välja lülitatud *Wfs1* geeni kaheksas ekson, mis on asendatud NLS- LacZ ekspresioonikassetiga. Võrreldes metsiktüüpi (WT) pesakaaslastega on antud hiirtel väiksem kehakaal, häirunud glükoositalumatus, madalam insuliini baastase ning esinevad insuliini vabastamise häired (Luuk jt., 2009; Noormets jt., 2011; Terasmaa jt., 2011).

Tartu Ülikoolis tehtud *Wfs1*-puudulikud hiired on võrreldes metsiktüüpi hiirtega tundlikumad antidepressantide imipramiin ja paroksetiin mõju suhtes. See võib tuleneda 5-hüdroksütrüptofaani (5-HT) metabolismihäiretest ja 5-HT transporteri (SERT) ekspressiooni langemisest (Visnapuu jt., 2013b). Hiirte dopaminergilise süsteemi uurimisel selgus, et mutantsetel hiirtel on probleeme neurotransmitteri dopamiin vabastamisega. Lisaks näidati, et võrreldes WT-pesakaaslastega on *Wfs1*-puudulikel hiirtel dopamiini transporterit kodeeriva geeni ekspressioon vähenenud (Visnapuu jt., 2013a). *Wfs1*-mutantsetel hiirtel on pluss-puuri katses kõrgem ärevuse-sarnane käitumine ning nad on ülitundlikud gamma-aminovõihappe A (GABAA) retseptori agonisti *diazepam* anksiolüütilise efekti suhtes (Raud jt., 2009).

Kokkuvõtvalt võib öelda, et kõikidel eespool nimetatud *Wfs1*-mutantsetel hiiremudelitel areneb elu jooksul välja glükoositalumatus, esinevad häired glükoosi stimuleeritud insuliini sekretsioonis ning neil on võrreldes oma WT-pesakaaslastega kõrgem beeta-rakkude apoptoosi- ja madalam insuliinitase (Ishihara jt., 2004; Riggs jt., 2005; Luuk jt., 2009; Noormets jt., 2011; Terasmaa jt., 2011). Samas pole seni näidatud, et *Wfs1*-puudulikkus põhjustaks hiirtel suhkurdiabeeti. Seega ei esine loodud *Wfs1*-mutantsetel transgeensetel hiirtel ühte WS-i põhisümptomit, mille järgi saaks neil humaanmeditsiinis kasutatavate kriteeriumite alusel WS-i diagnoosida. See ajendas Tartu Ülikooli teadlasi konstrueerima *Wfs1*-puuduliku roti (Plaas jt., avaldamisel).

### **1.3.2 *Wfs1*-puudulikkusega rotimudel**

Plaas jt. (avaldamisel) valmistasid *Wfs1*-puuduliku transgeense roti, kasutades selleks ZFN-i (tsink-sõrmede) tehnoloogiat, mille tulemusel deleteeriti rotis suur osa *Wfs1* geeni 5. eksonist (Lisa 2).

Rotiliinil *Wfs1*-ex5-KO232 puudub *Wfs1* geenist 184 bp (17 833–18 017), kaasa arvatud enamik viienda eksoni kodeerivast osast. 55 bp kadu *Wfs1* geeni viiendast eksonist ei põhjustanud raaminihkemutatsiooni ning neljanda ja kuuenda eksoni vahele tekkis uus,alaniini kodeeriv GCC koodon (Plaas jt., avaldamisel).

*Wfs1*-mutantse roti (*Wfs1*-ex5-KO232) konstrueerimisest ja Wolframi sündroomi fenotüübist ilmub artikkel (Plaas jt., avaldamisel).

## 2. EKSPERIMENTAALOSA

### 2.1 Töö eesmärk

Antud magistritöö eesmärgiks oli:

- uurida *Wfs1*-puuduliku *Wfs1-ex5-KO232* roti suhkurdiabeedi fenotüüpi
- kirjeldada *Wfs1-ex5-KO232* roti suhkurdiabeedi võimalikke tekkepõhjuseid

### 2.2 Materjal ja meetodika

#### 2.2.1 Katseloomad

Katseloomadena kasutati isaseid Tartu Ülikooli Katseloomakeskuses kasvatatud *Wfs1*-puudulikkusega homosügootseid ja nende metsiktüüpi pesakonnakaaslasid (CrI: CD (Sprague-Dawley) rats CD<sup>®</sup> IGS, *Charles River Laboratories*). Rotid paljundati ja genotüüpiseeriti Tartu Ülikooli Katseloomakeskuses. Loomade vanus oli katsete ajal 1–13 kuud. Rotte hoiti puurides 2–4 kaupa standardtingimustel ning 12 h valge ja 12 h pime tsükli (valge tsükkel algas kell 7 hommikul). Rottidel oli vaba ligipääs toidule ja veele, välja arvatud katse ajal. Eksperimendid tehti ajavahemikus 9.00–17.00. Katsed viidi läbi Põllumajandusministeeriumi loomkatsete loakomisjoni välja antud loa alusel (nr. 54, välja antud 23. veebruar 2015). Kõik loomkatsed viidi läbi magistritöö juhendajate poolt.

#### 2.2.2 Intraperitoneaalne glükoositolerantsi test

Intraperitoneaalse glükoositolerantsi testi (IPGTT) jaoks hoiti katseloomi 2 tundi enne katse algust toiduta. Katse ajal puudus toit, aga vesi oli vabalt kättesaadav. Vere glükoositaset mõõdeti glükomeetri (Accu-Check Performa, Roche) abil sabaveenist saadud vereproovidest. Enne katse algust mõõdeti veresuhkru baastase, misjärel manustati loomadele intraperitoneaalselt (i.p.) füsioloogilises lahuses (0,9% NaCl) lahustatud glükoosi (*D-(+)-Glucose*; *Sigma-Aldrich*, kat. G5767-500G) doosiga 2 g/kg kehakaalu kohta ja süstemahus 10 ml/kg. 30, 60, 90, 120 ja 180 minutit pärast glükoosisüsti mõõdeti vere glükoositaset. Vere insuliinitaseme määramiseks võeti sabaveenist vahetult enne ja 30 minutit pärast glükoosi manustamist vereproovid. Seerumi eraldamiseks tsentrifuugiti verd 4 °C juures kiirusel 2000 x g 15 minutit. Seerumit hoiti kuni edasiste analüüsideni –80 °C juures.

### 2.2.3 Insuliinitaseme määramine

Katseloomade vereseerumi insuliinitaseme kvantitatiivseks määramiseks kasutati komplekti *Ultra Sensitive Rat Insulin ELISA Kit* (CrystalChem, kat. 90060) vastavalt tootja juhistele.

### 2.2.4 Insuliinitolerantsi test

Insuliinitolerantsi test (ITT) viidi läbi sarnaselt IPGTT testiga, kuid katseloomadele süstiti subkutaanselt (s.c.) inimese insuliini (1 U/kg; Lantus Solostar). 11-kuulistel *Wfs1-ex5-KO232* rottidel sagenevad vananedes hüperglükeemia juhud. Seetõttu viidi insuliinitolerantsi test läbi nende 11-kuuliste loomadega, kellel ei olnud veel hüperglükeemiat tekkinud.

### 2.2.5 Uriinianalüüs

Uriin koguti mittepaastunud rottidelt valges faasis. Uriini glükoositase määrati Tartu Ülikooli Kliinikumi Ühendlaboris standardiseeritud protseduuridega.

### 2.2.6 Langerhansi saarekeste eraldamine

Katseloomad surmati ja kohe süstiti ühissapijuha kaudu pankreasesse 4–5 ml kollageenaasi (*Collagenase from Clostridium histolyticum*; Sigma-Aldrich, kat. C7657-100MG) lahust (lahustatud *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS; 1 x, Naxo, kat. 2008); lõppkontsentratsioon 1 mg/ml). Seejärel eemaldati kogu lahusega täidetud pankreas, mis asetati jääle olevasse tuubi. Selleks, et vältida lagunenu koe kokkukleepumist katkistest rakkudest pärit DNA tõttu, lisati tuubi Dnaas I (1mg/ml, Appli. Chem., kat. A3778; lõppkontsentratsioon 10mg/ml). Ensüümireaktsioonid tehti 37 °C vesivannis 17 minuti jooksul, mille vältel raputati tuubi kergelt kaks korda. Reaktsioonide peatamiseks lisati tuubi 10 ml *Bovine Serum Albumini* (BSA-d) lahustatuna HBSS-is (BSA/HBSS; Sigma- Aldrich, kat. A7906; lõppkontsentratsioon 0,2%) ning proov asetati kohe jääle. Proovi pesti kaks korda BSA/HBSS-i lahusega, lastes pesude vahele jääva 7 minuti jooksul rakkudel tuubi põhja vajuda, misjärel supernatant eemaldati. Tuubi lisati 10 ml BSA/HBSS-i lahust ning proovi hoiti kogu Langerhansi saarte eraldamise aja jääle. Pankrese saarekesed korjati käsitsi valgusmikroskoobi all puhtasse BSA/HBSS-i lahusega Petri tassi. Puhtasse BSA/HBSS-i lahusesse korjamise etappi korrati seni, kuni Langerhansi saarekesed olid ümbritsevast eksokriinsest koest puhtad. Selleks, et saarekesed ensümaatilise reaktsioonist taastuksid, tõsteti need tassil olevasse 1,5 ml söötmesse (RPMI 1640; Gibco, kat. A10491). Tassi hoiti

16–18 tundi 37 °C 5% CO<sub>2</sub> juures. Järgnevalt koguti saarekesed 1,5 ml HBSS-i lahusesse, võttes kaasa võimalikult vähe eelnevat söödet. Seejärel viidi saarekesed 400 µl TRIzol reagenti (Zymo Research, kat. R2052) sisaldavasse tuubi ning hoiti RNA eraldamiseni –20 °C juures.

### **2.2.7 RNA eraldamine**

RNA eraldati *Direct-zol RNA MiniPrep* (Zymo Research, kat. R2052) komplektiga vastavalt tootja juhistele. Proove tsetrifuugiti kiirusel 12 000 x g 1 minut ning RNA elueerimiseks kasutati 40 µl Dnaasi/Rnaasi-vaba vett.

RNA kvaliteeti ja puhtust kontrolliti NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific) spektrofotomeetriga. cDNA sünteesiks vajalik RNA hulk (200 ng) viidi uude puhtasse tuubi. Nii cDNA sünteesi alikvoot kui ülejäänud puhas RNA hoiustati –80 °C juures.

### **2.2.8 cDNA süntees**

cDNA sünteesimiseks kasutati Superscript III Reverse Transcriptase 10 000U Kit komplekti (Thermo Fisher Scientific; kat. 18080044), mis sisaldas pöördtranskriptaasi SuperScript™ III RT (SuperScript III), puhvrit 5 x *First-Strand Buffer* (FS x 5) ja 0,1 DTT-d.

Esmalt lisati cDNA alikvoodile (200 ng) MQ vett (lõppmaht 10 µl) ning seejärel 2 µl heksameeri (Applied Biosystems). Proovi hoiti 10 minutit 65 °C, 1 minut jääl ja siis tehti *spin-down*. Proovile lisati 1,5 µl MQ vett, 1 µl dNTP-d (10 µM; Thermo Scientific, kat. R0186), 4 µl FS x 5 puhvrit, 1 µl DTT-d ja 0,5 µl SuperScript III. Pöördtranskriptaasi reaktsioon toimus 10 min toatemperatuuril, 45 min 37 °C, 45 min 42 °C, 10 min 45 °C ja 10 min 75 °C. Sünteesitud cDNA-d hoiustati –20 °C juures.

