

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Marite Ehrlich

Mentooli ainevahetuslike toimetete analüüs WFS1-puudulikel hiirtel

Bakalaureusetöö

MSc Marilin Ivask

Professor Sulev Kõks

Professor Margus Pooga

TARTU 2014

Sisukord

Kasutatud lühendid	3
Sissejuhatus	4
1. Kirjanduse ülevaade.....	5
1.1. Wolframi sündroom	5
1.2. WFS1 geen	5
1.3. WFS1 funktsioon.....	6
1.4. TRPM8.....	7
1.5. Pruun rasvkude	9
1.6. UCP1	11
1.7. UCP1 funktsioon	11
1.8. TRPM8 aktivatsioon parandab UCP1 produktsiooni pruunis rasvkoes	12
2. Eksperimentaalne osa.....	13
2.1. Töö eesmärk	13
2.2. Materjalid ja meetodika	13
2.2.1. Hipokampuse eraldamine ja koelõikude valmistamine	13
2.2.2. TRPM8 immuunohistokeemia hipokampusest	13
2.2.3. Ainevahetuse katse	14
2.2.4. Statistiline analüüs	14
2.3. Tulemused	15
2.4. Arutelu	29
Kokkuvõte	33
Summary	34
Tänuavaldused	36
Kasutatud kirjandus	37
Kasutatud veebilehed	42
Litsents	43

Kasutatud lühendid

ANOVA – dispersioonanalüüs (*analysis of variance*)

BAT – pruun rasvkude (*brown adipose tissue*)

CaM – kalmoduliin (*calmodulin*)

DAB – 3,3-diaminobensidiin (*3,3-diaminobenzidine*)

Dio2 – tüüp 2 ensüüm deiodinaas (*deiodinase*)

hz – WFS1 mutatsiooni suhtes heterosügoot (*heterozygote*)

IHC – immuunohistokeemia (*immunohistochemistry*)

KMI – kehamassi indeks (*body mass index*)

ko – WFS1 geeni mutatsiooni suhtes homosügoot (*knock-out*)

PIP₂ – fosfatidüülinositol-4,5-bisfosfaat (*phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*)

PGC-1 α – peroksisoomi proliferaator-aktiveeritud retseptor gamma koaktivaator 1- α (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*)

UCP1 – termogeniin-1 geen või valk (*uncoupling protein-1*)

UPR – pakkimata valkude vastus (*unfold protein response*)

T2D – tüüp 2 suhkurtõbi (*type 2 diabetes mellitus*)

TRP – mööduva retseptorpotentsiaaliga katiooni kanal (*transient receptor potential channel*)

TRPM8 - mööduva retseptorpotentsiaaliga katiooni kanali M alaperekonna liige 8 (*transient receptor potential cation channel subfamily M member 8*)

WAT – valge rasvkude (*white adipose tissue*)

WFS1 – volframiin-1 geen või valk (*wolframin-1 gene/protein*)

WS – Wolframi sündroom (*Wolfram syndrome*)

Sissejuhatus

Wolframi sündroomi (WS) kirjeldati esmaskordselt 1938. aastal kui juveniilset suhkurtõbe optilise atroofiaga. WS-ga kaasneb lisaks endokrinoloogilistele häiretele veel neurodegeneratsiooniga seotud tunnused, nagu vaimne arengupeatetus ja dementsus. Mutatsioonid wolframiin-1 geenis (WFS1) põhjustavad WS-i. WFS1 ekspresseerub nii inimesel kui ka hiirel enim südames, pankrease β -rakkudes, kopsudes, põrnas, platsentas ja skeletilihastes. WFS1 võib omada rolli emotsionaalsetes, käitumuslikes ja vistseraalsetes ülesannetes.

WFS1-puudulike hiirte hipokampuse RNA-sekveneerimisel selgus, et WFS1-puudulikel hiirtel on kõrgem mööduva retseptorpotentsiaaliga katiooni kanali M alaperekonna liikme 8 ekspressioon (TRPM8) (Kõks *et al.*, avaldamata andmed). TRPM8 on funktsionaalselt ekspresseeritud pruunides rasvarakkudes ning selle agonist mentool reguleerib üles termogeniin-1 (UCP1) taseme pruunides rasvarakkudes. UCP1 on spetsiifiliselt ekspresseeritud pruunis rasvkoes ning selle termogeenne aktiivsus vähendab rasvumist ja tõstab insuliinitundlikkust. Mentool võiks seega WFS1-puudulikele hiirtele manustatuna tõsta nende ainevahetuse aktiivsust rohkem võrreldes metsiktüüpi hiirtega.

Käesoleva bakalaureusetöö kirjanduse ülevaates iseloomustatakse WFS1 geeni, TRPM8 kanalit ja selle funktsiooni organismis ning seotust pruuni rasvkoega. Eksperimentaalse osa eesmärgiks oli näidata TRPM8 olemasolu WFS1-puudulike ning metsiktüüpi hiirte hipokampuses. Samuti uurida mentooli ainevahetuslikku mõju ja sellest lähtuvate füsioloogiliste näitajate erinevusi WFS1-puudulike ja metsiktüüpi hiirte vahel.

Käesoleva töö katsed teostati Tartu Ülikooli bio- ja siirdemeditsiini instituudi patofüsioloogia osakonnas.

WFS1, TRPM8, mentool

1. Kirjanduse ülevaade

1.1. Wolframi sündroom

Esmakordselt kirjeldati Wolframi sündroomi (*Wolfram syndrome*, WS) 1938. aastal. Akronüüm DIDMOAD võtab kokku kõige sagedasemad sümptomid: magediabeet (*diabetes insipidus*), suhkurtõbi (*diabetes mellitus*), optiline atroofia (*optic atrophy*) ja kurtus (*deafness*). Minimaalsed kriteeriumid WS-i diagnoosiks on suhkurtõbi ja optiline atroofia. Paljudel patsientidel esinevad lisaks magediabeet, kurtus, kusetrakti atoonia, ataksia, perifeerne neuropaatia, vaimne arengupeatetus ja dementsus (Strom *et al.*, 1998).

Üldjuhul ilmnevad patsientidel esmased haiguse tunnused, milleks on diabeet ja nägemisnärv atroofia, esimese kahekümne eluaasta jooksul (Barrett *et al.*, 1995; Hansen *et al.*, 2005; Cano *et al.*, 2007). WS-iga patsiendid surevad tavaliselt 25-40-aastasena ajutüve atroofia tõttu tekkinud tsentraalse hingamispuudulikkuse tagajärjel (Barrett *et al.*, 1995). WS-iga kaasneb ka progresseeruv neurodegeneratsioon, mille peamiseks tunnusteks on vaimne arengupeatetus ja dementsus. Lisaks võivad esineda järgnevad sümptomid: nüstagmid ehk silmade võbelused, ataksia ja perifeerne neuropaatia. Kirjeldatud on ka psühhiaatrilisi häireid, nagu bipolaarne häire, depressioon ja skisofreenia (Swift *et al.*, 1990; Swift *et al.*, 1991). Erinevaid psühhiaatrilisi ilminguid leitakse 60% WS patsientidel (Swift *et al.*, 1990).

WS pärandub autosoom-retsessiivselt (Collier *et al.*, 1996; Strom *et al.*, 1998). DPV (*German Diabetes Prospective Documentation*, DPV) andmebaasi kasutades on välja arvatud, et WS-i esineb lastel ja noorukitel alla 21 eluaasta Euroopas 33/17000000 (kandjate sagedus 1:500000). WS-i esinemine diabeeti põdevatel lastel ja noorukitel alla 21 eluaasta on 33/24000 (kandjate sagedus 1:730) (Rohayem *et al.*, 2011). Kandjate sagedus erineb maailmas suuresti ning kõige kõrgem on see Liibanonis (kandjate sagedus 1:68000). Võimalikuks põhjuseks võib olla veresuguluse kõrgem esinemine selles piirkonnas (Medlej *et al.*, 2004).

1.2. WFS1 geen

Mutatsioonid WFS1 ehk volframiin-1 geenis põhjustavad WS-i (Collier *et al.*, 1996; Strom *et al.*, 1998). WFS1 paikneb 4. kromosoomi p16.1 piirkonnas, mille suurus on ligikaudu 33,4 kiloaluspaari (*kilobase*, kb). WFS1 geen koosneb kaheksast eksonist. Translatsiooni alguspunkt asub teises eksonis, millelt kodeeritakse 890 aminohappe pikkune peptiid, molekulmassiga 100 kilodaltonit (*kilodalton*, kDa). WFS1 on hüdrofoobne tetrameerne valk,

millel on üheksa transmembraanset segmenti ja mõlemas otsas suur hüdrofiilne ala (Hofmann *et al.*, 2003) (joonis 1).

Rohayem *et al.* (2011) uurisid WFS1 mutatsioone ning leidsid, et mutatsioonide spektris oli nii missense, nonsense, splaissimisalade mutatsioone kui ka väiksemaid deletsioone ja insertioone, mis on seotud WFS1 lugemisraami nihetega. Enamik mutatsioone toimus 8. eksonis, mis kodeerib WFS1 karboksüterminaalset endoplasmaatilise retiikulumi (*endoplasmic reticulum*, ER) membraani luumeni ekstratsellulaarset osa.

WFS1 ekspresseerub nii inimesel kui ka hiirel enim südames, pankrease β -rakkudes, kopsudes, põrnas, platsentas ja skeletilihastes (Inoue *et al.*, 1998; Strom *et al.*, 1998; Hofmann *et al.*, 2003; Ishihara *et al.*, 2004). Ajus on WFS1 kõrgelt ekspresseerunud mandelkehas, ventraalses striatumis, hipokampuses, keskmises kuulmerajas, prefrontaalses korteksis, haistesibulas ja allokorteksis (Takeda *et al.*, 2001; Luuk *et al.*, 2008). WFS1 võib omada rolli emotsionaalsetes, käitumuslikes ja vistseraalsetes ülesannetes (Takeda *et al.*, 2001).

1.3. WFS1 funktsioon

WFS1 on transmembraanne glükoproteiin, mis asub ER-is. WFS1 aminotermiinaalne domeen (N-terminus) asub tsütoplasmas ja karboksüterminaalne domeen (C-terminus) ER-i luumenis (Hofmann *et al.*, 2003). ER on organell, mille üheks funktsiooniks on pakkida sekretoorseid valke. Pakkimata või valesti pakitud valkude kogunemine põhjustab ER stressi ja indutseerib pakkimata valkude vastuse (*unfold protein response*, UPR), signaalvõrgustiku, mis üritab taastada ER-i homöostaasi. Selleks peatatakse valkude translatsioon ja aktiveeritakse molekulaarsed tšaperonid, mis on seotud valkude pakkimisega (Fonseca *et al.*, 2010). Kui ER stress püsib, siis UPR muudab ellujäämismehhanismid proapoptootilise raja vastu. Sellega kindlustatakse pöördumatult kahjustatud rakkude korrektne eemaldamine (Rohayem *et al.*, 2011).

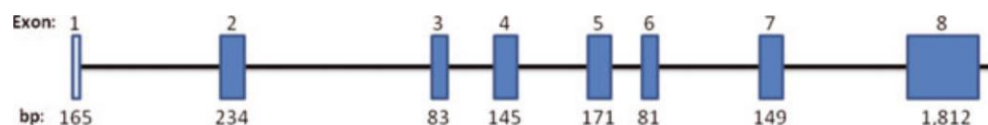
WFS1 osaleb kuhjunud pakkimata valkude ER stressi vastuses (Malhotra & Kaufman, 2007; Lin *et al.*, 2008). Puudulik WFS1 funktsioon võib tekitada kroonilist ER stressi, mis omakorda kutsub esile näiteks pankrease β -rakkude ja närvirakkude apoptoosi. Selle tulemusena väheneb pankrease endokriinne funktsioon ja toimub neurodegeneratsioon (Harding & Ron, 2002).

Zatyka *et al.* (2008) leidsid, et WFS1 karboksüterminaalne domeen on seotud ER-s paikneva Na^+/K^+ -ATPaasi $\beta 1$ subühiku karboksüterminaalse domeeniga. Na^+/K^+ -ATPaasi defitsiidil on

oluline roll apoptoosis ja neurodegeneratiivsetes haigustes. WFS1 mutatsioonid põhjustavad Na^+/K^+ -ATPaasi defitsiidi, mis võib viia WS-i arenguni. Kurtus võib olla põhjustatud kaaliumi ringluse muutumises sisekõrvas, mis on WFS1 ja Na^+/K^+ -ATPaasi $\beta 1$ subühiku interaktsiooni katkemise tulemus (Rigoli *et al.*, 2011). Takei *et al.* (2006) uuringud viitavad, et WFS1 võib aidata säilitada kaaliumi ionide õige rakusisese taseme, kontrollides kui palju kaaliumi ladustatakse ER-is.

WFS1 võib osaleda valkude biosünteesis, modifitseerimises, pakkimises ja transpordis, Ca^{2+} homöostaasi regulatsioonis ja ER stressi regulatsioonis (Yamaguchi *et al.*, 2004; Fonseca *et al.*, 2005; Hofmann & Bauer, 2006; Yamada *et al.*, 2006; Zatyka *et al.*, 2008; Yurimoto *et al.*, 2009). WFS1 võib osaleda Ca^{2+} signaaliülekanne süsteemis (Yurimoto *et al.*, 2009).

WFS1 võib olla ka kalmoduliini (CaM) siduv valk (Hofmann *et al.*, 2003) ning WFS1 funktsiooni reguleerimises on oluline CaM sidumine. CaM võib olla tsütosoolse Ca^{2+} kontsentratsiooni sensor, et reguleerida WFS1 funktsiooni nagu näiteks Ca^{2+} kanali aktiivsust või muutes ER-is Ca^{2+} täitumist (Yurimoto *et al.*, 2009).



Joonis 1. Skemaatiline ülevaade WFS1 geenist inimesel. WFS1 geen sisaldab kaheksat eksonit, millest esimene ekson on mittekodeeriv (Hofmann *et al.*, 2003).

1.4. TRPM8

Mööduva retseptorpotentsiaaliga katiooni kanali M alaperekonna liige 8 (*transient receptor potential cation channel subfamily M member 8*, TRPM8) on ionkanali mööduva retseptorpotentsiaaliga katiooni kanali (*transient receptor potential channel*, TRP) perekonna liige, millel on mitmeid funktsioone nii selgroogsetes kui selgrootutes (Montell, 2005). Esimest korda kajastati TRPM8 eesnäärme vähirakkude spetsiifilise markerina ja mõni aeg hiljem külma- ja mentoolireseptorina sensorsetes neuronites (McKemy *et al.*, 2002; Peier *et al.*, 2002).

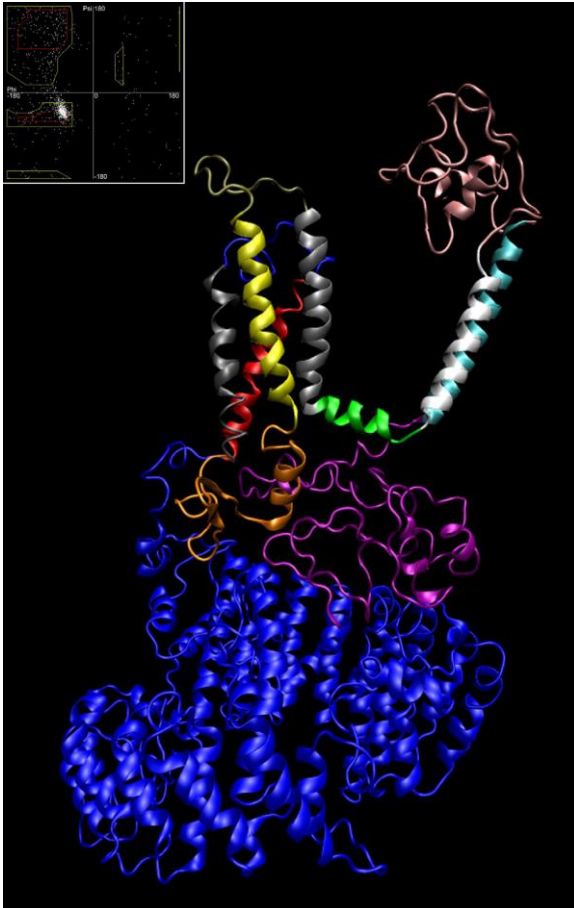
TRPM8 geen on 82190 nukleotiidi pikk, milles on 27 eksonit (UCSC andmebaas). Kodeeriv ala on 3315 nukleotiidi pikk, millelt omakorda sünteesitakse 1104 aminohappest koosnev

valk, molekulmassiga 128 kDa (Tsavaler *et al.*, 2001; McKemy *et al.*, 2002; Peier *et al.*, 2002). TRPM8 funktsionaalne kvaternaarne struktuur on homotetrameerne kanal, millel on modulaarne struktuur ja allosteeriline värav (Latorre *et al.*, 2007). Inimese TRPM8 on hiire ja rotiga vastavalt 92% ja 93% ulatuses ortoloogne (McKemy *et al.*, 2002; Peier *et al.*, 2002).

TRPM8 omab kuut transmembraanset domeeni tsütoplasmaatilise C- ja N-terminaalse domeeniga, kus pikad transmembraani domeeni S5 ja S6 lõigud moodustavad tetrameerse valgu poori. TRPM8-l on lühikene tsütoplasmaatiline C-terminaalne domeen võrreldes teiste TRPM perekonna liikmetega, koosnedes ainult 127 aminohappest. Karboksüterminaalne domeen sisaldab TRP domeeni, mis on levinud kõigis TRP kanalites, millel on kuus kõrgelt konserveerunud TRP järjestust, nagu ka keerdunud spiraali domeenid, mis põhjustavad TRPM8 moodustumist tetrameerseks ionikanaliks (McKemy *et al.*, 2002; Peier *et al.*, 2002). Mutatsioonid selles domeenis takistavad TRPM8 ekspressiooni ning kanali moodustumist (Erler *et al.*, 2006; Tsuruda *et al.*, 2006; Pedretti *et al.*, 2009).

Kanal on aktiveeritav madala temperatuuri poolt vahemikus 8°C kuni 25°C ja külma imiteerivate kemikaalide poolt, nagu mentool, positiivse membraanipotentsiaaliga ja endogeensete signaali lipiididega, nagu fosfatidüülinositol-4,5-bisfosfaat (PIP₂) (McKemy *et al.*, 2002; Peier *et al.*, 2002; Nilius *et al.*, 2007).

TRPM8 monomeeri struktuur on kuuest heeliksist koosnev transmembraani heeliksi kimp (Clayton *et al.*, 2008). Transmembraani heeliksi kimp sisaldab ekstratsellulaarset ja tsütoplasmaatilist silmust ning transmembraanset osa, kus kaks heeliksit on poori poole (S5-S6) ning nähtavalt kaugemal esimesest neljast pingetundlikust heeliksist (S1-S4) (Pedretti *et al.*, 2009) (joonis 2).



Joonis 2. TRPM8 monomeeri struktuur. Struktuur on värvitud segmentide järgi (värvikood: N-T: sinine; S1: punane; EL1: taevasinine; S2: hall; CL1: pruun; S3: kollane; EL2: kuldne; S4: hall; CL2: roheline; S5: valge; EL3: roosa; S6: taevasinine; C-T: violetne) (Clayton et al., 2008).

1.5. Pruun rasvkude

Imetajates on kaht tüüpi rasvkudet - valget (*white adipose tissue*, WAT) ja pruuni (*brown adipose tissue*, BAT). WAT on peamiselt energia salvestamiseks ja BAT on energiat hajutav organ ning spetsialiseerunud energia kulutamisele. BAT-i rakkudes on mitmeid väikeseid liipiitilkasid, mida ümbritseb arvukalt mitokondreid. Need sisaldavad valku termogeniin-1 (*uncoupling protein-1*, UCP1), mis paikneb mitokondri sisemembraanis, moodustades 5-8% kogu mitokondri valgust (Lin & Klingenberg, 1980; Klingenberg, 1999; Cannon & Nedergaard, 2004). Närilistel on BAT abaluude vahel, kaenla all ja neeru ümbruses (Cannon & Nedergaard, 2004). Külmas ja spontaanse hüperfaagia järel on BAT-i termogenees peamine sümpaatiliselt aktiveeritav värisemisega mitteseotud soojuse tootmine väikestel närilistel. BAT kontrollib kogu keha energia kulutamist ja keharasva (Lowell & Spiegelman, 2000;

Cannon & Nedergaard, 2004). BAT osaleb pikaajalisel energia ja keha rasva regulatsioonis. BAT-i termogeneesi põhiliseks substraadiks on triglütseriididest pärit ja ringluses olevad vabad rasvhapped ning lipoproteiinid. Süsiniku allikana transporditakse BAT-i glükoosi, mida vajatakse rasvhapete sünteesiks ja kiireks rasvhapete oksüdatsiooniks (Shimizu *et al.*, 1991; Inokuma *et al.*, 2005).

BAT-i termogenees sõltub β -adrenergiliselt vahendatud lipolüüsi aktivatsioonist ja sellele järgneva rasvhapete degradeerumisest UCP1 kaudu, mis vallandab mitokondriaalse oksüdatiivse fosforülatsiooni, hajutamaks elektrookeemiline gradient soojusena ATP sünteesi asemel (Lowell & Spiegelman, 2000; Lowell & Bachman, 2003; Inokuma *et al.*, 2006; Feldmann *et al.*, 2009).

BAT-i rakud on tugevalt innerveeritud sümpaatilise närvisüsteemi poolt. Külma mõjutab kesknärvisüsteemi, mis stimuleerib sümpaatilisi närve ning vabastavad katehhoolamiine, mis koos β -adrenergiliste retseptoritega põhjustavad tsüklilise adenosiinmonofosfaadi (*cyclic adenosine monophosphate*, cAMP) taseme tõusu BAT-is (Cannon & Nedergaard, 2004). Külmaisting aktiveerib β -adrenergilised retseptorid ning selle tulemusena omakorda adenülaadi tsüklaasi ja hormoonitundliku lipaasi, mis hüdrolüüsib rakusiseseid triglütseriide. Vabastatud rasvhapped aktiveerivad UCP1 (Saito, 2013). UCP1-te stimuleerivad lisaks cAMP ka teised termogeneensed faktorid, näiteks transkriptsiooni koaktivaator PGC-1 α (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*) ja tüüp 2 ensüüm deiodinaas (*deiodinase*, Dio2) (Seale *et al.*, 2007).

Külm on BAT-i aktivatsiooni kõige tugevam ja füsioloogilisem stiimul. Hiirtel, kes on 4°C juures, on oluliselt suurem sümpaatiliste närvide aktivatsioon BAT-is, millele järgnevad mitmed rakusisesed aktivatsioonid (Saito, 2013). Katseloomad, kellel on madalam UCP1 ekspressioon BAT-is, on ülekaalulised (Lowell & Spiegelman, 2000; Cannon & Nedergaard, 2004). Pikaajaline külmale eksponeerimine kutsus esile UCP1 ekspressiooni tõusu, mitokondrite sünteesi, proliferatsiooni ja pruuni rasvarakkude diferentseerumise, mis omakorda põhjustavad BAT-i hüperplaasiat ja termogeneetilise mahu suurenemist (Cannon & Nedergaard, 2004).

Inimestel asub BAT kaela- ja õlapiirkonnas, supraklavikulaarses ja paraspinaalses alas (Cypess *et al.*, 2009; van Marken Lichtenbelt *et al.*, 2009; Virtanen *et al.*, 2009; Jespersen *et al.*, 2013; Sacks & Symonds, 2013). On leitud, et külmast aktiveeritud BAT-i on üle 50% uuringutavates kahekümnendates eluaastates inimestel ning see väheneb eaga. Näiteks

viiekümnendates ja kuuekümnendates eluaastates inimestel on seda vähem kui 10% (Yoneshiro *et al.*, 2011).

BAT-i olemasolu inimestes on pöördvõrdeliselt seotud rasvumise ja tüüp 2 suhkurtõvega (*type 2 diabetes mellitus*, T2D) (Cypess *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010; Pfannenberger *et al.*, 2010; Ouellet *et al.*, 2011). Ainevahetuse aktiivsus ja BAT-i kogus on madalam diabeeti põdevatel patsientidel (Ouellet *et al.*, 2011). BAT-i olemasolu on madalam ka patsientidel, kellel on kõrgem kehamassi indeks (*body mass index*, KMI) (Cypess *et al.*, 2009; Pfannenberger *et al.*, 2010; Ouellet *et al.*, 2011). Polümorfism UCP1 promotoris vähendab geeni ekspressiooni ning on seotud kõrge KMI-ga (Sramkova *et al.*, 2007). Samuti on kõrge KMI-ga seotud polümorfismid β 3-adrenoretseptorites (Fujisawa *et al.*, 1998; Kurokawa *et al.*, 2008). Vanusest sõltuv keharasva kogunemine on seotud BAT-i aktiivsuse vähenemisega (Yoneshiro *et al.*, 2011).

BAT-i stimuleerimine võiks pakkuda uusi ravivõimalusi, vähendamaks rasvumist ja sellega seotud haigusi (Seale *et al.*, 2007). Üks ravivõimalus on seotud BAT-i oksüdatiivse ainevahetuse suurendamisega (Ghorbani *et al.*, 1997; Granneman *et al.*, 2003; Tseng *et al.*, 2010). B-adrenergiliste retseptorite agonistid stimuleerivad termogeneesi, suurendavad ainevahetust ning avaldavad rasvumise ja diabeedi vastast mõju hiirtes (Hamann *et al.*, 1996; Arch, 2002; Lidell & Enerback, 2010; Bartelt *et al.*, 2011; Gunawardana & Piston, 2012; Whittle *et al.*, 2012).

1.6. UCP1

UCP-valgud (UCP1-3) kuuluvad mitokondri aniooni kandjate perekonda (Heaton *et al.*, 1978) ning neid iseloomustatakse kui termogeenseid valke. UCP on spetsiifiliselt ekspresseeritud pruuni rasvkoe mitokondrite sisemembraanil, kus muudab mitokondriaalse prootoni liikumapaneva jõu soojuseks (Cannon & Nedergaard, 2004). UCP1 termogeenne aktiivsus vähendab rasvumist ja tõstab insuliinitundlikkust (Cederberg *et al.*, 2001; Kozak & Anunciado-Koza, 2008).