### **2.2.9 Kvantitatiivne reaalaja- polümeraasi ahelreaktsioon**

Kvantitatiivse reaalaja PCR-i (qRT-PCR) tehti QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR (Applied Biosystems) masina ja QuantStudio 12K Flex v1.2.2 tarkvara abil. Kasutatud kommertsiaalsed TaqMan-i sondid *Wfs1*, *Hspa5* ja *Hprt1* (*TaqMan Gex Master Mix-5ML*; Applied Biosystems, kat. 4369016) on toodud lisas 3. Kontrollproovi lisati cDNA asemel MQ vett. Referentsina kasutati *Hprt1* koduhoidjageeni. Kõik reaktsioonid tehti 3 korduses, lõppmahuga 10 µl.

*Wfs1*-puudulike ja metsiktüüpi rottide geeniekspressioonianalüüsid tehti samaaegselt. qRT-PCR-i skeem on toodud lisas 4.

### **2.2.10 Polümeraasi ahelreaktsioon**

Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR) tehti 3- ja 7-kuuliste rottide Langerhansi saarekeste cDNA-ga, kasutades Mastercycler gradient (Eppendorf) PCR-i masinat. PCR-i reaktsiooni maht oli 40 µl. Segu sisaldas 28,6 µl MQ vett, 8 µl puhvrit (5x HOT FIREPol Blend Master Mix Ready to Load koos 10 mM MgCl<sub>2</sub>; Solis BioDyne, kat. 04-25-00120), 1 µl cDNA-d, 1,2 µl *Forward* praimerit ja 1,2 µl *Reverse* praimerit. Kasutatud praimerid on toodud lisas 5 ja PCR-i skeem lisas 6.

PCR-i produktide analüüsimiseks kasutati geelelektroforeesi. Proovid kanti 0,5x TBE (Naxo, kat. 3120) puhvril olevale 3% agarosgeelile. DNA fragmentide pikkuse määramiseks kasutati 100 bp DNA Ladder Ready to Load markerit (Solis BioDyne, kat. 07-11-00050). On näidatud, et roti splaissimata cDNA annab 480 bp pikkuse ja splaissitud cDNA 454 bp pikkuse produkti (Yusta jt., 2006). Geelelektroforees viidi läbi toatemperatuuril, kuni mainitud DNA bändide eraldumiseni. Geeli pildistati ultravioletvalguses (UVItec Limited; objektiiv Rainbow TV Zoom Lens H6X8 8-48mm).

WT- ja KO- rottide cDNA-de DNA fragmente analüüsiti tarkvaraga ImageJ. Võrreldi *Xbp1* S osakaalu kogu *Xbp1*-st.

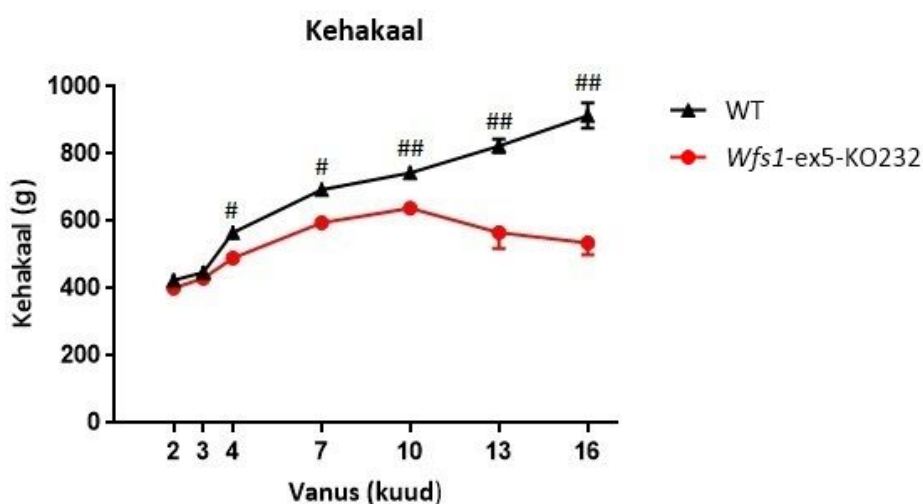
### **2.2.11 Statistika**

Andmed on esitatud kui keskmine ± standardviga (SEM). Statistika tehti Studenti *t*-testi või kahe-suunalise dispersioonanalüüsiga (ANOVA) ning seejärel sooritati Tukey' *post-hoc*-test. Andmete analüüsiks kasutati tarkvara GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc, USA), Statistica 8 (Statistica, USA) ja Image J (NIH, USA). Statistiliselt oluliseks loeti *p*-väärtust, mis oli väiksem kui 0,05 ( $p < 0,05$ ).

## 2.3 Tulemused

### 2.3.1 Kehakaal

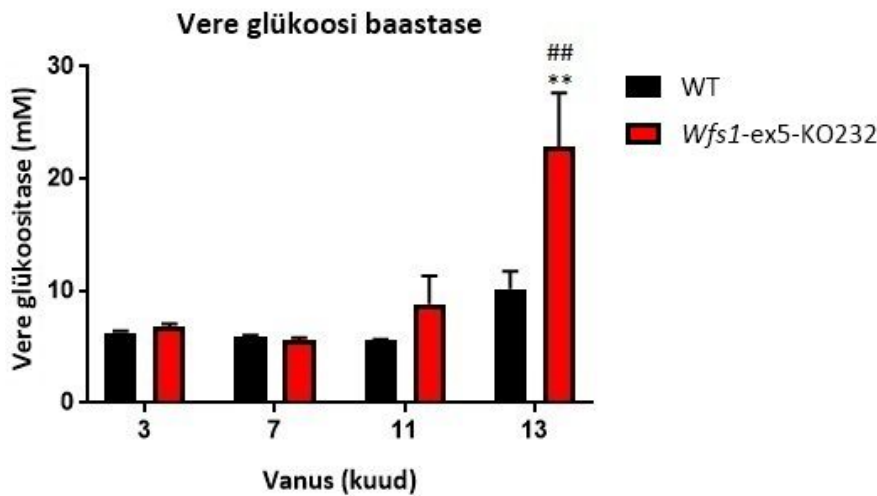
4–10 kuu vanused *Wfs1*-ex5-KO232 rotid olid oma WT-pesakaaslastest veidi kergemad. Alates 10. elukuust hakkasid *Wfs1*-ex5-KO232 rotid kaalu kaotama, samal ajal kui WT-rottide kehakaal tõusis edasi (Joonis 4).



**Joonis 4.** *Wfs1*-ex5-KO232 rottide kehakaal on metsiktüüpi pesakaaslaste omast väiksem. 4–10 kuu vanused KO-rotid on oma WT-pesakaaslastest veidi kergemad. Pärast 10. elukuud hakkab *Wfs1*-puudulike rottide kehakaal langema, samas kui WT-rottide kaal tõuseb edasi; ( $F(1, 153) = 197,9, p < 0,001$  (genotüüp);  $F(7, 153) = 114,5, p < 0,001$  (vanus);  $F(7, 153) = 22,07, p < 0,001$  (genotüüp  $\times$  vanus)); #  $p < 0,05$  ja ##  $p < 0,01$  samas vanuses genotüüpide vahel,  $n = 6$ .

### 2.3.2 Veresuhkru baastase

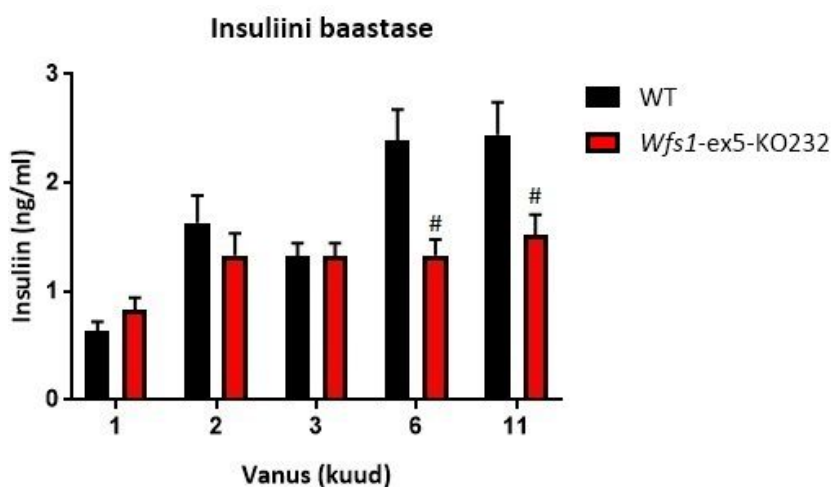
Mõlema genotüübi vere glükoosi baastase oli kuni 11. elukuuni sarnane (Joonis 5). Peale seda tõusis *Wfs1*-ex5-KO232 rottidel vere glükoosi baastase järsult (tekkis hüperglükeemia), olles 13. elukuul üle 20 mM (Joonis 5).



**Joonis 5. *Wfs1-ex5-KO232* rottide vere glükoositase tõuseb vanuse kasvades.** Mõlemal genotüübil on vere glükoosi baastase 11. elukuuni sarnane. 11 kuu vanustel KO-rottidel tekib hüperglükeemia ja 13 kuu vanuselt on nende vere glükoosi baastase üle 20 mM; ( $F(1, 48) = 8,19, p = 0,006$  (genotüüp);  $F(3, 48) = 12,88, p < 0,001$  (vanus);  $F(3, 48) = 4,48, p < 0,007$  (genotüüp × vanus));  $## p < 0,01$  samas vanuses genotüüpide vahel,  $** p < 0,01$  genotüübisiseselt (vs. 3 kuu vanused loomad),  $n = 6$ .

### 2.3.3 Vereseerumi insuliini baastase

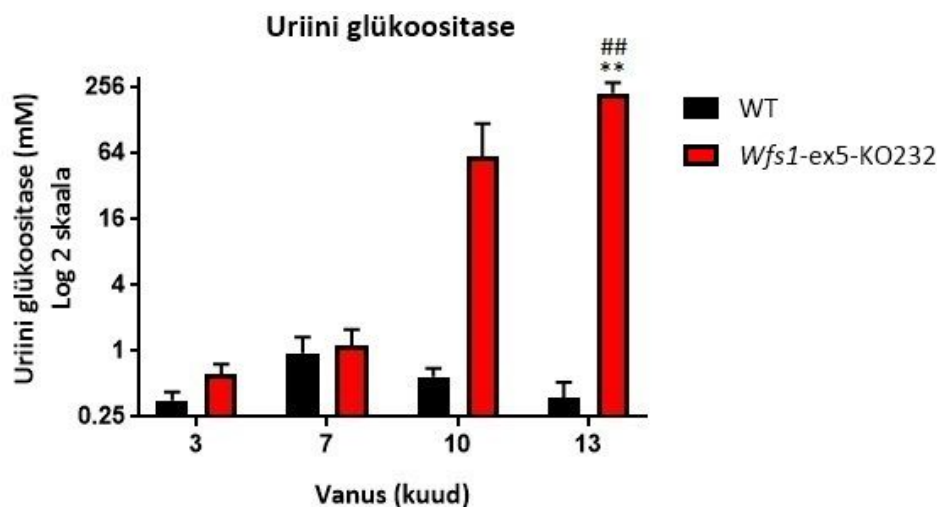
*Wfs1-ex5-KO232* ja metsiktüüpi rottide vereseerumi insuliini baastase oli kuni 6. elukuuni sarnane. Alates 6. elukuust oli *Wfs1-ex5-KO232* rottidel võrreldes WT-pesakaaslastega madalam insuliini baastase (Joonis 6).