1.7. UCP1 funktsioon

UCP1 katalüüsib prootoni lekke mitokondri sisemembraanile, mida on võimalik inhibeerida puriini nukleotiididega ning aktiveerida vabade rasvhapetega. See põhjustab pruunis rasvkoes värisemisega mitteseotud termogeneesi. See on kaitsemehhanism, säilitamaks looma normaalset kehatemperatuuri külmades tingimustes või toidust saadud liigse energia põletamisel (Klingenspor, 2003; Cannon & Nedergaard, 2004). UCP1 mutantsetel hiirtel tekib

eluohtlik hüpotermia, kui neid hoida külmas, sest neil on puudulik värisemisega mitteseotud termogenees pruunis rasvkoes (Enerback *et al.*, 1997).

UCP1 on ekspresseeritud veel seede-, emaka- ja meeste reproduktiivtrakti silelihastes, kus omab nii termogeenset kui piki silelihaskihi lõõgastumise ülesannet (Nibbelink *et al.*, 2001). UCP1 on leitud nii rottide kui ka hiirte harknäärmes (Carroll *et al.*, 2005), kus termogeense funktsiooni asemel osaleb tümotsüütide selektsioonis ja levikus (Brennan *et al.*, 2006; Adams *et al.*, 2010).

1.8. TRPM8 aktivatsioon parandab UCP1 produktsiooni pruunis rasvkoes

TRPM8 on ekspresseeritud BAT-is ja ka pruunide rasvarakkude primaarkultuuris, kuid puudub TRPM8-puudulike (*knock-out*, ko) hiirte pruunides rasvarakkudes (Ma *et al.*, 2012). TRPM8, mille agonist on mentool, tõstab märkimisväärselt Ca^{2+} taset metsiktüüpi (*wild-type*, wt) hiirte pruunides rasvarakkudes ning ainult vähesel määral TRPM8 ko rakkudes. Ma *et al.* (2012) järeldasid katse tulemustest, et TRPM8 on funktsionaalselt ekspresseeritud pruunides rasvarakkudes. TRPM8 aktivatsioon mentooli poolt reguleerib üles UCP1 taseme pruunides rasvarakkudes *in vitro* ja BAT-is *in vivo*. Mentool tõstis märgatavalt sisemist temperatuuri ja hoidis ära toitumisest põhjustatud rasvumise ja sellega seotud glükoosi kõrvalekalded metsiktüüpi hiirtes, kuid mitte TRPM8 ko ja UCP1 ko hiirtes (Ma *et al.*, 2012). TRPM8 võib olla funktsionaalselt seotud BAT-i aktivatsiooniga ning põhjustada WAT-i diferentseerumist BAT-ks inimeses (Rossato *et al.*, 2014).

2. Eksperimentaalne osa

2.1. Töö eesmärk

Antud töö eesmärgiks oli näidata TRPM8 olemasolu hipokampuses ning uurida ainevahetuse erinevusi metsiktüüpi (*wild-type*, wt) ja WFS1-puudulike (*knock-out*, ko) hiirte vahel, kellele manustati iga päev erinev kogus L-mentooli, ning seejuures vaadelda, kas L-mentool muudab WFS1-puudulike hiirte füsioloogilisi näitajaid, nagu hapniku tarbimine, süsihappegaasi produktsioon ning kehatemperatuur.

2.2. Materjalid ja meetodika

Katseloomadeks olid Tartu Ülikoolis tehtud WFS1-puudulikud ja metsiktüüpi hiired. Katsetes kasutati 9-12 kuu vanuseid F2 põlvkonna isasloomi, kelle geneetiline taust oli (129S6/SvEvTac x 129S6/SvEvTac). Hiiri hoiti paarides 8 kaupa 22°C juures, 12-h/12-h valge-/pimetsükliga (valgetsükkel algas hommikul kell 7) ning neil oli vaba juurdepääs veele ja toidule. Loomkatsete teostamiseks oli luba number 71, 8. aprill, 2011.

2.2.1. Hipokampuse eraldamine ja koelõikude valmistamine

Kolm WFS1 ko ja kolm wt hiirt anesteeriti 10 g kehamassi kohta 100 µl Dormicumi (Roche) ja Hypnormi (Janssen) 50% vesilahuste seguga (vahekord 1:1).

Katseloomad perfuseeriti südame vasaku vatsakese kaudu järgmiste lahustega: 20 ml fosfaatpuhvri soolalahusega (*phosphate buffered saline*, PBS) pH 7,4, 15 ml 2% paraformaldehüüdiga (*paraformaldehyde*, PFA), 0,1 M fosfaatpuhvriga (*phosphate buffer*, PB) pH 7,4.

Ajust eraldatud hipokampust hoiti kaks ööpäeva 20% suhkrulahuses, mis sisaldas 0,1 M PB-d ja 1% PFA-d. Hipokampusest tehti mikrotoomiga (Microm HM 560) 40 µm paksused külmlõigud polülüsiiniga kaetud klaasidele, mida kuivatati kuni üks tund 37°C juures.

2.2.2. TRPM8 immuunohistokeemia hipokampusest

Polülüsiinklaasidele fikseeritud hipokampuse lõike pesti PBS puhvril (pH 7,4) 3 x 5 minutit. Koelõikudele kanti peale blokeerimisserum (Dako REAL Antibody Diluent, S2022; Dako Denmark A/S, Glostrup) ning inkubeeriti 20 minutit toatemperatuuril. Üleliigne blokeeriv serum eemaldati lõikudelt ning lõike inkubeeriti üleöö primaarse TRPM8 antikehaga (lahjendus 1:500) (ab104569, Abcam). Inkubeerimise järgselt pesti koelõike PBS puhvril, mis sisaldas 0,07% Tween-20 (Sigma), 3 x 5 minutit. Koelõike inkubeeriti 30 minutit Dako

REAL™ EnVision™ Detection süsteemiga, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse” (K5007; Dako Denmark A/S, Glostrup) toatemperatuuril. Koelõike pesti PBS puhvril, mis sisaldas 0,07% Tween-20 (Sigma), 3 x 5 minutit. Seejärel inkubeeriti lõike pimedas 4 minutit 3,3-diaminobensidiiniga (*3,3-diaminobenzidine*, DAB) (Dako Real™ EnVision™ kitist) toatemperatuuril. Koelõike pesti PBS puhvril, mis sisaldas 0,07% Tween-20 (Sigma), 3 x 5 minutit. Koelõike värviti tolueensinisega (Applichem) ja loputati destilleeritud veega. Koelõigud veetustati 70% etanoolis 2 minutit, 96% etanoolis 2 x 2 minutit ning ksülooli lahuses 3 x 2 minutit. Lõpuks sulandati Eukitiga (Sigma) ning kaeti katteklaasiga.

2.2.3. Ainevahetuse katse

Kuus WFS1 ko ja kaheksa wt hiirt eraldati kodupuuridest ning hoiti nädal aega enne ainevahetuse katset üksikpuurides. Kohanemisperioodi järgselt uuriti hiirte ainevahetust metaboolsetes puurides (TSE Phenomaster). Esimesel kahel päeval mõõdeti baasainevahetust ning nelja järgneva päeva jooksul manustati hiirtele kord päevas sondiga vastavalt 8 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg ja 20 mg/kg L-mentooli (Sigma) vesilahust. Kontrollgrupile manustati 0,2 ml vett kord päevas nelja päeva jooksul. Enne sondiga manustamist mõõdeti hiirtel rektaalne temperatuur. Hiirtel mõõdeti rektaalne temperatuur ka üks ja kaks tundi pärast manustamist. Mõõdeti toidu (g), joogi (ml), keskmise O₂ tarbimise (ml/h/kg), keskmise CO₂ produktsiooni (ml/h/kg) ja soojusproduktsiooni (kcal/h/kg) andmed.

Hiirte ainevahetust analüüsiti metaboolsetes puurides (TSE Phenomaster). Soojusproduktsioon mõõdeti enne katset ning 3, 7 12 ja 14 tundi pärast mentooli manustamist. Masina poolt automaatselt mõõdeti ja arvutati energiakulu H [kcal/kg/h], mis võttis 100% arvesse hiirte kehakaalu. Programm arvutas H-indeksi järgmiselt: $(CVO_2 * VO_2 + CVCO_2 * VCO_2) / 1000$. CVO₂ oli 3,941 ja CVCO₂ 1,106. VO₂ arvutati järgmiselt: $FlowML * (V_1 + V_2) / (N_2Ref * looma\ kaal * 100.0)$. VCO₂ arvutati järgmiselt: $FlowML * dCO_2 / (looma\ kaal * 100.0)$. FlowML (ml/h) arvutati järgmiselt: $Flow * 1000.0 * 60.0$. $dCO_2 = CO_2 - CO_2Ref$. $V_1 = N_2Ref * dO_2$. $dO_2 = O_2Ref - O_2$. $V_2 = O_2Ref * (dO_2 - dCO_2)$. H on soojusproduktsioon. VCO₂ on CO₂ produktsioon. VO₂ on O₂ tarbimine. dCO₂ on referentspuuri CO₂ – mõõdetava puuri CO₂. dO₂ on referentspuuri O₂ – mõõdetava puuri O₂.

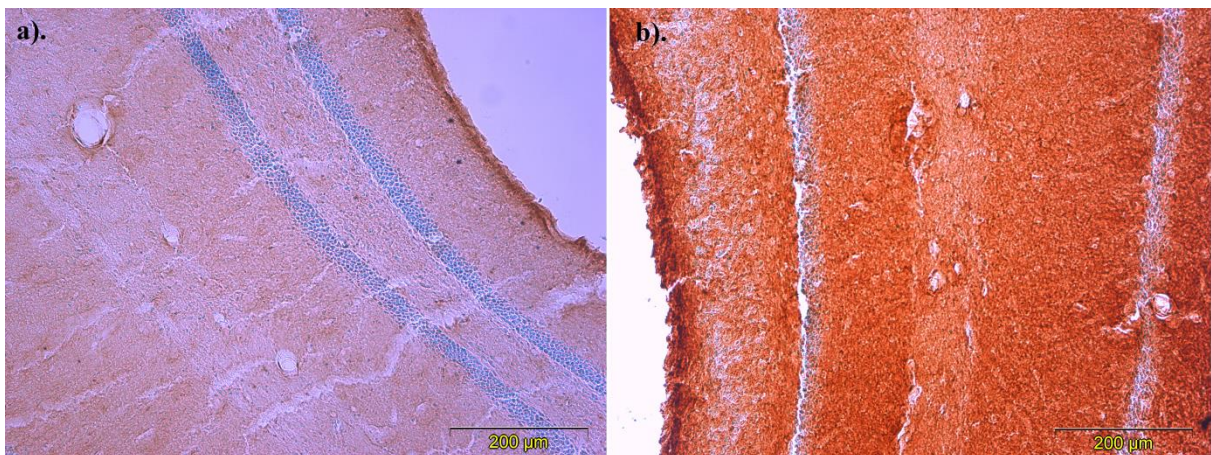
2.2.4. Statistiline analüüs

Andmed on esitatud kui keskmine ± standardhälve. Andmete analüüsimiseks kasutatud statistilise testi valik sõltus sellest, kas andmed olid normaaljaotusega või mitte. Hapniku tarbe ja kehakaalu muutuse andmete analüüsiks kasutati t-testi. Kehatemperatuuri, kehakaalu, toidu ja joogi, hapniku tarbe muudu, süsihappegaasi produktsioon ja selle muudu

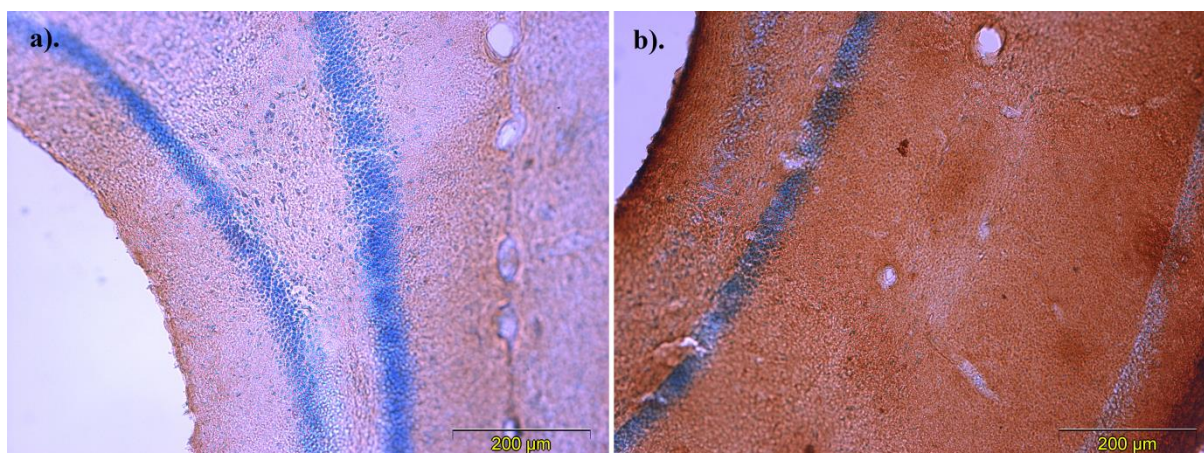
analüüsimiseks kasutati Kruskal-Wallis testi. Statistiliselt oluliseks loeti p-väärtust, mis oli väiksem kui 0,05 ($p < 0,05$). Statistilise analüüsi tegemiseks kasutati statistilise andmetötluse programmi R tarkvara (<http://www.r-project.org/>).

2.3. Tulemused

Hiirte hipokampuse lõike analüüsiti immuunohistokeemiliselt (*immunohistochemistry*, IHC), tuvastamaks TRPM8 olemasolu selles piirkonnas. Selgelt on näha tugevamat värvumist TRPM8 antikehaga võrreldes kontrolliga (joonised 4a, 4b, 5a, 5b) ning võib öelda, et TRPM8 paikneb hipokampuses. Rakulist jaotumist ega lokaliseerumist ei ole teadmata põhjustel hästi näha.

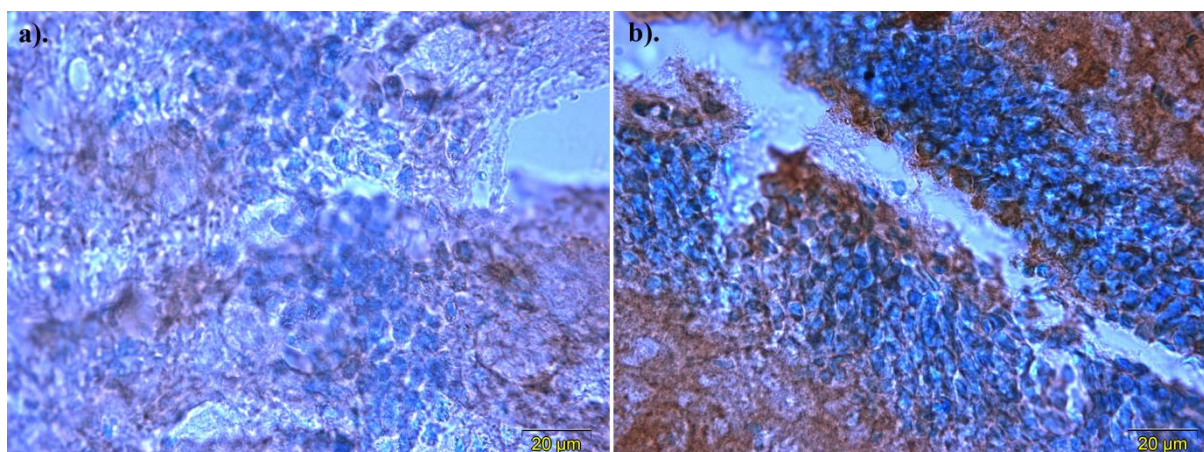


Joonis 4. TRPM8 tuvastamine WFS1 ko hipokampuses 20-kordse suurendusega objektiiviga. a). WFS1-puuduliku hiire IHC kontroll 20-kordse suurendusega objektiiviga. b). WFS1-puuduliku hiire TRPM8 IHC 20-kordse suurendusega objektiiviga. Toluensinine – tuumad, tumepruun (DAB) – TRPM8 neuronite membraani ümbruses.

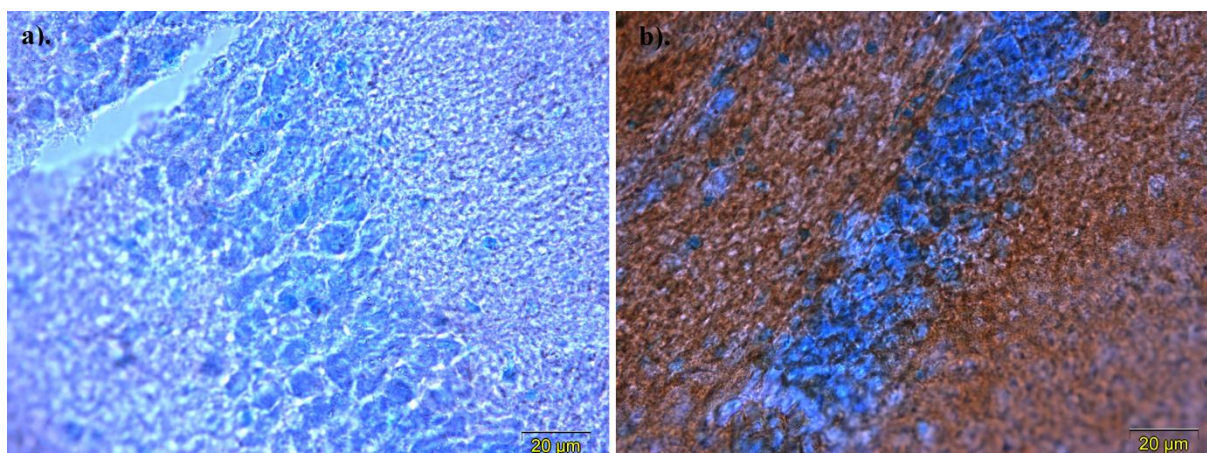


Joonis 5. TRPM8 tuvastamine wt hipokampuses 20-kordse suurendusega objektiiviga. a). Wt hiire IHC kontroll 20-kordse suurendusega objektiiviga. **b).** Wt hiire TRPM8 IHC 20-kordse suurendusega objektiiviga. Tolueensinine – tuumad, tumepruun (DAB) – TRPM8 neuronite membraani ümbruses.

TRPM8 kanal paikneb neuronite membraani ümbruses, kuid antud lõikude värvingu järgi ei saa teha järeldust, et WFS1-puudulikel hiirtel oli TRPM8 antikeha värvunud rohkem võrreldes wt hiirtega. Koelõikude taust oli positiivsel IHC koelõigu kontrollil tugevam võrreldes negatiivsega (joonised 6a, 6b, 7a ja 7b).

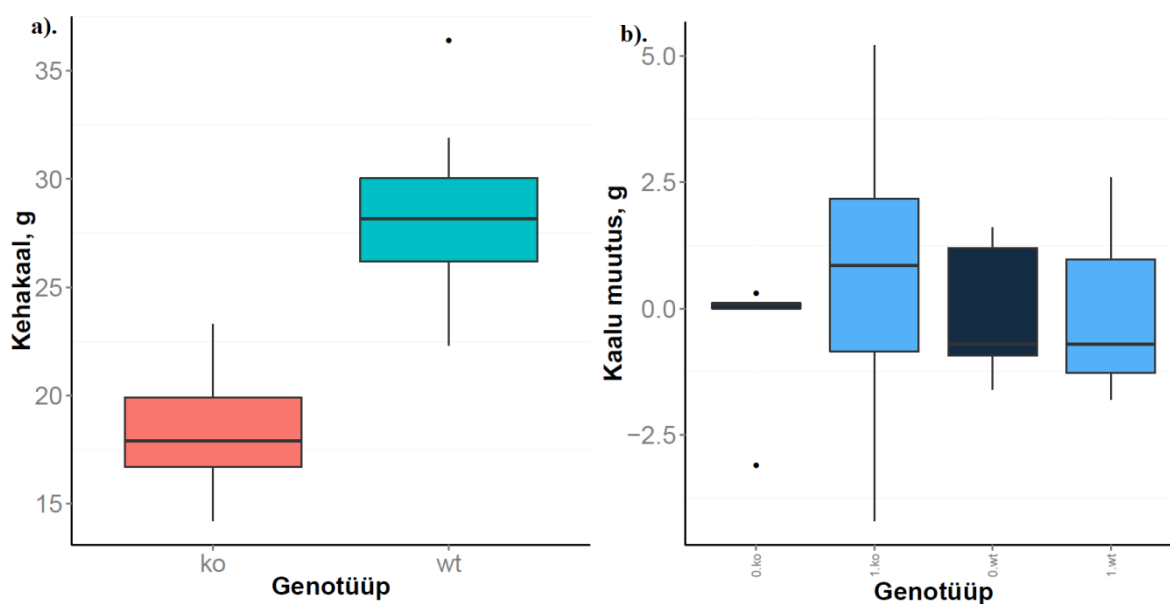


Joonis 6. TRPM8 tuvastamine WFS1 ko hipokampuses 100-kordse suurendusega objektiiviga. a). WFS1-puuduliku hiire IHC kontroll 100-kordse suurendusega objektiiviga. **b).** WFS1-puuduliku hiire TRPM8 IHC 100-kordse suurendusega objektiiviga. Tolueensinine – tuumad, tumepruun (DAB) – TRPM8 neuronite membraani ümbruses.



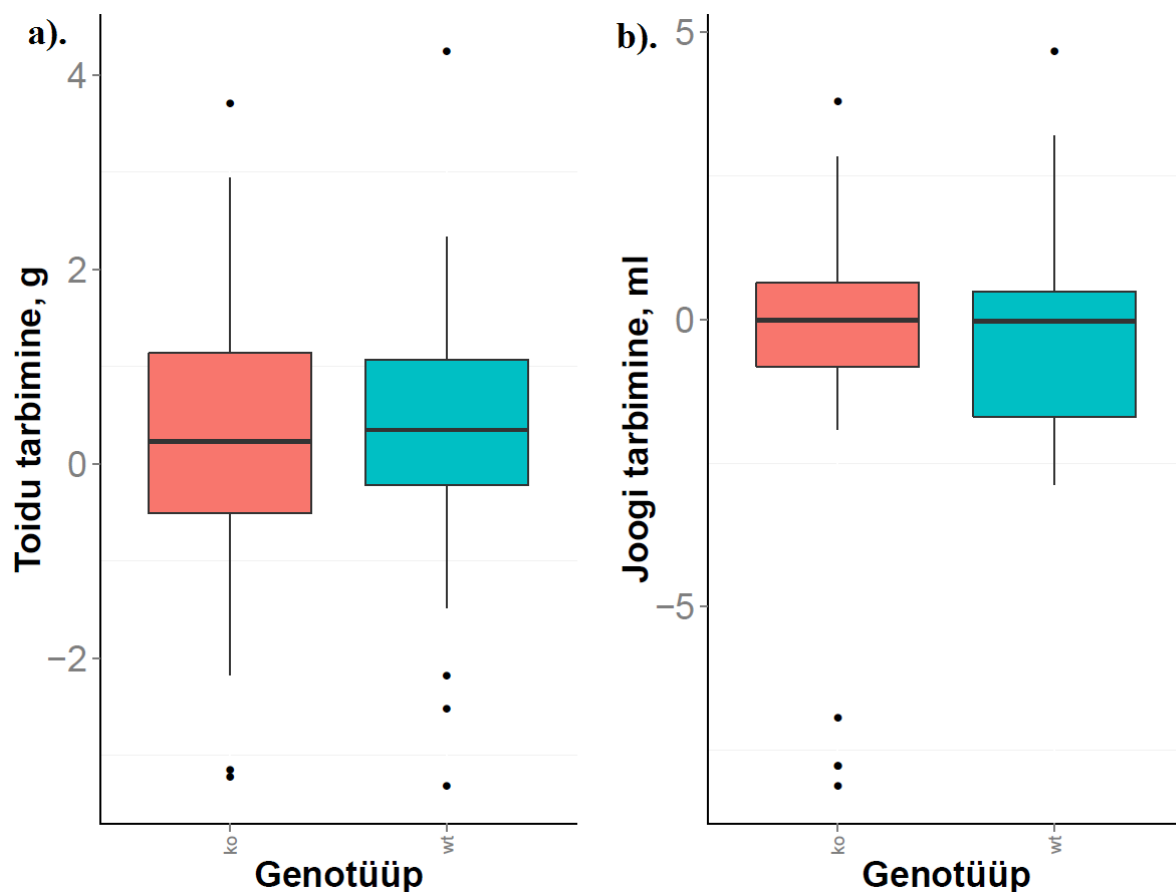
Joonis 7. TRPM8 tuvastamine wt hipokampuses 100-kordse suurendusega objektiiviga. a). Wt hiire IHC kontroll 100-kordse suurendusega objektiiviga. **b).** Wt hiire TRPM8 IHC 100-kordse suurendusega objektiiviga. Toluensinine – tuumad, tumepruun (DAB) – TRPM8 neuronite membraani ümbruses.

Antud töös uuriti erineva genotüübiga hiirte kehakaalu ning katse lõpuks kaotatud kaalu erinevusi. WFS1-puudulikud hiired kaalusid keskmiselt $18,38 \pm 2,504$ g ning wt hiired $28,06 \pm 3,590$ g. WFS1-puudulikel hiirtel oli märgatavalt madalam kehakaal wt hiirtega võrreldes (joonis 8a). Eesmärgiks oli näidata, et WFS1-puudulikel hiirtel on madalam kehakaal ning nad kaotavad oma kaalust katse lõpuks rohkem võrreldes wt hiirtega. Genotüüpide vahel ei olnud mentoolist sõltuvat kehakaalu muutuse erinevust katse lõpuks ($p > 0,05$). Kuigi WFS1-puudulikud hiired on stressile vastuvõtlikud, siis mentoolita grupp ei kaotanud oma kehakaalust rohkem võrreldes wt mentoolita grupiga (joonis 8b).