**Joonis 6. *Wfs1*-puudulike rottide vereseerumi insuliini baastase on madalam kui WT-rottidel.** 6. elukuuni on WT- ja KO-rottide insuliini baastase sarnane, seejärel langeb *Wfs1-ex5-KO232* rottide insuliini baastase võrreldes WT-rottidega; ( $F(1, 55) = 9,46, p = 0,003$  (genotüüp);  $F(4, 55) = 11,42, p < 0,001$  (vanus);  $F(4, 55) = 3,53, p = 0,01$  (genotüüp × vanus));  $# p < 0,05$  samas vanuses genotüüpide vahel,  $n = 6$ .

### 2.3.4 Uriini glükoositase

Uriini glükoositase oli kuni 10. elukuuni KO- ja WT-rottidel sarnane. 10 kuu vanustel *Wfs1-ex5-KO232* rottidel tekkis glükosuuria, mis süvenes 13. elukuuni (Joonis 7).



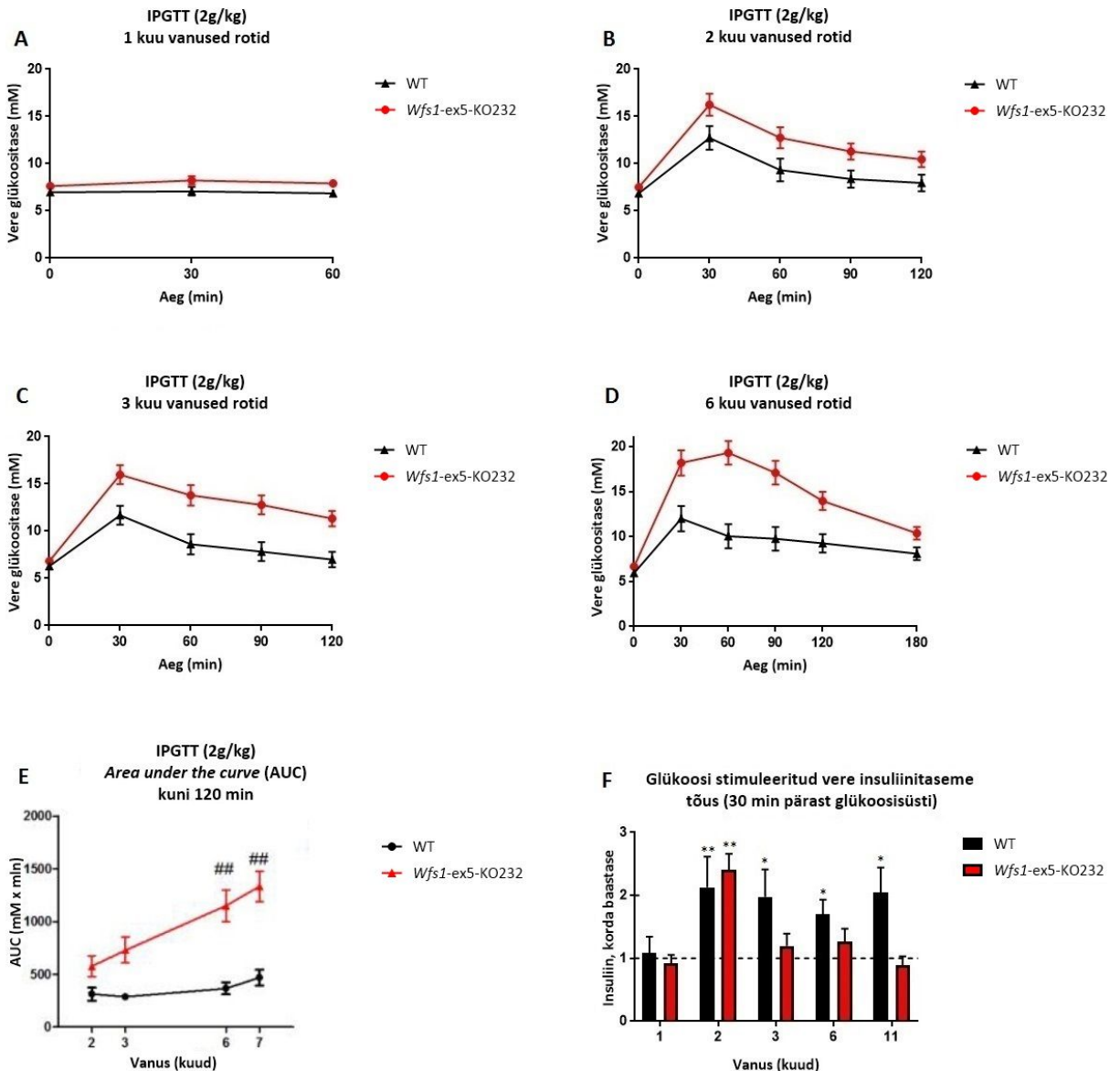
**Joonis 7. *Wfs1-ex5-KO232* rottidel tekib glükosuuria.** Uriini glükoositasemes ei ole kuni 10. elukuuni genotüüpidevahelisi erinevusi, misjärel tekib *Wfs1-ex5-KO232* rottidel glükosuuria; ( $F(1, 51) = 9,87, p = 0,003$  (genotüüp);  $F(3, 51) = 5,34, p = 0,003$  (vanus);  $F(3, 51) = 5,36, p = 0,003$  (genotüüp  $\times$  vanus)); ##  $p < 0,01$  samas vanuses genotüüpide vahel, \*\*  $p < 0,01$  genotüübisiseselt (vs. 3 kuu vanused loomad),  $n = 6$ .

### 2.3.5 Glükoositundlikkus

Juba 2. ja 3. elukuul oli *Wfs1-ex5-KO232* rottidel märgata tendentsi glükoosi-talumatuse suunas (Joonised 8B ja 8C). 6-kuu vanustel *Wfs1-ex5-KO232* rottidel esines märgatav glükoositalumatus (Joonis 8D). Glükoositolerantsuse testi andmete analüüsimine ROC-kõvera-aluse pindala (AUC) meetodil näitas, et *Wfs1-ex5-KO232* rottidel suureneb glükoositalumatus vanuse kasvades, samal ajal kui WT-rottide glükoositalumatus ei olnud vanusega seotud (Joonis 8E).

### 2.3.6 Glükoosi stimuleeritud insuliini sekretsioon

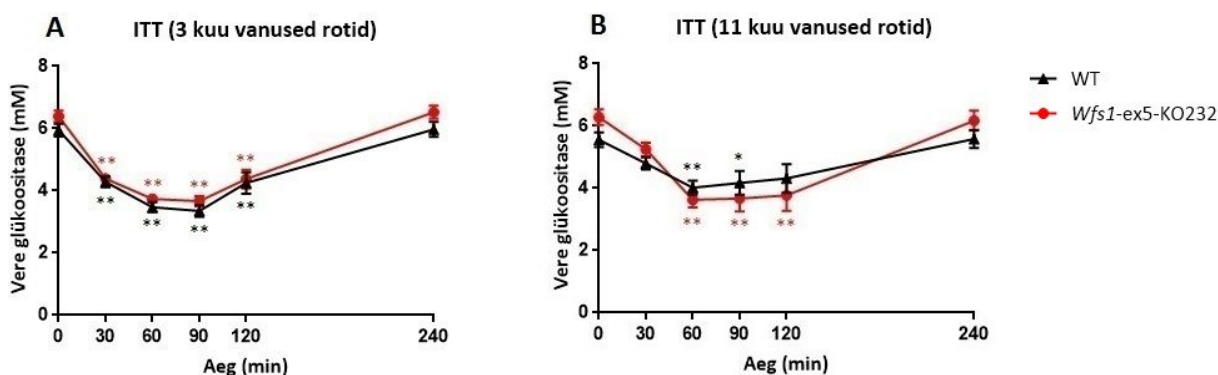
2–11 kuu vanustel metsiktüüpi rottidel tõuseb vere insuliinitase 30 minutit peale glükoosi manustamist (2g/kg, i.p.; Joonis 8F). *Wfs1-ex5-KO232* rottidel tõusis vere insuliinitase ainult 2. elukuul (Joonis 8F), mis viitab sellele, et *Wfs1-ex5-KO232* rottidel tekivad alates 3. elukuust glükoosi stimuleeritud insuliini vabastamise häired (Joonis 8F). 1 kuu vanuste rottide vere glükoositase ei tõusnud (Joonis 8A).



**Joonis 8. Glükoositundlikkus ja glükoosi stimuleeritud insuliini sekretsioon.** Intraperitonaalse glükoositalumuse testi (IPGTT) jaoks manustati katseloomadele glükoosi (2g/kg, i.p.) ja seejärel mõõdeti glükomeetriga vere glükoositaset. 1 ja 2 kuu vanustel metsiktüüpi ja *Wfs1-ex5-KO232* rottidel oli glükoositalumuse sarnane (**A** ja **B**). 3. elukuul esines *Wfs1-ex5-KO232* rottidel kerge glükoositalumatus (**C**), mis süvenes 6. elukuuks (**D**). IPGTT-s osalenud eri vanusega rottide ROC-kõvera-alune pindala (AUC);  $F(1, 44) = 64,78, p < 0,001$  (genotüüp);  $F(3, 44) = 8,60, p < 0,001$  (vanus);  $F(3, 44) = 3,75, p = 0,017$  (genotüüp  $\times$  vanus)) (**E**). Glükoosi stimuleeritud vere insuliinitaset (näidatud baastaseme suhtes) mõõdeti 30 minutit pärast glükoosi manustamist. *Wfs1-ex5-KO232* rottidel esinevad alates 3. elukuust insuliini sekretsioonis häired (**F**); ##  $p < 0,01$  samas vanuses genotüüpide vahel, \*  $p < 0,05$  ja \*\*  $p < 0,01$  samas vanuses genotüüpide vahel (vs. baastase),  $n = 6-8$ .

### 2.3.7 Insuliinitundlikkus

Inimese insuliini manustamine (1U/kg, s.c.) vähendas vere glükoositaset nii 3 kuu (Joonis 9A;  $F(5, 55) = 82,73, p < 0,001$  (insuliini manustamine)) kui 11 kuu vanustel rottidel (Joonis 9B;  $F(5, 55) = 25,47, p < 0,001$  (insuliini manustamine)). Olenemata katseloomade vanusest, ei esinenud *Wfs1*-ex5-KO232 ja WT-rottidel insuliinitundlikkuses erinevusi (Joonis 9A ja 9B).