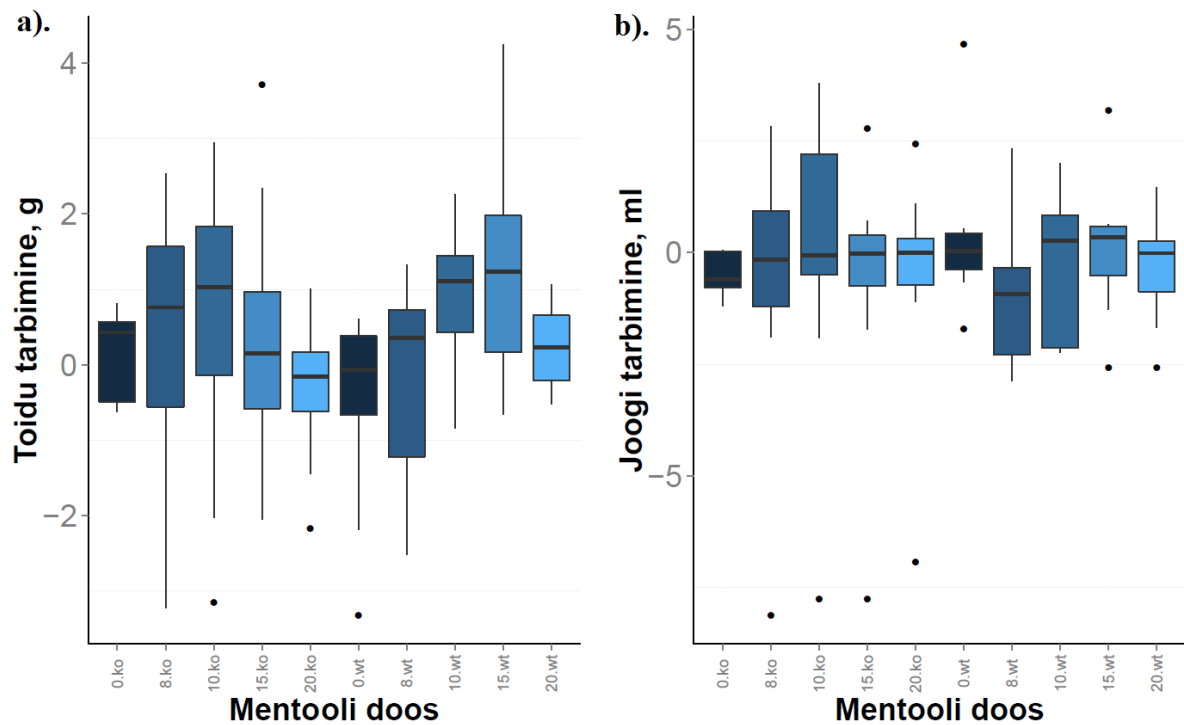
Joonis 8. Kehakaalu ning katse lõpuks kaotatud kaalu võrdlus erineva genotüübiga hiirtel. Kehakaalu võrdlus genotüüpide vahel hiire kohta. a). Kehakaalu muutuse võrdlus genotüüpide vahel hiire kohta katse lõpuks. b). Genotüüpide vahel ei olnud mentoolist sõltuvat kehakaalu muutuse erinevust katse lõpuks. Wt - metsiktüüpi hiirte kehakaal (g), ko – WFS1-puudulike hiirte kehakaal (g), 0 - mentooli ei manustatud, 1 – manustati mentooli.

Toidu ja joogi analüüsi eesmärgiks oli näidata, et WFS1-puudulikud hiired tarbivad vähem toitu ja vett. WFS1-puudulikud hiired tarbisid keskmiselt $1,475 \pm 1,026$ g toitu ning $1,754 \pm 2,213$ ml vett päevas. Wt hiired tarbisid keskmiselt $2,480 \pm 1,099$ g toitu ning $2,629 \pm 1,584$ ml vett päevas. WFS1-puudulikel hiirtel oli statistiliselt madalam toidu ja joogi tarbimine võrreldes wt hiirtega, kui neile mentooli ei manustatud ($p < 0,05$) (joonis 9).



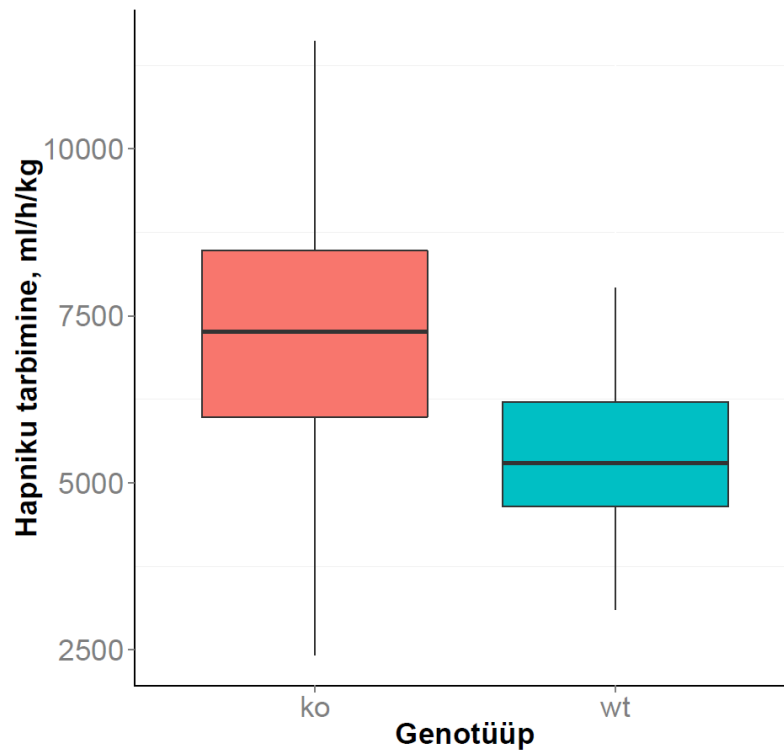
Joonis 9. Toidu ja joogi tarbimise võrdlus erineva genotüübiga hiirtel. a). Toidu tarbimise võrdlus genotüüpide vahel hiire kohta. **b).** Joogi tarbimise võrdlus genotüüpide vahel hiire kohta. *Wt* - metsiktüüpi hiirte toidu (g) või joogi (ml) tarbimine, *ko* - *WFS1*-puudulike hiirte toidu (g) või joogi tarbimine (ml).

Antud töös uuriti kas erinevad mentooli doosid põhjustavad erineva genotüübiga hiirte toidu ja joogi tarbimises muutusi, kuid genotüüpide vahel ei olnud erinevatest mentooli doosidest sõltuvat mõju toidu ja joogi tarbimisele ($p > 0,05$) (joonis 10). Mentooli manustamise käigus toidu ja joogi tarbimised erinevate genotüüpide vahel ei erinenud ning *WFS1*-puudulikel hiirtel tõusis toidu ja joogi tarbimine päevas *wt* hiirte tasemele.



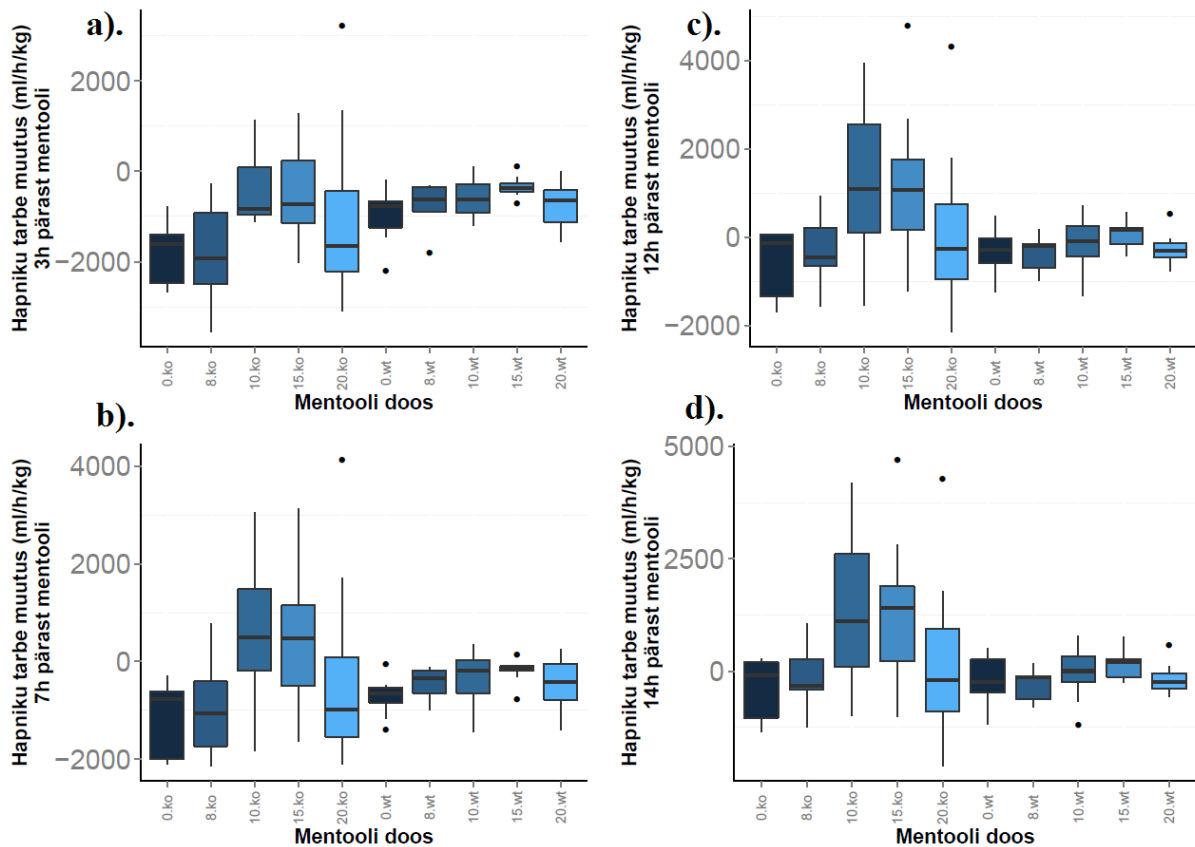
Joonis 10. Mentooli doosist sõltuv toidu ja joogi tarbimise võrdlus erineva genotüübiga hiirtel. a). Mentooli doosist sõltuva toidu tarbimise võrdlus genotüüpide vahel hiire kohta. b). Mentooli doosist sõltuva joogi tarbimise võrdlus genotüüpide vahel hiire kohta. Wt - metsiktüüpi hiirte toidu (g) või joogi (ml) tarbimine, ko – WFS1-puudulike hiirte toidu (g) või joogi tarbimine (ml).

Hapniku tarbimise analüüsi eesmärgiks oli uurida, kas WFS1-puudulikel hiirtel on madalam O_2 tarve võrreldes wt hiirtega. WFS1-puudulikel hiirtel oli keskmine O_2 tarve $7290 \pm 1815,595$ ml/h/kg ning wt hiirtel $5435 \pm 1108,22$ ml/h/kg. Katse analüüsi tulemustest selgus, et WFS1-puudulikel hiirtel oli statistiliselt kõrgem hapniku tarbimine kui wt hiirtel ($p < 0,05$) (joonis 11).



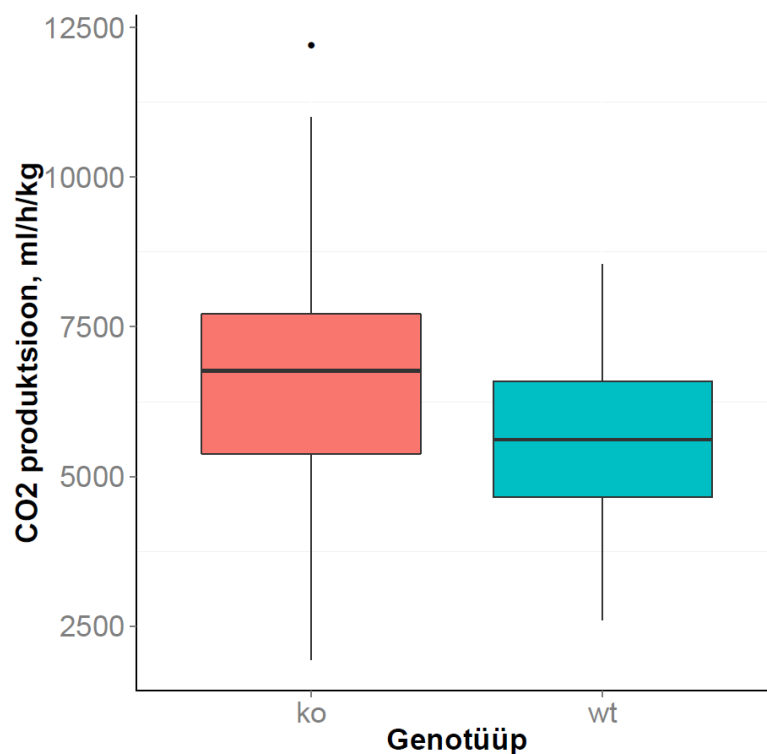
Joonis 11. Hapniku tarbimise võrdlus erineva genotüübiga hiirtel. *Wt* - metsiktüüpi hiirte hapniku tarve ml/h/kg, *ko* – WFS1-puudulike hiirte hapniku tarve ml/h/kg.

Lisaks uuriti kuidas mentool mõjutab erineva genotüübiga hiirte keskmist hapniku tarbimist. Keskmise hapniku tarbe muudu analüüs näitas, et mentooli mõju avaldus alles 12 ja 14 tundi pärast manustamist ning oluliselt tugevamini WFS1-puudulikel hiirtel ($p < 0,05$) (joonis 12). Kõige suuremat mõju avaldasid mentooli doosid 10 mg/kg ja 15 mg/kg. Kõik mentooli doosid mõjutasid WFS1 ko hiirte hapnikutarvet, kuid kõige tugevami mõjus 20 mg/kg mentooli doos ($p < 0,05$). Hapniku tarbe muudu analüüs näitas, et mentooli doosid ei omanud mõju wt hiirtele ($p > 0,05$).



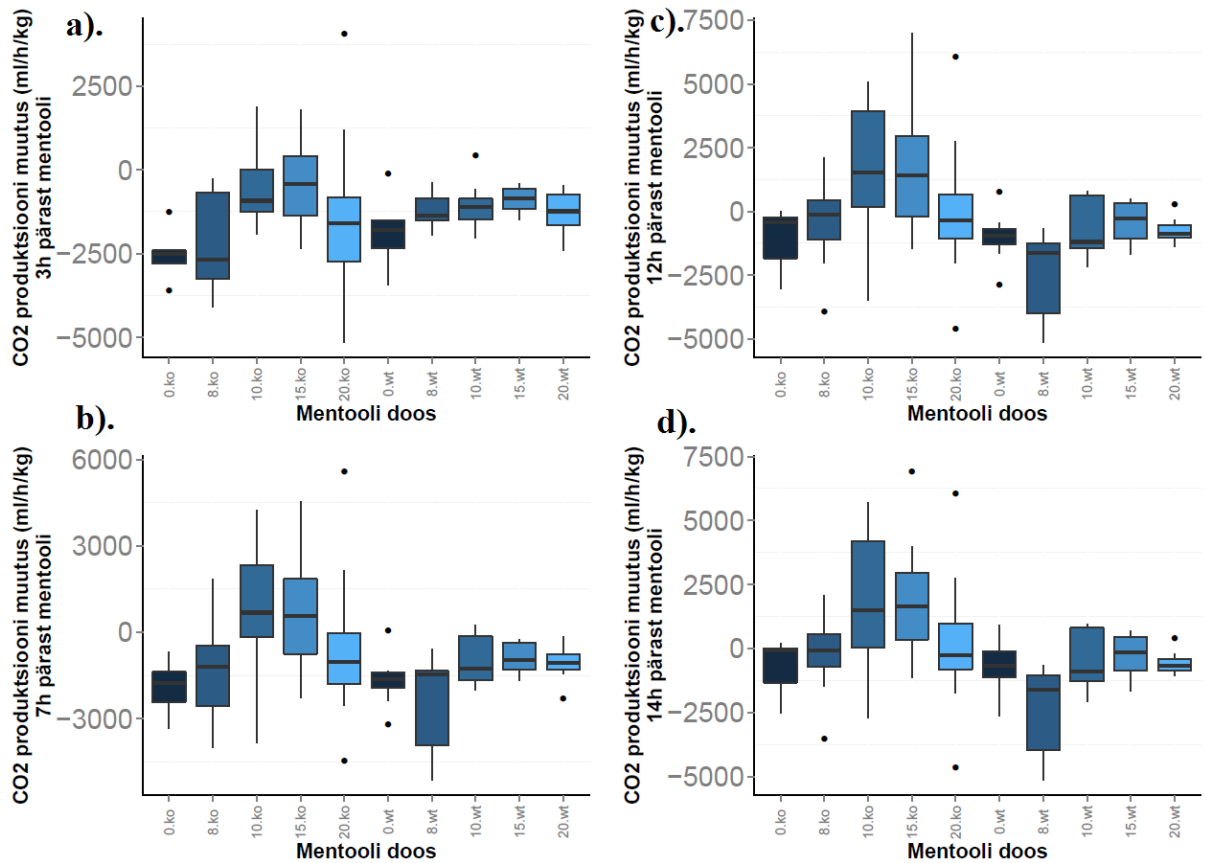
Joonis 12. Hapniku tarbimise muutuse võrdlus erineva genotüübiga hiirtel. Hapniku tarbimise muudu võrdlus genotüüpide vahel hiire kohta 3h (a), 7h (b), 12h (c) ja 14h (d) pärast mentooli manustamist. Wt - metsiktüüpi hiirte hapniku tarve ml/h/kg, ko – WFS1-puudulike hiirte hapniku tarve ml/h/kg.

Süsihappegaasi produktsiooni analüüsi eesmärgiks oli uurida, kas WFS1-puudulikel hiirtel on madalam CO₂ produktsioon kui wt hiirtel. WFS1-puudulikud hiired eraldasid keskmiselt 6827 ± 2176,961 ml/h/kg CO₂ ning wt hiirte 5551 ± 1325,548 ml/h/kg. Analüüsi tulemustest selgus, et süsihappegaasi produktsioon oli WFS1 ko hiirtel oluliselt kõrgem võrreldes wt hiirtega (p<0,05) (joonis 13).



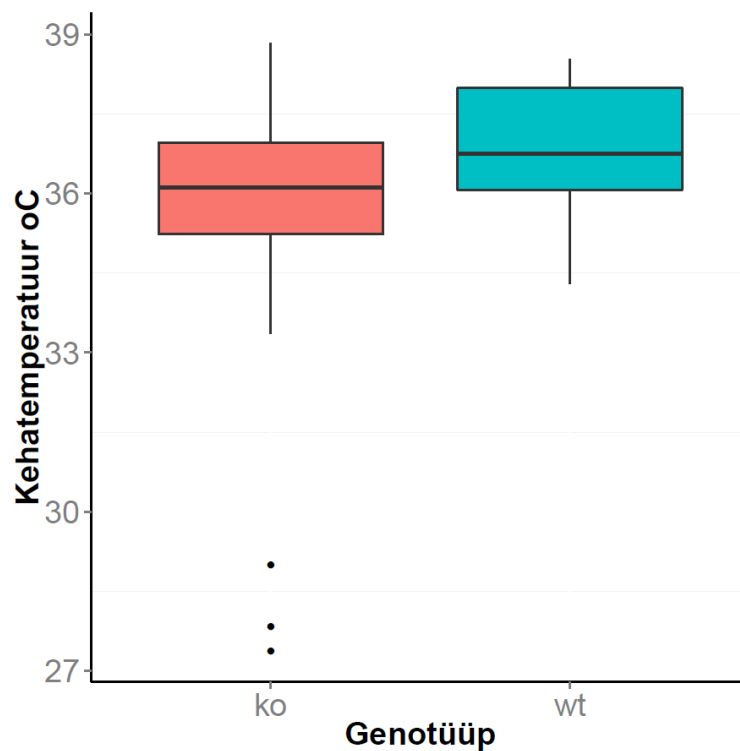
Joonis 13. Süsihappegaasi produktsiooni võrdlus erineva genotüübiga hiirtel. *Wt* - metsiktüüpi hiirte CO₂ produktsioon ml/h/kg, *ko* – WFS1-puudulike hiirte CO₂ produktsioon ml/h/kg.

Lisaks vaadeldi kuidas erinevad mentooli doosid mõjutavad erineva genotüübiga hiirte CO₂ produktsiooni. Katse analüüsi tulemustest selgus, et erinevad mentooli doosid suurendasid WFS1-puudulike hiirte keskmist CO₂ produktsiooni, kuid vähendasid seda *wt* hiirtel. Mentooli doos 20 mg/kg mõjutas WFS1-puudulike hiirte keskmist CO₂ produktsiooni negatiivselt. Mentool aga ei mõjutanud *wt* hiirte keskmist CO₂ produktsiooni. Mentool avaldas statistilist mõju WFS1-puudulikele hiirtele 7 tundi pärast manustamist võrreldes *wt* hiirtega. Erinevus genotüüpide vahel oli kõige suurem 14 tundi pärast mentooli manustamist ($p < 0,05$). Kõige tugevamat mõju CO₂ produktsioonile avaldasid doosid 10 mg/kg ja 15 mg/kg (joonis 14).



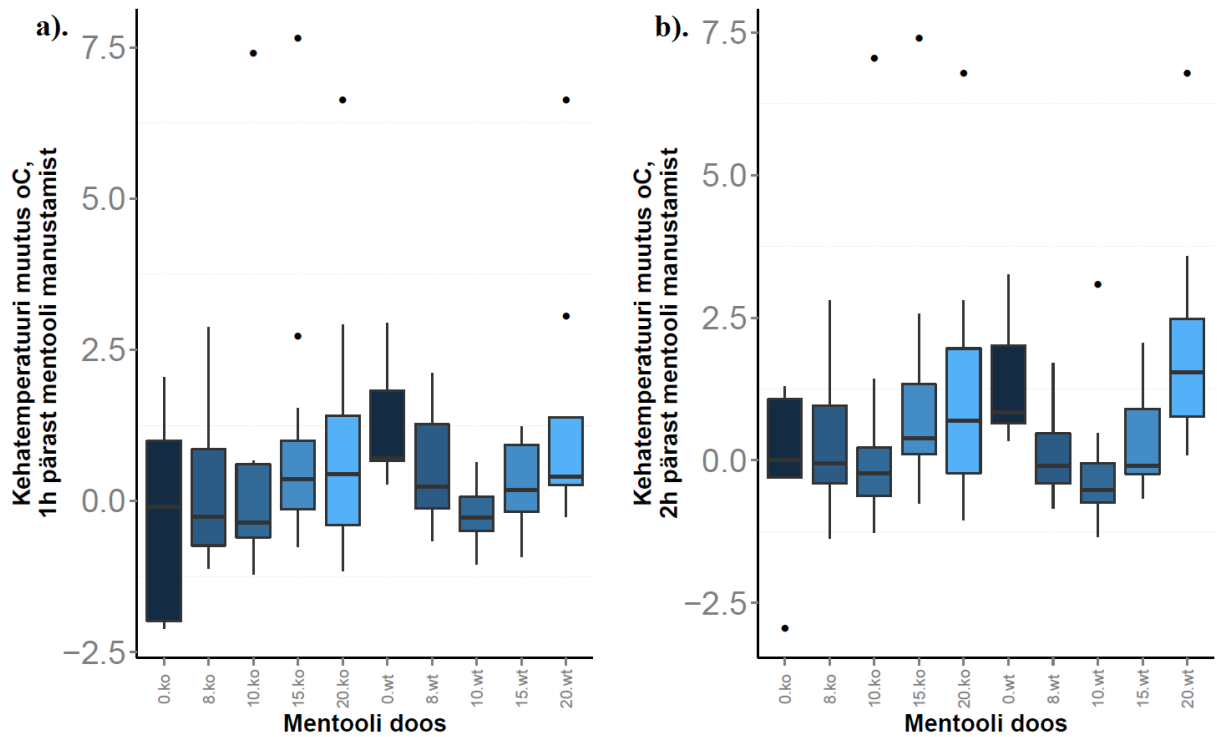
Joonis 14. Süsihappegaasi produktsiooni muutuse võrdlus erineva genotüübiga hiirtel. CO₂ produktsiooni muutuse võrdlus genotüüpide vahel hiire kohta 3h (a), 7h (b), 12h (c) ja 14h (d) pärast mentooli manustamist. Wt - metsiktüüpi hiirte CO₂ produktsioon ml/h/kg, ko – WFS1-puudulike hiirte CO₂ produktsioon ml/h/kg.

Kehatemperatuuri analüüsi eesmärgiks oli uurida, kas WFS1-puudulikel hiirtel on madalam kehatemperatuur võrreldes wt hiirtega. Analüüsi tulemused näitasid, et WFS1-puudulikel hiirtel oli kehatemperatuur statistiliselt madalam kui wt hiirtel ($p < 0,05$) (joonis 15).



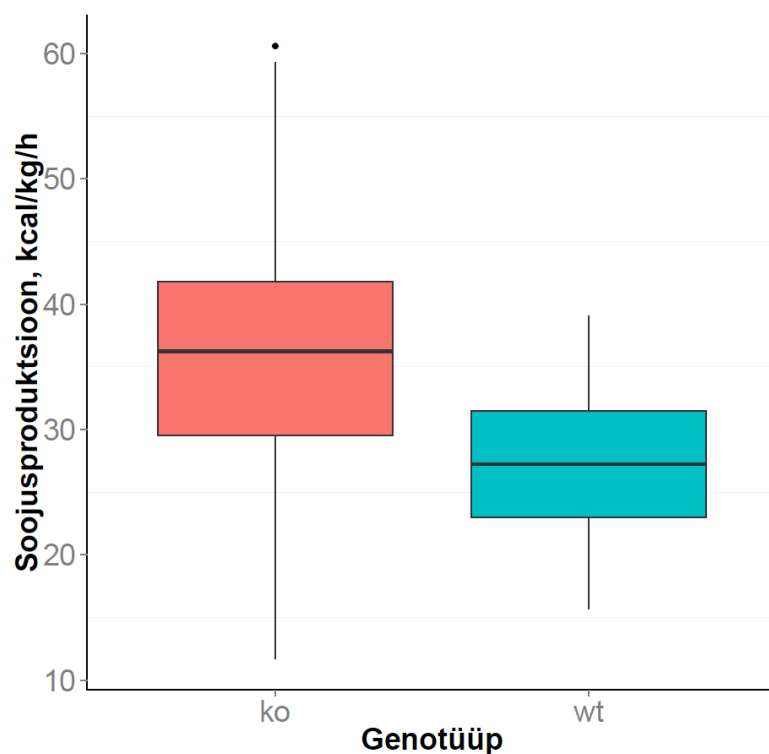
Joonis 15. Temperatuuride võrdlus erineva genotüübiga hiirtel. *Wt* - metsiktüüpi hiirte temperatuur °C, *ko* – *WFS1*-puudulike hiirte temperatuur °C.