**Joonis 9. WT ja *Wfs1*-ex5-KO232 rottide insuliinitundlikkus on sarnane.** Insuliinitolerantsi testi (ITT) tarvis manustati rottidele inimese insuliini (1U/kg, s.c.), misjärel mõõdeti vere glükoositaset. 3 kuu (A) ja 11 kuu vanustel (B) rottidel ei esinenud insuliinitundlikkuses genotüüpidevahelisi erinevusi; ( $F(1, 55) = 2,77, p = 0,12$  (genotüüp, 3-kuud vana); ( $F(1, 55) = 0,03, p = 0,86$  (genotüüp, 11 kuud vana)); \*  $p < 0,05$  ja \*\*  $p < 0,01$  genotüüpide vahel (vs. baastase),  $n = 6$ .

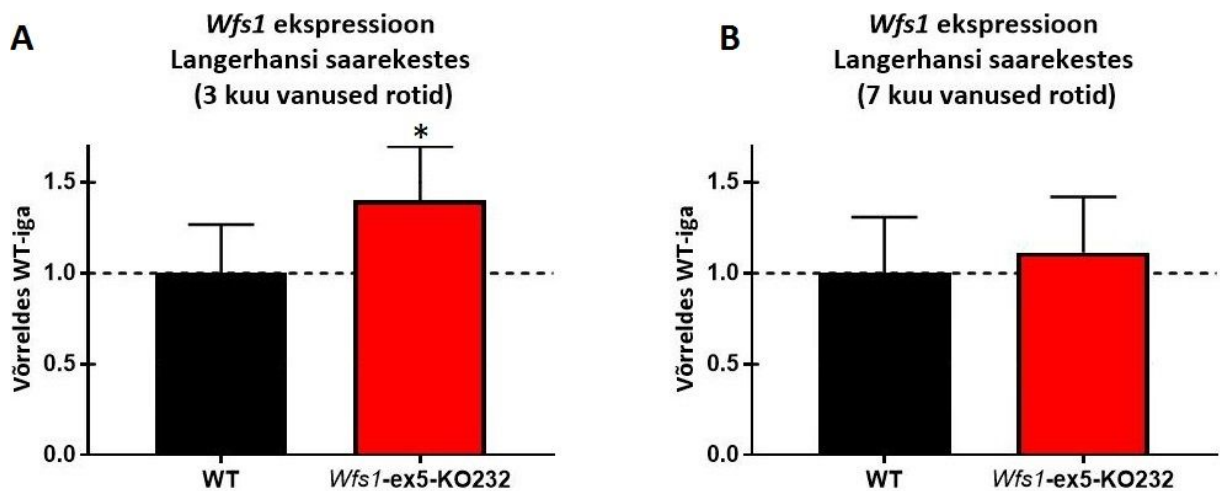
### 2.3.8 Langerhansi saarekeste geeniekspressioon

3 ja 7 kuu vanuste rottide Langerhansi saarekestes võrreldi kvantitatiivse reaallaja PCR-i (qRT-PCR) meetodil *Wfs1* ja *Hspa5* geeniekspressiooni (referentsina kasutati *Hprt1*) ning PCR-i abil splaissitud *Xbp1* (*Xbp1 S*) osakaalu kogu *Xbp1*-st.

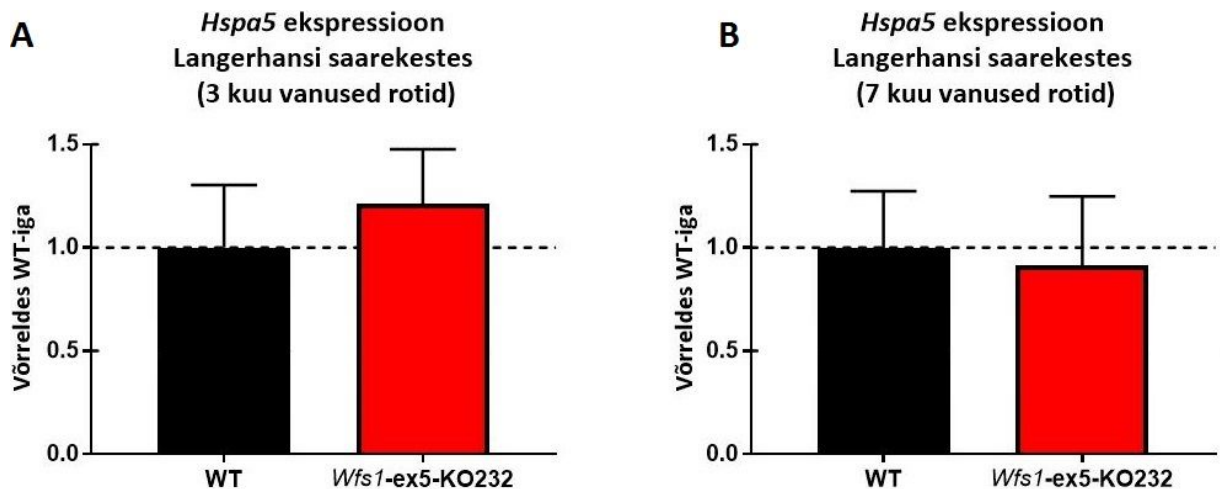
*Wfs1* geeniekspressioon oli 3-kuulistel (Joonis 10A) *Wfs1*-ex5-KO232 rottidel võrreldes WT-rottidega kõrgem, samas kui 7-kuulistel (Joonis 10B) KO- ja WT-rottidel *Wfs1* ekspressioonis genotüüpidevaheline erinevus puudus.

*Hspa5* ekspressioonitasemes ei olnud 3-kuulistel (Joonis 11A) ja 7-kuulistel (Joonis 11B) WT- ja KO-rottidel genotüüpidevahelist erinevust.

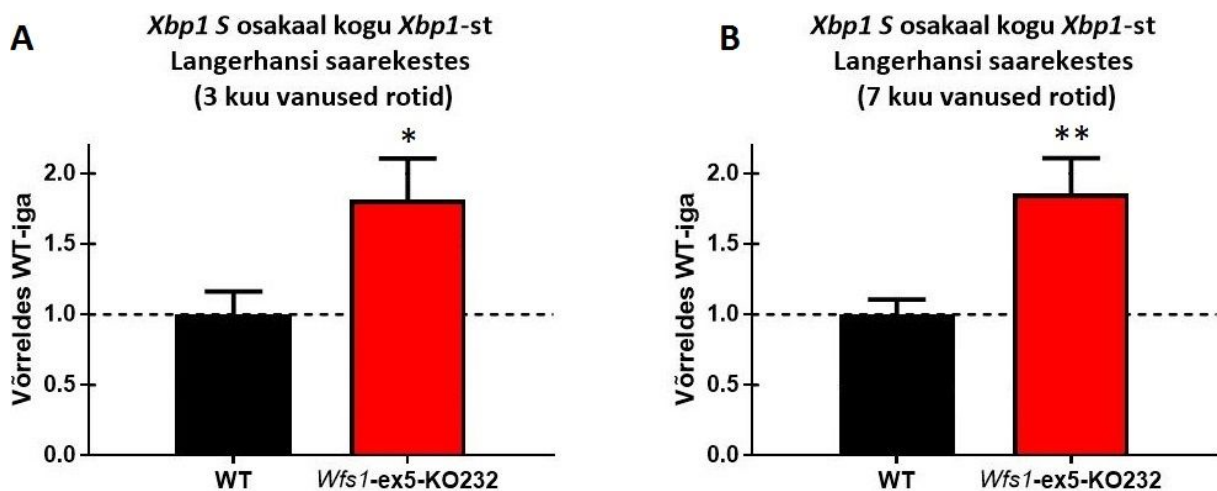
*Xbp1 S* osakaal kogu *Xbp1*-st oli 3 kuu vanustel *Wfs1*-ex5-KO232 rottidel võrreldes oma WT-pesakaaslastega kõrgem (Joonis 12A). 7. elukuuks tõusis KO-rottidel võrreldes metsiktüüpi rottidega *Xbp1 S* osakaal kogu *Xbp1*-st veelgi (Joonis 12B).



Joonis 10. 3- ja 7-kuuliste metsiktüüpi ja *Wfs1*-ex5-KO232 rottide Langerhansi saarekestes *Wfs1* geeniekspressiooni võrdlus. 3-kuulistel (A) *Wfs1*-puudulikel rottidel oli pankrease saarekestes *Wfs1* geeniekspressioon kõrgem kui WT-pesakaaslastel; ( $F(1, 8) = 0,64$ ,  $p = 0,013$  (genotüüp)). 7 kuu vanustel (B) rottidel *Wfs1* geeniekspressioonis genotüüpidevahelisi erinevusi polnud; ( $F(1, 0,5) = 0,05$ ,  $p = 0,49$  (genotüüp)); \*  $p < 0,02$  samas vanuses genotüüpide vahel (vs. metsiktüüp),  $n = 7-8$ .



Joonis 11. 3- ja 7-kuuliste metsiktüüpi ja *Wfs1*-ex5-KO232 rottide Langerhansi saarekestes *Hspa5* geeniekspressiooni võrdlus. 3 kuud vanade (A) WT ja *Wfs1*-ex5-KO232 rottide *Hspa5* ekspressioon oli sarnane; ( $F(1, 2) = 0,18$ ,  $p = 0,16$  (genotüüp)). Ka 7 kuud vanade (B) rottide *Hspa5* geeniekspressioonis polnud genotüüpidevahelisi erinevusi; ( $F(1, 0,3) = 0,03$ ,  $p = 0,61$  (genotüüp)),  $n = 7-8$ .



Joonis 12. 3- ja 7-kuuliste *Wfs1*-puudulike ja metsiktüüpi rottide Langerhansi saarekeste *Xbp1 S* osakaal kogu *Xbp1*-st. 3-kuulistel (A) *Wfs1*-puudulikel rottidel oli pankrease saarekestes *Xbp1 S* osakaal kogu *Xbp1*-st tunduvalt kõrgem kui WT-rottidel; (F (1, 6) = 2,46,  $p = 0,03$  (genotüüp)). 7. elukuuks (B) tõusis KO-rottide *Xbp1 S* osakaal võrreldes kogu *Xbp1*-ga veel ning erinevus WT-rottide *Xbp1 S* osakaalude suhtega kasvas; (F (1, 11) = 2,01,  $p = 0,01$  (genotüüp)); \*  $p < 0,03$  ja \*\*  $p < 0,01$  samas vanuses genotüüpide vahel (vs. metsiktüüp),  $n = 5-8$ .

## 2.4 Arutelu

Wolframi sündroomi esimesed sümptomid on insuliinist sõltuv suhkurdiabeet ja optilise närvu atroofia (Strom jt., 1998; Rendtorff jt., 2011). Varasemalt kolme erineva töögrupi loodud *Wfs1*-puudulikel transgeensetel hiirtel esinevad insuliini sekretsiooni häired ja probleemid oma veresuhkru taseme kontrollimisega. Kuna nimetatud hiiremudelitel pole seni näidatud insuliinist sõltuva suhkurdiabeedi väljakujunemist, erineb *Wfs1*-puudulike hiirte WS-i patoloogia oluliselt inimese WS-i seisundist (Ishihara jt., 2004; Riggs jt., 2005; Luuk jt., 2009).