Lisaks uuriti, kuidas erinevad mentooli doosid mõjutavad erineva genotüübiga hiirte kehatemperatuuri 1 ja 2 tundi pärast mentooli manustamist, kuid katse käigus hiirtele manustatud mentool ei põhjustanud kehatemperatuur statistilist muutust 1 ($p > 0,05$) ega 2 ($p > 0,05$) tundi manustamise järgselt (joonis 16).



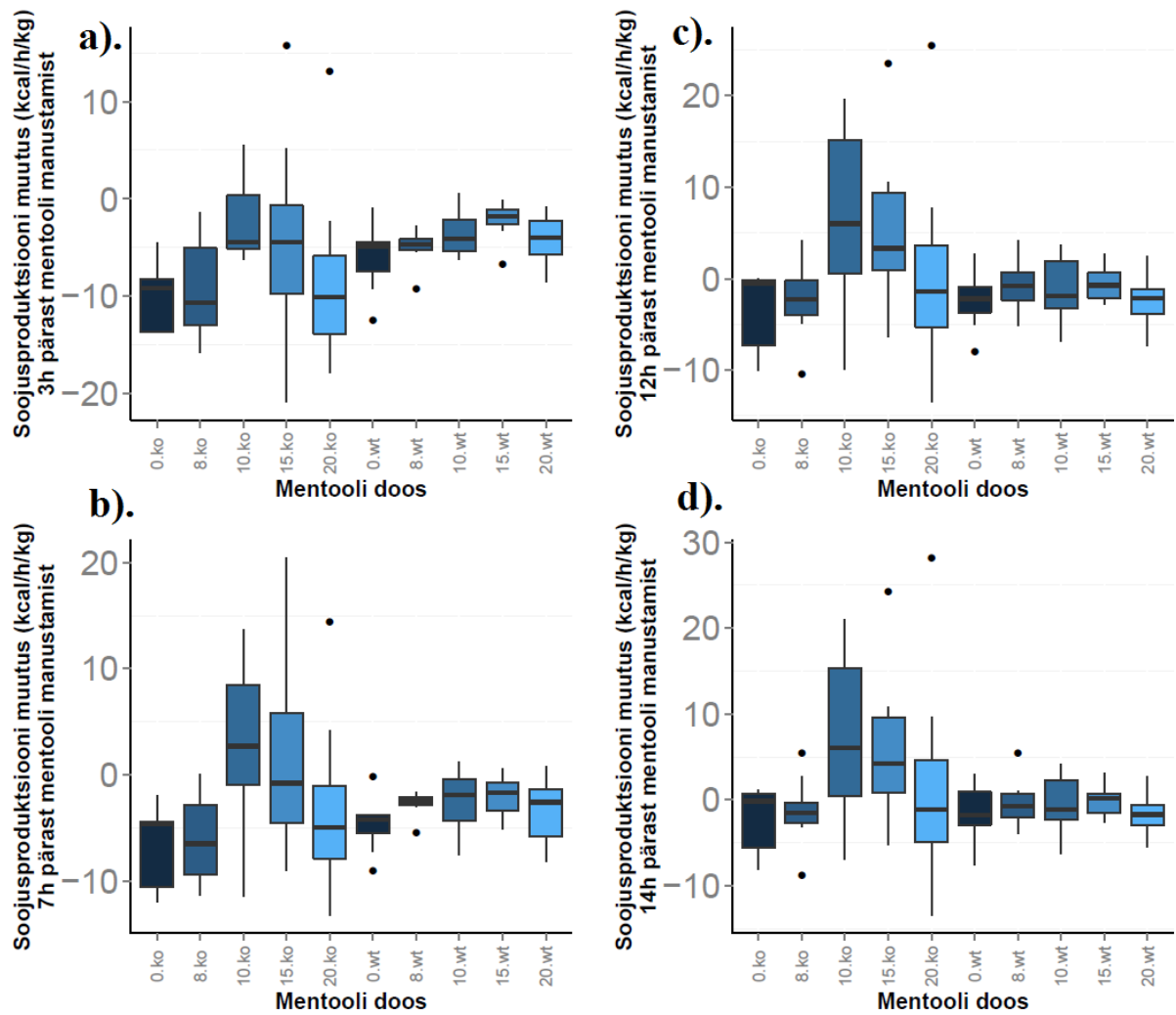
Joonis 16. Temperatuuride võrdlus erineva genotüübiga hiirtel. Temperatuuride erinevus 1h (a) ja 2h (b) pärast mentooli manustamist genotüüpide vahel hiire kohta. Wt - metsiktüüpi hiirte temperatuur °C, ko – WFS1-puudulike hiirte temperatuur °C.

Soojusproduksiooni analüüsi eesmärgiks oli uurida, kas WFS1-puudulikel hiirtel on madalam soojusproduksioon võrreldes wt hiirtega. Analüüsi tulemused näitasid, et WFS1-puudulikel hiirtel oli märkimisväärselt kõrgem soojusproduksioon kui wt hiirtel ($p < 0,05$) (joonis 17).



Joonis 17. Soojusproduktsooni võrdlus erineva genotüübiga hiirtel. *Wt* - metsiktüüpi hiirte soojusproduktsoon (kcal/kg/h), *ko* – *WFS1*-puudulike hiirte soojusproduktsoon (kcal/kg/h).

Katsete käigus uuriti ka kuidas erinevad mentooli doosid mõjuvad erineva genotüübiga hiirte soojusproduktsooni muudule. Katse analüüsi tulemustest selgus, et *WFS1*-puudulikel hiirtel oli 3 tundi mentooli manustamise järgselt statistiliselt suurem soojusproduktsooni muutus kui *wt* hiirtel ($p < 0,05$), kuid see ei sõltunud manustatud mentooli doosist ($p > 0,05$). *WFS1*-puudulikel hiirtel oli 12 ja 14 tundi pärast mentooli manustamist doosist sõltuv soojusproduktsooni erinevus võrreldes *wt* hiirtega ($p < 0,05$). Kõige suuremat mõju avaldasid mentooli doosid 10 mg/kg ja 15 mg/kg (joonis 18).



Joonis 18. Soojusproduktiooni võrdlus erineva genotüübiga hiirtel. Soojusproduktioonide erinevus 3h (a), 7h (b), 12h (c) ja 14h (d) pärast mentooli manustamist genotüüpide vahel hiire kohta. Wt - metsiktüüpi hiirte soojusproduktioon kcal/(kg*h), ko – WFS1-puudulike hiirte soojusproduktioon kcal/(kg*h).

2.4. Arutelu

Antud töös uuriti TRPM8 kanali paiknemist WFS1-puudulike ja wt hiirte hipokampuses *in vitro*. Lisaks võrreldi erinevaid ainevahetuse näitajaid, nagu hapniku tarve, süsihappegaasi produktsioon, toidu ja joogi tarbimine, ning mentooli mõju neile. Samuti võrreldi kahe grupi kehakaalu erinevusi.

WFS1-puudulike hiirte hipokampusest tehtud RNA-sekveneerimine näitas, et WFS1-puudulikel hiirtel on kõrgem TRPM8 ekspressioon võrreldes wt hiirtega (Kõks *et al.*, avaldamata andmed). TRPM8 immuunohistokeemilistest uuringutest hipokampuses selgus, et nimetatud kanal asub hipokampuses ja positiivne IHC kontroll hipokampuse neuronite membraanide ümbruses on värvunud tugevami võrreldes negatiivse IHC kontrolliga. IHC analüüsist võib järeldada, et TRPM8 paikneb neuronite ümbruses, kuid ei saa teha järeldust, et TRPM8-t oleks kvantitatiivselt rohkem WFS1-puudulike hiirte positiivse IHC kontrolli koelõigul võrreldes wt hiirtega. Taust oli positiivsel IHC koelõigu kontrollil tugevam võrreldes negatiivsega. Tajino *et al.* (2011) on näidanud, et mentool või madal temperatuur põhjustab hiire sisetemperatuuri tõusu, mis sõltub TRPM8 ekspressioonist, mis omakorda oli korrelatsioonis UCP1 ekspressiooniga BAT-is. Samuti näidati, et TRPM8 analoogid kutsuvad esile termogeense käitumise hiirtes, kes hakkavad külmas ruumis soojemat kohta otsima. TRPM8 ko hiirte sisetemperatuur alanes jahedas ruumis võrreldes wt hiirtega, kelle sisetemperatuur tõusis. Samas kehatemperatuur alanes märgatavalt nii TRPM8 ko hiirtel kui wt hiirtel, viidates sellele, et TRPM8 indutseeritud kehasisene termogenees ei ole piisav, soojendamaks nahka jahtumise eest (Tajino *et al.*, 2011). TRPM8 ko hiirtel on umbes 3% neuronitest külmatundlikud ning nad ei suuda teha vahet soojal (30°C) ega külmal (kuni 15°C) temperatuuril (Bautista *et al.*, 2007).

Antud töös võrreldi WFS1-puudulike hiirte ja wt hiirte kehakaalusid ning enne katset oli WFS1-puudulikel hiirtel märgatavalt madalam kehakaal kui wt hiirtel. Varasemalt on näidatud, et WFS1-puudulikud hiired kaaluvad vähem (Koks *et al.*, 2009) ning neil on kahjustunud glükoosi metabolism (Noormets *et al.*, 2011). WFS1-puudulikel hiirtel on häiritud ka kohanemine stressi suhtes (Luuk *et al.*, 2009) ning Noormets *et al.* (2014) näitas, et WFS1-puudulikud hiired kaaluvad vähem kui wt hiired ja kaotavad katse lõpuks rohkem kehakaalu. Antud töös kaalusid WFS1-puudulikud hiired samuti vähem võrreldes wt hiirtega, kuid wt hiired kaotasid katse lõpuks rohkem kehakaalu kui WFS1-puudulikud hiired. Ma *et al.* (2012) on näidanud, et kehakaal ei erinenud mentooli saanud hiirtel võrreldes hiirtega, kes ei saanud mentooli. Mentooli saanud hiirtel oli suurenenud aktiivsus ning kehatemperatuur.

Ma *et al.* (2012) järeldasid, et mentool mõjub põhiliselt keharasvale, kuid ei mõjuta teisi kehakaalu mõjutavaid komponente.

Seega on oluline uurida Wolframi sündroomist põhjustatud ainevahetuse muutusi, sest WS-iga patsientidel esinevad neurodegeneratiivsed häired (Noormets *et al.*, 2014) ning varasemalt on näidatud, et patsientidel, kellel on neurodegeneratiivsed haigused nagu Alzheimeri, Parkinsoni või Huntingtoni tõbi, on häired glükoosi metabolismis, suurenenud insuliini resistentsus ning ebanormaalne isu (Cai *et al.*, 2012). Huntingtoni tõve patsientidel esineb tõsine kaalulangus, kuigi neil on normaalne isu ja nad tarvitavad kõrge kalorsusega toitu (Morales *et al.*, 1989; Trejo *et al.*, 2004; Cai *et al.*, 2012), samas on neil kõrgem energiakulu (Pratley *et al.*, 2000; Stoy & McKay, 2000; Gaba *et al.*, 2005; Cai *et al.*, 2012). Samad tunnused on Parkinsoni tõve patsientidel (Cai *et al.*, 2012). Alzheimeri tõbe põdevatel patsientidel on ebanormaalselt madal leptiini tase (Olsson *et al.*, 1998; Power *et al.*, 2001). Cai *et al.* (2012) on arvanud, et Huntingtoni ja Parkinsoni tõbi on seotud ainevahetuse väärtalitlustega. Uuringud on näidanud, et ravimeetodid, mis on suunatud ainevahetuse homöostaasi taastamisele, võivad parandada kognitiivseid ja motoorseid funktsioone ning samuti pikendada Alzheimeri või Huntingtoni tõbe põdevate inimeste eluiga (Watson *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2009).

Ma *et al.* (2012) näitasid, et tarbitud toidu kogused ei erinenud mentooli saanutel võrreldes nendega, kes ei saanud mentooli. Antud töös toidu ja joogi analüüside tulemused näitasid, et WFS1-puudulikel hiirtel oli statistiliselt madalam toidu ja joogi tarbimine võrreldes wt hiirtega, kui neile mentooli ei manustatud. Mentooli manustamise järgselt toidu ja joogi tarbimised erinevate genotüüpide vahel enam ei erinenud ning see ei sõltunud mentooli doosist. WFS1-puudulikel hiirtel tõusis toidu ja joogi tarbimine wt hiirte tasemele. Sellest tulenevalt võib järeldada, et mentool põhjustas WFS1 ko hiirtel tugevama termogeneesist ajendatud käitumise, millest tulenevalt nad hakkasid tarbima rohkem vett ja toitu.