Seetõttu disainisid Tartu Ülikooli teadlased *Wfs1*-puuduliku roti, eeldades, et rotil võiks erinevalt *Wfs1*-hiirtest tekkida WS-i patsientidega sarnasemad sümptomid. Selline mudel võimaldaks paremini uurida *WFS1* funktsioone ja testida potentsiaalseid WS-i vastaseid ravimeid.

Käesolevas töös uuriti uue *Wfs1*-mutantse *Wfs1*-ex5-KO232 roti suhkurdiabeedi fenotüüpi, lootes, et lisaks teistele WS-i sümptomitele kujuneb *Wfs1*-puudulikul rotil elu jooksul välja insuliinist sõltuv suhkurdiabeet (Plaas jt., avaldamisel).

Leiti, et 1–2 kuud vanad *Wfs1*-puudulikud isased rotid erinesid metsiktüüpi pesakonnakaaslastest ainult veidi kergema kehakaalu poolest (Joonis 4). Võrreldes WT-hiirtega on madalamat kehakaalu täheldatud ka *Wfs1*-puudulikel transgeensetel hiirtel (Luuk jt., 2009; Noormets jt., 2011; Terasmaa jt., 2011; Punapart jt., 2014). Ühe kuu vanuste rottidega läbi viidud intraperitoneaalne glükoosi tolerantsi test ei näidanud genotüüpidevahelisi erinevusi ei veresuhkru- (Joonis 8A) ega ka vereseerumi insuliinitasemes, nii enne kui ka peale glükoosi 2g/kg i.p manustamist (Joonis 8F). Tõenäoliselt on noortel rottidel ülikiire verest glükoosi omastamine ning 30 minuti ajapunkt on liiga hiline hindamaks muutusi nende vere glükoosi- ja insuliinitasemetes, mis 30 minuti peal on juba stabiliseerunud. See näitab, et *Wfs1*-i ei ole insuliini sekretsiooniks vaja ning hiljem tekkiv insuliini sekretsiooni häire võib olla põhjustatud hoopis *Wfs1*-puudulikkusest tingitud endoplasmaatilise retiikulumi stressist.

Intraperitoneaalse glükoosi tolerantsi testi abil näidati, et alates kolmandast elukuust tekib *Wfs1*-puudulikel rottidel glükoositalumatus ja häired insuliini sekretsioonis, mis vananedes süvenevad (Joonised 8C, 8D, 8F). Sarnast fenotüüpi on näidatud ka *Wfs1*-puudulikel

transgeensetel hiirtel (Ishihara jt., 2004; Riggs jt., 2005; Luuk jt., 2009). Neid sümptomeid võib põhjustada *Wfs1*-puudulikkusest tingitud progresseeruv pankrease beeta-rakkude ER-i stress, millega kaasnevad beeta-rakkude proliferatsiooni häired ja beeta-rakkude apoptoos.

Varem on näidatud, et nii WS-i patsientidel kui ka *Wfs1*-puudulikel hiirtel põhjustab pankrease beeta-rakkude massi vähenemist ER-i stress (Karasik jt., 1989; Riggs jt., 2005). Kontrollimaks võimaliku ER-i stressi olemasolu *Wfs1*-mutantsete rottide beeta-rakkudes, analüüsiti 3 ja 7 kuud vanade rottide pankrease Langerhansi saarekestes erinevate ER-i stressimarkerite geeniekspressiooni. Kolme kuu vanustel *Wfs1*-puudulikel rottidel on *Wfs1* geeniekspressioon tunduvalt kõrgem kui WT-pesakaaslastel (Joonis 10A). Arvatakse, et *Wfs1* võtab osa beeta-rakkude ER-is toimuvast proinsuliini voltimisest ja töötlemisest (Fonseca jt., 2010b) ning üha suurenev nõudlus insuliini järele võib seetõttu tõsta *Wfs1* ekspressioonitaset. Samuti on *Wfs1* oluline pankrease beeta-rakkude ER-i stressivastuses, milles on *Wfs1*-il oluline roll ER-i homöostaasi taastamises (Fonseca jt., 2010). Seega võib *Wfs1*-mutantsete rottide pankrease beeta-rakkude kõrgem *Wfs1* ekspressioonitase olla üheks esmaseks ER-i stressimarkeriks, mis 7-kuulistel rottidel enam ei avadu (Joonis 10B). Tõenäoliselt on selleks ajaks käivitatud juba muud ER-i stressirajad.

Selle kontrollimiseks analüüsiti nii 3 kui ka 7 kuu vanuste rottide pankrease saarekestest *Xbp1 S* ja *Hspa5* geeniekspressiooni (Joonis 11 ja Joonis 12). Selgus, et *Wfs1*-puudulikel rottidel on pea kaks korda kõrgem ER-i stressimarkeri *Xbp1 S* tase, võrreldes sama vanade metsiktüüpi pesakaaslastega. Kõrgenenud *Xbp1 S* ekspressiooni on ka varem näidatud *Wfs1*-puudulike hiirte pankrease saarekestes (Yamada jt., 2006). *Xbp1* splaissitakse vastusena ER-i stressile ning aktiivne *Xbp1 S* aitab kaasa ER-i voltumata valkude vastuse initsieerimisele (Lee jt., 2003). On näidatud, et *WFS1* on UPR-i komponent (Fonseca jt., 2010a) ning arvatakse, et *WFS1* võib osa võtta ka proinsuliini voltimisest (Fonseca jt., 2010b). Tõenäoliselt tekitab *Wfs1*-puudulikkus nõndanimetatud "surnud ringi efekti", kus kasvav organism vajab üha rohkem funktsionaalset insuliini, kuid *Wfs1*-mutantsed beeta-rakud ei suuda organismi vajadusi täita ja piisavalt proinsuliini insuliiniks konverteerida. Püsivalt kõrge veresuhkru tase on beeta-rakkudele signaaliks toota ja sekreteerida rohkem insuliini, mis omakorda süvendab *Wfs1*-puudulikes rakkudes ER-i stressi ja UPR-i vastust, viies rakud kiiremini apoptoosi.

Huvitaval kombel ei olnud 3 ja 7 kuud vanade rottide Langerhansi saarekestes *Hspa5* geeniekspressioonis genotüüpidevahelisi erinevusi (Joonis 11). Tõenäoliselt tuleks edaspidi

uurida ka *Hspa5* ekspressioonitaset valgu kujul, kuna mRNA ja transleeritud valgu hulk ei pruugi alati omavahel korreleeruda.

Kuuendaks elukuuks on *Wfs1*-mutantsete rottide vereseerumi insuliini baastase ligikaudu kaks korda madalam kui pesakaaslastel (Joonis 6) ning alates 10. elukuust tekib *Wfs1*-puudulikel rottidel glükosuuria (Joonis 7). Madalamat insuliini baastaset ja glükosuuria kujunemist on märganud ka *Wfs1*-puudulikel hiirtel (Noormets jt., 2011; Terasmaa jt., 2011). 6-kuuliste *Wfs1*-rottide insuliini baastaseme languses mängib arvatavasti rolli ER-i stressist tingitud pankrease beeta-rakkude massi vähenemine, mistõttu väheneb beeta-rakkude poolt toodetav insuliini hulk. Seetõttu ei suuda vanad *Wfs1*-puudulikud rotid oma vere glükoositaset kontrollida ning üleliigset glükoosi üritatakse organismist välja viia renalse väljutamise teel.

Samaaegselt glükosuuria arenguga hakkab 10 kuu vanuselt *Wfs1*-mutantsete rottide kehakaal järsult langema, samas kui WT-rottide kehakaal tõuseb edasi (Joonis 4). Huvitaval kombel ei teki vanadel *Wfs1*-mutantsetel hiirtel järsku kehakaalu langust ning kehakaal püsib läbi elu stabiilsena (Punapart jt., 2014). Diabeetne fenotüüp tipneb isastel *Wfs1*-mutantsetel rottidel keskeltläbi 11–13. elukuul avalduva insuliinist sõltuva suhkurdiabeedi tekkega (Joonis 5). 13 kuu vanustel *Wfs1*-mutantsetel rottidel on kodupuurist mõõdetud veresuhkru baastase üle 20 mM (Joonis 5), samas kui metsiktüüpi kontroll-loomade veresuhkur on normaaltasemel. Et kontrollida võimalikku insuliiniresistentsust, viidi läbi insuliini tolerantsuse test. Leidsime, et nii noortel kui ka vanadel *Wfs1*-puudulikel rottidel on säilinud insuliinitundlikkus (Joonis 9A ja 9B). Sama on tähendatud ka *Wfs1*-puudulikel hiirtel, kellel ei kujune elu jooksul välja insuliiniresistentsust (Terasmaa jt., 2011). Seega ei mõjuta *Wfs1*-puudulikkus kudede insuliini tundlikkust.

Võib oletada, et rottidel tekkiva insuliinist sõltuva suhkurdiabeedi taga on fakt, et rott on inimesele evolutsiooniliselt lähemal kui hiir ning seetõttu võib rottide WS-i kulg olla võrreldes hiirega raskekujulisem ja inimestel esineva WS-iga sarnasem. Samas võib isaste *Wfs1*-puudulike rottide insuliinist sõltuva suhkurdiabeedi väljakujunemist põhjustada nende kasvukõver. Nimelt tõuseb *Sprague Dawley* liini isaste rottide kehakaal kogu elu vältel suhteliselt stabiilselt (Marques jt., 2016), kuid hiirte kasv pidurdub umbes 16. elunädalal (Punapart jt., 2014). Pidevalt suurenev kehakaal tõstab pankrease beeta-rakkude insuliini

tootmise koormust (Ding jt., 2013), mis koosmõjul *Wfs1*-puudulikkusega võib suurendada beeta-rakkude ER-i stressi ja kiirendada rakkude apoptoosi.

Humaanmeditsiinis levinud praktika järgi diagnoositakse Wolframi sündroom nendel patsientidel, kellel avalduvad koos juveniilne suhkurdiabeet ja nägemisnärv kahjustus või nägemise häire. Praegu puudub selge arusaam *WFS1* geeni funktsioonist ja WS-i ei osata ravida. Erinevate WS-i vastaste ravimite või raviteraapiate prekliiniliseks testimiseks on vaja valiidselt, WS-i põhisümptomitega loomudelit. Seni ei ole mitte ühelgi *Wfs1*-puudulikul transgeensel hiirel kirjeldatud insuliinist sõltuva suhkurdiabeedi teket. Seda enam, on näidatud, et *Wfs1*-mutantsed hiired on resistentsed streptosototsiini indutseeritud pankrease beeta-rakkude surmale, mistõttu ei saa *Wfs1*-puudulikes hiirtes esile kutsuda insuliinist sõltuvat suhkurdiabeeti (Terasmaa jt., 2011). See viitab, et WS-i patsientide kliinilise seisundi imiteerimiseks on vaja paremat loomudelit, kellel areneks välja insuliinist sõltuv suhkurdiabeet.

Käesolevas töös näidati, et *Wfs1*-puudulikul rotil areneb 11-13 kuu vanuselt välja insuliinist sõltuv suhkurdiabeet (Joonis 5) ning nende pankrease Langerhansi saarte beeta-rakkudes on kõrgeenenud ER-i stressitase, mis võib viia beeta-rakud apoptoosi (Joonis 12A ja 12B). On selge, et võrreldes erievate *Wfs1*-mutantse hiirega on *Wfs1*-ex5-KO232 puudulikul rotil avalduv WS-i diabeetne fenotüüp oluliselt sarnasem inimese WS-i diabeetse fenotüübiga. Seega, võib *Wfs1*-ex5-KO232 rott osutada uueks ja paremaks loomudeliks WS-i uurimiseks ning WS-i vastaste ravimeetodite väljatöötamiseks. Loodetavasti annab *Wfs1*-ex5-KO232 rott uut teavet *Wfs1* geeni funktsiooni kohta ja võimaldab lõpuks leida WS-i vastase ravi.

## KOKKUVÖTE

Wolframi sündroom (WS) on kiirelt arenev progressiivne neurodegeneratiivne haigus, mille põhisümptomid on suhkurdiabeet, magediabeet, nägemisnärv atroofia ja sensorineuraalne kurtus. WS-i põhjustavad mutatsioonid *WFS1* geenis, mis kodeerib endoplasmaatilise retiikulumi (ER) membraanis paiknevat glükoproteiini wolframiin 1. Wolframiin 1 osaleb ER-i stressi vastuses, valkude post-translatsioonilises modifitseerimises ja pakkimises ning kaltsiumitaseme regulatsioonis. Lisaks on näidatud *WFS1* rolli insuliini biosünteesis ja sekretsioonis.

Selleks, et uurida *WFS1* geeni funktsioone, Wolframi sündroomi ja võimalikke WS-i vastaseid raviteraapiaid, on praegu eri laborites konstrueeritud kolm transgeenset *Wfs1*-puudulikku hiiremudelit. Kuigi neil hiirtel kujuneb elu jooksul välja glükoositalumatus ning väheneb glükoosi stimuleeritud insuliini sekretsioon, pole seni selgeid suhkurdiabeedi tekke viiteid. Seetõttu konstrueerisid Tartu Ülikooli teadlased *Wfs1*-mutantse roti. Käesolevas töös uuriti nimetatud *Wfs1*-puudulikkusega roti (*Wfs1*-ex-KO232) suhkurdiabeedi fenotüüpi.

Leiti, et uuritud isastel *Wfs1*-puudulikel *Wfs1*-ex5-KO232 rottidel tekib progresseeruv insuliinist sõltuv suhkurdiabeet. 3. elukuul vähenes *Wfs1*-puudulikel rottidel glükoosi stimuleeritud insuliini sekretsioon ja tekkis progresseeruv glükoositalumatus. Võrreldes oma WT-pesakaaslastega oli nii 3 kui ka 7 kuud vanade *Wfs1*-puudulike rottide Langerhansi saarekestes ER-stressimarkeri *Xbp1* S osakaal võrreldes *Xbp1*-ga kõrgem. 10. elukuuks kujunes *Wfs1*-mutantsetel rottidel välja glükosuuria ning nende kehakaal hakkas langema. 11–13 kuu vanustel KO-rottidel tekkis hüperglükeemia ning insuliinist sõltuv suhkurdiabeet. 13. elukuuks oli *Wfs1*-ex5-KO232 rottide paastujärgne glükoositase üle 20 mM ja neil esines polüuuria.

Võrreldes *Wfs1*-mutantsete hiiremudelitega on *Wfs1*-ex5-KO232 rottidel tekkivad diabeedi sümptomid sarnasemad WS-i patsientidel kujunevate haigusnähtudega. Seega on nüüd olemas uus Wolframi sündroomi mudel, mille abil WS-i etioloogiat uurida ja võimalikke WS-i vastaseid raviteraapiaid välja arendada.

## The diabetic phenotype of *Wfs1*-deficient rat

Tuuliki Koppel

### SUMMARY

Wolfram syndrome (WS) is a rare autosomal recessive neurodegenerative disorder caused by mutations in the *WFS1* gene (Barrett jt., 1995). The common manifestations of WS are *diabetes insipidus*, juvenile-onset *diabetes mellitus*, optic atrophy and deafness, hence the acronym DIDMOAD (Swift jt., 1990; Barrett jt., 1995).

*WFS1* gene encodes wolframin 1 protein, that resides in the endoplasmic reticulum (ER) membrane (Takeda jt., 2001) and participates in the ER-stress response regulation, protein processing and ER calcium homeostasis (Hofmann jt., 2003). Some data suggests that *WFS1* might be an important component of proinsulin folding and processing in the ER of the pancreatic beta-cell (Fonseca jt., 2010b) and that wolframin 1 plays a role in insulin secretion from insulin-containing granules (Henquin, 2000). Mutant forms of *WFS1* predispose insulin-producing beta-cells to ER stress-mediated apoptosis (Ishihara jt., 2004; Yamada jt., 2006; Akiyama jt., 2009).

In order to study different functions of *WFS1* and Wolfram syndrome, as well as to develop potential therapeutic approaches against WS, three different *Wfs1*-deficient mouse models have been developed in different laboratories (Ishihara jt., 2004; Riggs jt., 2005; Luuk jt., 2009). Mice with disrupted *Wfs1* function show increased pancreatic beta-cell death, impaired glucose-stimulated insulin secretion, progressive glucose intolerance and lower insulin levels than their wild-type (WT) littermates (Ishihara jt., 2004; Riggs jt., 2005; Luuk jt., 2009; Noormets jt., 2011; Terasmaa jt., 2011). However, to the best of our knowledge, none of those *Wfs1*-mutant mice show development of *diabetes mellitus*. Therefore the scientists of University of Tartu constructed a *Wfs1*-deficient rat (Plaas jt., avaldamisel).

In the current thesis we studied the diabetic phenotype of novel *Wfs1*-mutant rat (*Wfs1*-ex5-KO232).

We found that *Wfs1*-ex5-KO23 (KO) rats were lighter than their wild-type littermates between the ages of 4 to 10 months. After that KO rats began to lose weight, while WT rats continued to grow.

In order to measure blood glucose and insulin levels rats were food deprived for 2 hours, thereafter blood samples were drawn from their tail vein. Blood glucose levels were indistinguishable between WT and KO rats up to the age of 11 months, after that *Wfs1*-ex5-KO232 developed hyperglycemia and insulin-dependent *diabetes mellitus*. At the age of 13 months blood glucose levels were above 20 mM.

Urine samples were collected from non-fasted rats. There were no differences in urine glucose levels between genotypes up to the age of 10 months, from there on *Wfs1*-ex5-KO232 rats developed glycosuria.

For the intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT) rats were fasted for 2 hours. Thereafter basal glucose levels were measured and glucose administered (2g/kg, i.p.), following measurement of blood glucose levels at 30, 60, 90, 120 and 180 minutes. Glucose tolerance was similar for WT and KO rats at 1 and 2 months of age. At the age of 3 months KO rats showed first signs of glucose intolerance compared to WT littermates. Glucose intolerance of KO rats increased by the age of 6 months.

In order to analyse glucose-stimulated insulin secretion, blood samples were collected right before and 30 minutes after glucose administration (2g/kg, i.p.) in IPGTT test. Glucose administration increased blood insulin levels of 2 to 11 months old WT rats, while only 2 months old *Wfs1*-ex5-KO232 rats showed raised insulin levels. This implies that starting from 3 months of age KO rats develop defect in glucose-stimulated insulin secretion.

Insulin tolerance test (ITT) was conducted similarly to IPGTT, only human insulin was administered (1U/kg, s.c.) before measuring blood glucose levels. There were no differences between WT and KO blood insulin levels and human insulin reduced blood glucose levels in both 3 and 11 months old rats. This demonstrates that *Wfs1*-deficient rats do not develop insulin resistance.

Analysing the gene expression in the islets of Langerhans of 3 and 7 months old rats revealed, that *Wfs1*-deficient rats had a higher ratio of ER-stress marker *Xbp1 S* level to *Xbp1*

level than their WT-littermates. This implies that *Wfs1*-deficient rats have developed ER-stress in pancreatic beta-cells.

In conclusion, *Wfs1*-deficient rat develops one of the main symptoms of Wolfram syndrome insulin-dependent *diabetes mellitus* and mimics human pathology of this disease. This makes *Wfs1*-ex5-KO232 rat a valuable model to study underlying mechanisms of WS as well as to help develop potential therapies for WS.

## **TÄNUSÕNAD**

Täna oma juhendajaid prof Eero Vasarat ja Martin Kärnerit. Olen palju tänu võlgu oma juhendajatele Mario Plaasile ja Maarja Tootsile, kelle igakülgne abi, toetus ja head nõuanded olid käesoleva töö valmimisel asendamatud.

Täna ka Tartu Ülikooli bio- ja siirdemeditiini katseloomakeskuse ja füsioloogia osakonna toredaid töötajaid.

Suurim tänu minu perekonnale ja lähedastele, kes on mind alati toetanud.

## KASUTATUD KIRJANDUS

Akiyama, M., Hatanaka, M., Ohta, Y., ... , Tanizawa, Y. (2009). Increased insulin demand promotes while pioglitazone prevents pancreatic beta cell apoptosis in Wfs1 knockout mice. *Diabetologia*. 52: 653–663.

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

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

Butler, A. E., Janson, J., Bonner-Weir, S., Ritzel, R., Rizza, R. A., Butler, P. C. (2003). Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes*. 52: 102–110.

Cagalinec, M., Liiv, M., Hodurova, Z., ... , Kaasik, A. (2016). Role of mitochondrial dynamics in neuronal development: Mechanism for Wolfram Syndrome. *PLOS Biology*. 14: e1002511.

Ding, Y., Zhang, Z., Dai, X., Jiang, Y., Bao, L., Li, Y., Li, Y. (2013). Grape seed proanthocyanidins ameliorate pancreatic beta-cell dysfunction and death in low-dose streptozotocin- and high-carbohydrate/high-fat diet-induced diabetic rats partially by regulating endoplasmic reticulum stress. *Nutr. Metab.* 10: 51.

Donath, M. Y., Halban, P. A. (2004). Decreased beta-cell mass in diabetes: significance, mechanisms and therapeutic implications. *Diabetologia*. 47: 581–589.

Fenske, W., Allolio, B. (2012). Clinical review: Current state and future perspectives in the diagnosis of *diabetes insipidus*: A clinical review. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97: 3426–3437.

Fonseca, S. G., Fukuma, M., Lipson, K. L., Nguyen, L. X., Allen, J. R., Oka, Y., Urano, F. (2005) WFS1 is a novel component of the unfolded protein response and maintains homeostasis of the endoplasmic reticulum in pancreatic beta-cells. *J. Biol. Chem.* 280: 39609–39615.

Fonseca, S. G., Ishigaki, S., Osowski, C. M., ..., Urano, F. (2010a). Wolfram syndrome 1 gene negatively regulates ER stress signaling in rodent and human cells. *The Journal of Clinical Investigation*. 120: 744–755.

- Fonseca, S. G., Urano, F., Burcin, M., Gromada, J. (2010b). Stress hyperactivation in the beta cell. *Islets*. 2: 1–9.
- Fu, Z., Gilbert, E. R., Liu, D. (2013). Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic beta-cell dysfunction in diabetes. 9: 25–53.
- Graves, T. K., Hinkle, P. M. (2003). Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release in the pancreatic  $\beta$ -cell: Direct evidence of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release. *Endocrinology*. 144: 3565–3574.
- Hara, T., Mahadevan, J., Kanekura, K., Hara, M., Lu, S., Urano, F. (2014). Calcium efflux from the endoplasmic reticulum leads to beta-cell death. *Endocrinology*. 155: 758–768.
- Hatanaka, M., Tanabe, K., Yanai, A., Ohta, Y., Kondo, M., Akiyama, M., Shinoda, K., Oka, Y., Tanizawa, Y. (2011) Wolfram syndrome 1 gene (WFS1) product localizes to secretory granules and determines granule acidification in pancreatic beta-cells. *Hum. Mol. Genet.* 20: 1274–1284.
- Henquin, J. C. (2000). Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. 49: 1751–1760.
- Hofmann, S., Philbrook, C., Gerbitz, K. D., Bauer, M. F. (2003). Wolfram syndrome: Structural and functional analyses of mutant and wild-type wolframin, the WFS1 gene product. *Hum. Mol. Genet.* 12: 2003–2012.
- Inoue, H., Tanizawa, Y., Wasson, J., ..., Permutt, M. A. (1998). A gene encoding a transmembrane protein is mutated in patients with *diabetes mellitus* and optic atrophy (Wolfram syndrome). *Nat. Genet.* 20: 143–148.
- Ishihara, H., Takeda, S., Tamura, A., ..., Oka, Y. (2004). Disruption of the WFS1 gene in mice causes progressive beta-cell loss and impaired stimulus-secretion coupling in insulin secretion. *Hum. Mol. Genet.* 13: 1159–1170.
- Kang, G., Holz, G. G. (2003). Amplification of exocytosis by Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release in INS-1 pancreatic  $\beta$  cells. *J. Physiol.* 546: 175–189.
- Karasik, A., O'Hara, C., Srikanta, S., Swift, M., Soeldner, J. S., Kahn, C. R., Herskowitz, R. D. (1989). Genetically programmed selective islet beta-cell loss in diabetic subjects with Wolfram's syndrome. *Diabetes Care*. 12: 135–138.

- Kesner, Y., Zohar, J., Merenlender, A., Gispan, I., Shalit, F., Yadid, G. (2009). WFS1 gene as a putative biomarker for development of post-traumatic syndrome in an animal model. *Molecular Psychiatry*. 14: 86–94.
- Kinsley, B. T., Swift, M., Dumont, R. H., Swift, R. G. (1995). Morbidity and mortality in the Wolfram syndrome. *Diabetes Care*. 18: 1566–1570.
- Koido, K., Kõks, S., Nikopensius, T., ..., Vasar, E. (2005). Polymorphisms in wolframin (WFS1) gene are possibly related to increased risk for mood disorders. *Int. J. Neuropsychopharmacol*. 8: 235–244.
- Komatsu, M., Takei, M., Ishii, H., Sato, Y. (2013). Glucose-stimulated insulin secretion: A newer perspective. *J. Diabetes Investig*. 4: 511–516.
- Lee, A. H., Iwakoshi, N. N., Glimcher, L. H. (2003). XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol. Cell. Biol*. 23: 7448–7459.
- Lipson, K. L., Fonseca, S. G., Urano, F. (2006). Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and auto-immunity in diabetes. *Curr. Mol. Med*. 6: 71–77.
- Lu, S., Kanekura, K., Hara, T., ... , Urano, F. (2014). A calcium-dependent protease as a potential therapeutic target for Wolfram syndrome. *PNAS*. 111: E5292–E5301.
- Luuk, H. (2009). *Wfs1* valgu levik kesknärvisüsteemis ja selle mõju käitumisele. Doktoritöö. Tartu Ülikooli Kirjastus.
- Luuk, H., Kõks, S., Plaas, M., Hannibal, J., Rehfeld, J. F., Vasar, E. (2008). Distribution of *Wfs1* protein in the central nervous system of the mouse and its relation to clinical symptoms of the Wolfram syndrome. *J. Comp. Neurol*. 509: 642–660.
- Luuk, H., Plaas, M., Raud, S., Innos, J., Sütt, S., Lasner, H., Abramov, U., Kurrikoff, K., Kõks, S., Vasar, E. (2009). *Wfs1*-deficient mice display impaired behavioural adaptation in stressful environment. *Behav. Brain. Res*. 198: 334–345.
- Marques, C., Meireles, M., Norberto, S., Leite, J., Freitas J., Pestana, D., Faria, A., Calhau, C. (2016). High-fat diet-induced obesity Rat model: A comparison between Wistar and Sprague-Dawley Rat. *Adipocyte*. 5: 11–21.

- Matto, V., Terasmaa, A., Vasar, E., Kõks, S. (2011). Impaired striatal dopamine output of homozygous *Wfs1* mutant mice in response to [K<sup>+</sup>] challenge. *J. Physiol. Biochem.* 67: 53–60.
- Meloni, A. R., DeYoung, M. B., Lowe, C., Parkes, D. G. (2013). GLP-1 receptor activated insulin secretion from pancreatic  $\beta$ -cells: Mechanism and glucose dependence. *Diabetes, Obesity and Metabolism.* 15: 15–27.
- Nakagaki, I., Sasaki, S., Hori, S., Kondo, H. (2000). Ca<sup>2+</sup> and electrolyte mobilization following agonist application to the pancreatic  $\beta$  cell line HIT. *Pflugers. Arch.* 440: 828–834.
- Noormets, K., Kõks, S., Muldmaa, M., Muring, L., Vasar, E., Tillmann, V. (2011). Sex differences in the development of diabetes in mice with deleted wolframin (*Wfs1*) gene. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.* 119: 271–275.
- Osman, A. A., Saito, M., Makepeace, C., Permutt, M. A., Schlesinger, P., Mueckler, M. (2003). Wolframin expression induces novel ion channel activity in endoplasmic reticulum membranes and increases intracellular calcium. *J. Biol. Chem.* 278: 52755–52762.
- Philbrook, C., Fritz, E., Weiher, H. (2005). Expressional and functional studies of Wolframin, the gene function deficient in Wolfram syndrome, in mice and patient cells. *Exp. Gerontol.* 40: 671–678.
- Plaas, M., Seppa, K., Reimets, R., ..., Vasar, E. (avaldamisel). Development of Wolfram syndrome in a *Wfs1* mutant rat.
- Pozzan, T., Rizzuto, R., Volpe, P., Meldolesi, J. (1994). Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol. Rev.* 74: 595–636.
- Punapart, M., Eltermaa, M., Oflijan, J., ..., Terasmaa, A. (2014). Effect of chronic valproic acid treatment on hepatic gene expression profile in *Wfs1* knockout mouse. *PPAR Research.* 2014: ID 349525.
- Raud, S., Sütt, S., Luuk, H., Plaas, M., Innos, J., Kõks, S., Vasar, E. (2009). Relation between increased anxiety and reduced expression of alpha1 and alpha2 subunits of GABA(A) receptors in *Wfs1*-deficient mice. *Neurosci. Lett.* 460: 138–142.

- Rendtorff, N. D., Lodahl, M., Boulahbel, H., ..., Tranebjaerg, L. (2011). Identification of p.A684V missense mutation in the WFS1 gene as a frequent cause of autosomal dominant optic atrophy and hearing impairment. *Am. J. Med. Genet.* 155A: 1298–1313.
- 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: 2313–2321.
- Rigoli, L., Lombardo, F., Di Bella, C. (2011). Wolfram syndrome and WFS1 gene. *Clin. Genet.* 79: 103–117.
- Röder, P. V., Wu, B., Liu, Y., Han, W. (2016). Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Experimental & Molecular Medicine.* 48: e219.
- Santulli, G., Pagano, G., Sardu, C., ... , Marks, A. R. (2015). Calcium release channel RyR2 regulates insulin release and glucose homeostasis. *The Journal of Clinical Investigation.* *J. Clin. Invest.* 125: 1968–1978.
- Seo, H. Y., Kim, Y. D., Lee, K. M., ..., Lee, I. K. (2008). Endoplasmic reticulum stress-induced activation of activating transcription factor 6 decreases insulin gene expression via upregulation of orphan nuclear receptor small heterodimer partner. *Endocrinology.* 149: 3832–3841.
- Smith, C. J., Crock, P. A., King, B. R., Meldrum, C. J., Scott, R. J. (2004). Phenotype-genotype correlations in a series of Wolfram syndrome families. *Diabetes Care.* 27: 2003–2009.
- Strom, T. M., Hortnagel, K., Hofmann, S., Gekeler, F., Scharfe, C., Rabl, W., Gerbitz, K. D., Meitinger, T. (1998). *Diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy and deafness (DIDMOAD)* caused by mutations in a novel gene (wolframin) coding for a predicted transmembrane protein. *Human Molecular Genetics.* 7: 2021–2028.
- Swift, R. G., Perkins, D. O., Chase, C. L., Sadler, D. B., Swift, M. (1991). Psychiatric disorders in 36 families with Wolfram syndrome. *Am. J. Psychiatry.* 148: 775–779.
- Swift, R. G., Sadler, D. B., Swift, M. (1990). Psychiatric findings in Wolfram syndrome homozygotes. *Lancet.* 336: 667–669.

- Swift, M., Swift, R. G. (2000). Psychiatric disorders and mutations at the Wolfram syndrome locus. *Biol. Psychiatry*. 47: 787–793.
- Swift, M., Swift, R. G. (2005). Wolframin mutations and hospitalization for psychiatric illness. *Mol. Psychiatry*. 10: 799–803.
- Zatyka, M., Da Silva Xavier, G., Bellomo, E. A., Leadbeater, W., Astuti, D., Smith, J., Michelangeli, F., Rutter, G. A., Barrett, T. G. (2015). Sarco(endo)plasmic reticulum ATPase is a molecular partner of Wolfram syndrome 1 protein, which negatively regulates its expression. *Human Molecular Genetics*. 24: 814–827.
- Takeda, K., Inoue, H., Tanizawa, Y., Matsuzaki, Y., Oba, J., Watanabe, Y., Shinoda, K. ja Oka, Y. (2001). WFS1 (Wolfram syndrome 1) gene product: Predominant subcellular localization to endoplasmic reticulum in cultured cells and neuronal expression in rat brain. *Hum. Mol. Genet*. 10: 477–484.
- Terasmaa, A., Soomets, U., Oflijan, J., Punapart, M., Hansen, M., Matto, V., Ehrlich, K., Must, A., Kõks, S., Vasar, E. (2011). Wfs1 mutation makes mice sensitive to insulin-like effect of acute valproic acid and resistant to streptozocin. *J. Physiol. Biochem*. 67: 381–390.
- Urano, F. (2012). Diabetes: Targeting endoplasmatic reticulum to combat juvenile diabetes. *Nat. Rev. Endocrinol*. 10: 129–130.
- Urano, F. (2016). Wolframin syndrome: Diagnosis, Management, and treatment. *Curr. Diab. Rep*. 16: 6.
- Visnapuu, T., Plaas, M., Reimets, R., ..., Vasar, E. (2013a). Evidence for impaired function of dopaminergic system in Wfs1-deficient mice. *Behav. Brain. Res*. 244: 90–99.
- Visnapuu, T., Raud, S., Loomets, M., ..., Vasar, E. (2013b). Wfs1-deficient mice display altered function of serotonergic system and increased behavioral response to antidepressants. *Front. Neurosci*. 7: 132.
- Wiley, S. A., Andreyev, A. Y., Divakaruni, A. S., ..., Murphy, A. N. (2013). Wolfram Syndrome protein, Miner1, regulates sulphhydryl redox status, the unfolded protein response, and Ca<sup>2+</sup> homeostasis. *EMBO Mol. Med*. 5: 904–918.

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

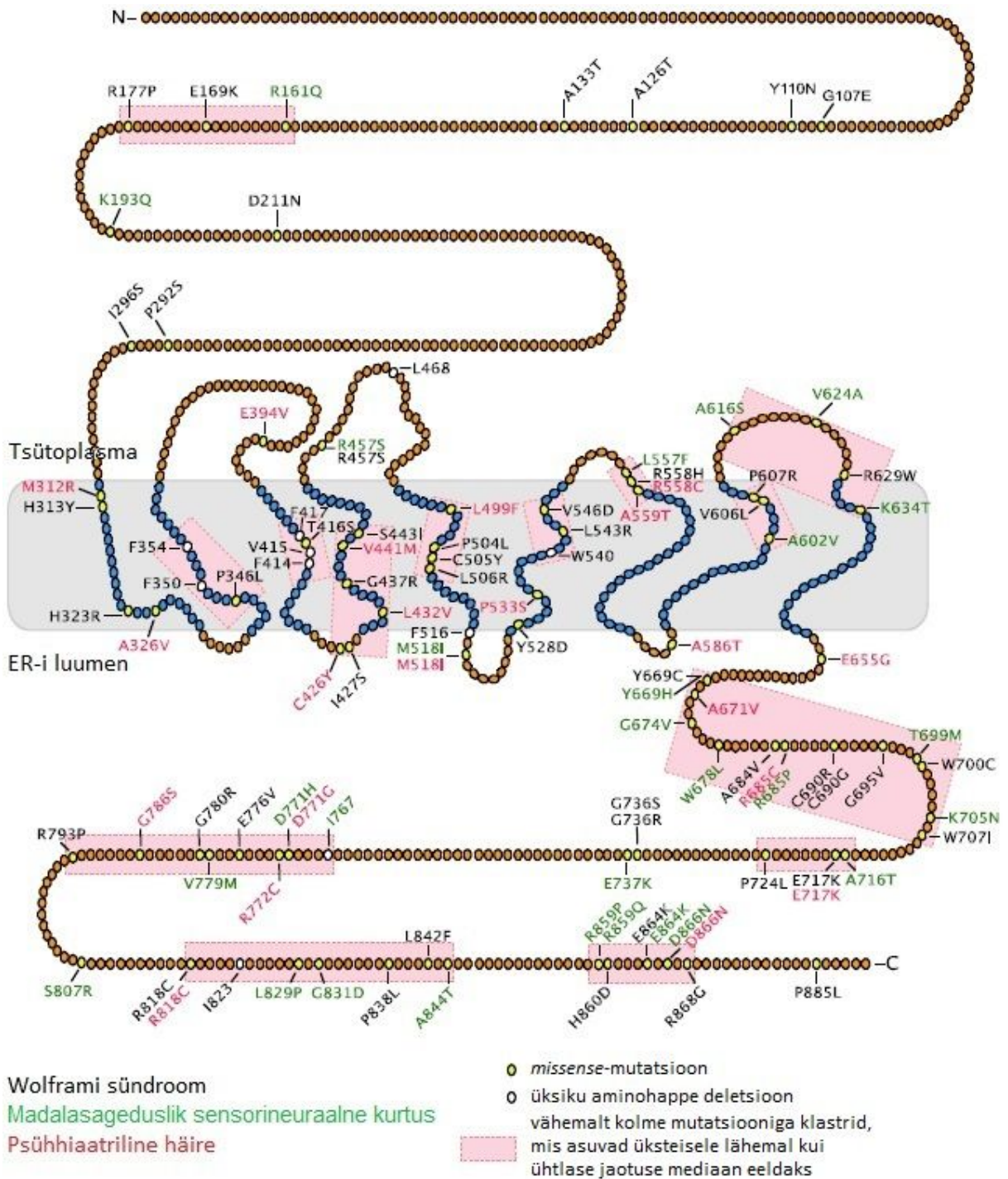
Yamada, T., Ishihara, H., Tamura, A., ..., Oka, Y. (2006). WFS1-deficiency increases endoplasmic reticulum stress, impairs cell cycle progression and triggers the apoptotic pathway specifically in pancreatic beta-cells. Hum. Mol. Genet. 15: 1600–1609.

Yusta, B., Baggio L. L., Estall J. L., Koehler, J. A., Holland, D. P., Li H., Pipeleers, D., Ling, Z., Drucker, D. J. (2006). GLP-1 receptor activation improves beta cell function and survival following induction of endoplasmic reticulum stress. Cell Metab. 4: 391–406.

## KASUTATUD VEEBILEHED

NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene/?term=wfs1>) külastatud 30.05.2017

# LISAD



**Lisa 1. Skemaatiline ülevaade Wolframi sündroomiga seotud WFS1 valgust.** WFS1 valgule on märgitud üheaminohappelisi asendusi või deletsioone põhjustavad mutatsioonid. Musta värviga kirjutatud mutatsioonid on leitud Wolframi sündroomiga patsientidelt, rohelisega madalasagedusliku sensorineuraalse kurtusega isikutelt ja punasega psühhiaatriliste häiretega inimestelt. Mutatsiooni viitel märgib esimene täht algset aminohapet, järgnev number näitab selle asukohta WFS1 valgu primaarjärjestuses ning viimane täht näitab muteerunud vormi. Deletsioonide korral viimane täht puudub (kohandatud; Luuk, 2009).

A.

AGAAGTGGCTACCCAGGGATATGACCCTTGCATATGATGAGACCCCAAGCCCTGTGATCCCTGCGAA  
CAGTGATAACCCAGGATCCCGAGCTCCTATACCCAGTGGGCTACAGGGCAGGACGACTCAGCAGCCCT  
GGCTTCCAATCCTCTCTGATCTTACAGATGGAGGGGCGCAGCCAGGCCCGTCCCCAAGTCcctgcaGAA  
GCAGAGGGCGCATGCTGGAGCGTCTAGTGAGCAGTGAATGTGAGTATGTCCACCCTGTGAGTATGTCCA  
CCCTGCGCTGCAGTCTGCTACCTGCTTCCCGCACACCACCAGCACCATAACCCACTCTT

B.

Wfs1wt AGAAGTGGCTACCCAGGGATATGACCCTTGCATATGATGAGACCCCAAGCCCTGTG  
Wfs1-ex5-KO232 AGAAGTGGCTACCCAGGGATATGACCCTTGCAT-----

Wfs1wt ATCCCTGCGAACAGTGATAACCCAGGATCCCGAGCTCCTATACCCAGTGGGCTACA  
Wfs1-ex5-KO232 ----- del 184bp -----

Wfs1wt GGGCAGGACGACTCAGCAGCCCTGGCTTCCAATCCTCTCTGATCTTACAGATGGAG  
Wfs1-ex5-KO232 -----

Wfs1wt GGGCGCAGCCAGGCCCGTCCCCAAGTCcctgcaGAAGCAGAGGGCGCATGCTGGAGC  
Wfs1-ex5-KO232 -----GCTGGAGC

Wfs1wt GTCTAGTGAGCAGTGAATGTGAGTATGTCCACCCTGTGAGTATGTCCACCCTGCGC  
Wfs1-ex5-KO232 GTCTAGTGAGCAGTGAATGTGAGTATGTCCACCCTGTGAGTATGTCCACCCTGCGC

Wfs1wt TGCAGTCCTGCTACCTGCTTCCCGCACACCACCAGCACCATAACCCACTCTT  
Wfs1-ex5-KO232 TGCAGTCCTGCTACCTGCTTCCCGCACACCACCAGCACCATAACCCACTCTT

C.

Wfs1wt Glu Gln Asp Gly Gly Ala Gln Pro Gly Pro Val Pro Lys Ser Leu Gln  
GAA CAG GAT GGA GGG GCG CAG CCA GGC CCC GTC CCC AAG TCC CTG CAG  
Wfs1-ex5-KO232 GAA CAG G----- del 81 bp -----  
Glu Gln

Wfs1wt Lys Gln Arg Arg Met Leu Glu Arg Leu Val Ser Ser Glu Ser Lys Asn  
AAG CAG AGG CGC ATG CTG GAG CGT CTA GTG AGC AGT GAA TCC AAG AAC  
Wfs1-ex5-KO232 -----CC AAG AAC  
Ala Lys Asn

**Lisa 2. Wfs1-ex5-KO232 roti konstrueerimine. (A)** Tsink-sõrmede tehnoloogia (ZFN) disain ja lõikekoht. Genotüüpiseerimise praimerid on märgitud paksus ja allajoonitud kirjas, ZFN-i seostumise koht punase värviga ning roti *Wfs1* geeni 5. eksoni algus ja lõpp sinisega. **(B)** *Wfs1*-puuduliku rotiliini 232 viienda eksoni DNA järjestus. Rotiliinil *Wfs1-ex5-KO232* puudub *Wfs1* geenist 184 bp (17 833-18 017), kaasa arvatud 55 bp viiendast eksonist. Viienda eksoni algus ja lõpp on märgitud sinisega. **(C)** Metsiktüüpi (wt) ja *Wfs1-ex5-KO232* roti cDNA ja valkude järjestuse võrdlus. Rotiliinil *Wfs1-ex5-KO232* puuduvad *Wfs1* geeni viienda eksoni kodeerivast osast kõik nukleotiidid, põhjustades viienda eksoni kao. 55 bp kadu *Wfs1* geeni viiendast eksonist ei põhjustanud raaminihkemutatsiooni ning neljanda ja kuuenda eksoni ühenduskohas tekkis uus,alaniini kodeeriv koodon GCC (Plaas jt., avaldamisel).

Lisa 3. qRT-PCR-is kasutatud kommertsiaalsed TaqMan-i sondid.

Geeni sümbol	Assay ID
<i>Wfs1</i>	Rn00582735_m1
<i>Hprt1</i>	Rn01527840_m1
<i>Hspa5</i>	Rn00565250_m1

50 °C      2 min  
 95 °C      10 min  
 95 °C      15 s } 45 x  
 60 °C      1 min }

Lisa 4. qRT-PCR-i skeem.

Lisa 5. PCR-is kasutatud Xbp1 praimerid (Yusta jt., 2006).

Nimi	Järjestus
<i>Forward</i>	5'-AAACAGAGTAGCAGCACAGACTGC-3'
<i>Reverse</i>	5'-TCCTTCTGGGTAGACCTCTGGGAG-3'

95 °C      15 min  
 95 °C      20 s }  
 60 °C      45 s } 30 x  
 72 °C      1 min }  
 72 °C      10 min }  
 4 °C

Lisa 6. PCR-i skeem.

## LIHTLITSENTS

### Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Tuuliki Koppel (sünnikuupäev: 19.02.1991),

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

Wfs1-puuduliku roti suhkurdiabeedi fenotüübi kirjeldamine,

mille juhendajad on Eero Vasar, Mario Plaas, Maarja Toots ja Martin Kärner,

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

1.2 üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **01.07.2018** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

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

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

Tartus, 31.05.2017