Ma *et al.* (2012) katses tõstis mentooli manustamine märgatavalt wt hiirte O₂ tarbimist võrreldes TRPM8 ko hiirtega, viidates sellele, et mentool suurendab puhkeseisundis ainevahetust, aktiveerides TRPM8. Antud töös oli WFS1-puudulikel hiirtel statistiliselt kõrgem hapniku tarbimine kui wt hiirtel. See on kooskõlas Ma *et al.* (2012) tulemustega, sest WFS1 ko hiirtel on TRPM8 ekspressioon kõrgem (Köks *et al.* avaldamata andmed). Kozyreva *et al.* (2013) katsed näitasid, et 1% mentooli lahus tõstis vähemalt 30% O₂ tarbimist ning CO₂ produktsiooni, kui katseloomi soojendati. Hingamiskoefitsent aga ei muutunud soojendamisel. Termoneutraalsetes tingimustes vähendas mentool hingamiskoefitsenti 10% võrra, suurendades O₂ tarvet, kuid CO₂ produktsioon jäi samaks (Kozyreva *et al.*, 2013).

Käesolevas töös vähendas mentool samuti WFS1-puudulike ja wt hiirte hapniku tarvet, kuid 8 mg/kg mentooli doos suurendas WFS1-puudulike hiirte O₂ tarvet. Mentooli mõju avaldus alles 12 ja 14 tundi pärast manustamist ning oluliselt tugevamini WFS1-puudulikel hiirtel. Kõige suuremat mõju avaldasid mentoolid doosid 10 mg/kg ja 15 mg/kg. Kõik mentooli doosid mõjutasid statistiliselt WFS1 ko hiirte hapniku tarvet, kuid kõige tugevamat mõju avaldas 20 mg/kg mentooli doos. Mentooli doosid ei omanud statistilist mõju wt hiirte hapniku tarbe muudule.

Antud töös oli WFS1-puudulike hiirte keskmine CO₂ produktsioon kõrgem võrreldes wt hiirtega ning erines seega Kozyreva *et al.* (2013) tulemustest. Mentooli doosid alla 20 mg/kg suurendasid WFS1 ko hiirte keskmist CO₂ produktsiooni muutust, samas wt hiirtel aga vähendasid. Mentooli doos 20 mg/kg mõjutas WFS1 ko hiirte keskmist CO₂ produktsiooni muutust seevastu negatiivselt. Mentooli toime CO₂ produktsioonile avaldus 7 tundi pärast manustamist ning mõjus WFS1-puudulikele hiirtele tugevamini kui wt hiirtele ning see erinevus oli kõige suurem 14 tundi pärast manustamist. Kõik mentooli doosid mõjutasid statistiliselt WFS1 ko hiirte CO₂ produktsiooni, kuid kõige tugevamini mõjusid mentooli doosid 10 mg/kg ja 15 mg/kg. Wt hiirte CO₂ produktsiooni muudule mentooli erinevad kogused statistilist mõju ei avaldanud.

WFS1-puudulikel hiirtel oli märkimisväärselt kõrgem soojusproduktsioon võrreldes wt hiirtega. Noormets *et al.* (2014) uurimused aga ei tuvastanud energia ainevahetuses erinevusi WFS1-puudulike ja wt hiirte vahel. Ainukene erinevus, mis leiti, oli O₂ tarbimise erinevus WFS1-puudulike emas- ja isashiirte vahel. Kahe uurimuse erinevus võib olla tingitud hiirte vanusest. Noormets *et al.* (2014) katses kasutati 2-3 kuu vanuseid hiiri, kuid antud töös kasutatud hiired olid 9-12 kuu vanused.

Mentooli 50% efektiivne kontsentratsioon (EC₅₀) TRPM8 jaoks on 4,1 µM (Behrendt *et al.*, 2004). Masamoto *et al.* (2009) katsed näitasid, et 20 mg/kg L-mentooli manustamine hiirtele kanüüli kaudu makku põhjustas käärsoole ja abaluude vahel oleva pruuni rasvkoe temperatuuri tõusu, kuid ei mõjutanud saba temperatuuri. Antud katse käigus ei tõusnud hiirte kehatemperatuur 1 ega 2 tundi pärast erinevate mentooli dooside manustamist. Mentooli mõju puudumine hiirte kehatemperatuuri võib seletada Masamoto *et al.* (2009) tulemustega, kus uurimused näitasid, et mentool indutseerib termogeneesi, kuid ei mõjuta soojuse levimist.

Ma *et al.* (2012) katsetes suurendas mentooli manustamine märgatavalt wt hiirte lokomotoorset aktiivsust, kuid ei mõjutanud TRPM8 ko hiiri. Mentooli manustamine tõstis märgatavalt ka wt hiirte rektaalset temperatuuri. Ma *et al.* (2012) mõõtsid ambulatoorselt 24

tundi sisetemperatuuri ning täheldasid, et päeval ajal ei erine sisetemperatuur märgatavalt, küll aga öisel ajal, kui sisetemperatuur tõuseb wt hiirtel märgatavalt kõrgemale võrreldes kontrollgrupiga. Käesolevas töös mõõdeti hiirte rektaalset temperatuuri 1 ja 2 tundi pärast mentooli manustamist ning ei WFS1-puudulikel ega wt hiirtel täheldatud märgatavat temperatuuri tõusu erinevate dooside juures. Mentooli manustati hiirtele päeval ning on võimalik, et 2 tundi manustamise järgselt ei jõudnud mentooli mõju veel avalduda.

Kolm tundi pärast mentooli manustamist oli WFS1-puudulikel hiirtel statistiliselt suurem soojusproduktiooni muutus võrreldes wt hiirtega, kuid see ei sõltunud manustatud mentooli doosist. WFS1-puudulikel hiirtel oli 12 ja 14 tundi mentooli manustamise järgselt doosist sõltuv soojusproduktiooni erinevus võrreldes wt hiirtega. Kõige suuremat mõju soojusproduktiooni muutusele avaldasid taas mentooli doosid 10 mg/kg ja 15 mg/kg.

WFS1-puudulikel hiirtel oli soojusproduktiooni muutus märgatav, kuid hajuv. Samas wt hiirtel püsis soojusproduktioon enam-vähem samal tasemel ning suuri muutusi erinevate mentooli doosidega ei olnud.

TRPM8, mille agonist on mentool, on WFS1-puudulikel hiirtel hipokampuses üleekspresseeritud (Kõks *et al.*, avaldamata andmed). WFS1-puudulikel hiirtel on madalam kehakaal võrreldes wt hiirtega ning see viitab mutanthiirte ainevahetuse häiretele. Katse käigus selgus, et kõige efektiivsemad olid 10 mg/kg ja 15 mg/kg mentooli doosid. Katse andmetest võib oletada, et mentool aktiveerib WFS1-puudulikel hiirtel pruuni rasvkoega seotud termogeneesi, kuid organism ei suuda seda kontrollida, mistõttu nende soojusproduktiooni muutus erineb wt hiirte omast. Lisaks võivad sellest olla põhjusatud hapniku suurem tarbimine ning hilisem CO₂ produktiooni tõus WFS1-puudulikel hiirtel.

Kokkuvõte

WFS1-puudulike hiirte (ko) hipokampuse RNA-sekveneerimisel selgus, et WFS1-puudulikel hiirtel on kõrgem mööduva retseptorpotentsiaaliga katiooni kanali M alaperekonna liikme 8 ekspressioon (TRPM8) (Kõks *et al.*, avaldamata andmed). TRPM8 on funktsionaalselt ekspresseeritud pruunides rasvarakkudes ning selle agonist mentool aktiveerib pruuni rasva (BAT). BAT-i stimuleerimine võiks pakkuda uusi ravivõimalusi, vähendamaks rasvumist ja sellega seotud haigusi (Seale *et al.*, 2007). Mentool võiks seega WFS1-puudulikele hiirtele manustatuna tõsta nende ainevahetuse aktiivsust rohkem võrreldes metsiktüüpi hiirtega (wt).

Käesolevas töös uuritigi TRPM8 olemasolu WFS1-puudulike ning wt hiirte hipokampuses. Lisaks vaadeldi mentooli mõju WFS1-puudulike ja wt hiirte ainevahetusele ja võrreldi nende füsioloogiliste näitajate erinevusi.

Uuritava TRPM8 kanali olemasolu leiti nii WFS1-puudulike kui wt hiirte hipokampuse neuronite vahelisel alal. Kvantitatiivne erinevus genotüüpide vahel ei olnud tuvastatav.

Metabolismi uuringutest selgus, et WFS1-puudulikel hiirtel oli madalam kehakaal, toidu ning joogi tarbimine, kuid suurem soojusproduksioon, hapniku tarbimine ja süsihappegaasi eraldamine võrreldes wt hiirtega. See viitab WFS1 ko hiirte ainevahetuse häiretele. Mentooli manustamise käigus ühtustusid toidu ja joogi tarbimised erinevate genotüüpide vahel, kuid doosist sõltuv mõju puudus. Mentool avaldas 12 ja 14 tundi manustamise järgselt mõju WFS1-puudulike hiirte hapniku tarbe muudule. Kõige tugevamat mõju avaldasid 10 mg/kg ja 15 mg/kg mentooli doosid. Erinevad mentooli doosid ei avaldanud wt hiirtele CO₂ produktsioonile mõju. Mentooli doosid alates 20 mg/kg põhjustasid WFS1 ko hiirte CO₂ produktsiooni muudu vähenemist. Erinevus genotüüpide CO₂ produktsiooni muudus oli kõige suurem 14 tundi pärast mentooli manustamist ning seda dooside 10 mg/kg ja 15 mg/kg juures. Samuti mõjusid mentooli doosid 10 mg/kg ning 15 mg/kg kõige tugevami WFS1-puudulike hiirte soojusproduksiooni muudule ning kõige suurem erinevus oli 12 ja 14 tundi pärast mentooli manustamist.

Mentool aktiveerib WFS1-puudulikel hiirtel pruuni rasvkoega seotud termogeneesi ning WFS1 ko hiirte soojusproduksiooni muutus erineb wt hiirte omast, mis võib põhjustada hapniku suurema tarbimise ning hilisema CO₂ produktsiooni tõusu. Edaspidiseks eesmärgiks on uurida mentoolist tingitud ainevahetuslike erinevuste põhjusi WFS1-puudulikes hiirtes ja TRPM8 funktsiooni selles.

Analysis of metabolic effects of menthol on WFS1-deficient mice

Marite Ehrlich

Summary

Wolfram syndrome (WS) is an inherited progressive autosomal recessive neurodegenerative disorder, also known as DIDMOAD (diabetes insipidus, early on-set insulin-dependent diabetes mellitus, progressive optic atrophy and sensorineural deafness). In addition, psychiatric illnesses such as depression and impulsive behavior are frequently observed in affected individuals. WS is caused by mutations in the WFS1 gene. WFS1 protein is present in the heart, pancreatic β -cells, lungs, spleen, placenta and skeletal muscle. WFS1 is a transmembrane glycoprotein localized in the endoplasmic reticulum (ER) and may participate in membrane trafficking, protein processing and/or regulation of cellular Ca^{2+} homeostasis. Loss of WFS1 function can cause abnormal Ca^{2+} homeostasis in the ER and induce ER stress. ER stress can increase cell apoptosis. This may cause the loss of β -cells and neural degeneration.

In mammals, there are two types of adipose tissue, white and brown. White adipose tissue is the primary source of energy storage, while brown adipose tissue (BAT) is specialized on energy expenditure.

The transient receptor potential cation channel subfamily M member 8 (TRPM8) is functionally present in brown adipocytes. The activation of TRPM8 by menthol up-regulates uncoupling protein-1 (UCP1) levels in brown adipocytes. The stimulation of BAT may offer new therapies to reduce obesity and other related diseases.

RNA-sequencing of hippocampus in WFS1-deficient mice showed that TRPM8 is over-regulated in these mice. Thus, administration of menthol to WFS1-deficient mice could increase the metabolic rate more in WFS1-deficient mice than compared to wild-type mice.

The aim of this study was to find out whether TRPM8 receptor is located in the hippocampus. The physiological differences between WFS1-deficient mice and wild-type mice were studied. In addition, the effect of menthol on the metabolic rate of WFS1-deficient mice compared to wild-type mice was studied.

The studies showed that WFS1-deficient mice had lower body weight, food and drink intake, but higher heat production, oxygen consumption and carbon dioxide release compared to

wild-type mice. The results indicated that mutant mice have a metabolic disorder. Menthol activates BAT induced thermogenesis in WFS1-deficient mice and their heat production change differs from wild-type mice resulting in higher oxygen consumption and later in a higher carbon dioxide release. Further studies are needed to study the cause of menthol effects on metabolism in WFS1-deficient mice and the role of TRPM8 in it.

Tänuavaldused

Käesoleva bakalaureusetöö autor avaldab sügavat tänu oma juhendajatele Marilin Ivaskile, Sulev Kõksile ja Margus Poogale ning lisaks Siim Suutrele abi ja kasulike nõuannete eest.

Kasutatud kirjandus

- Adams AE, Kelly OM & Porter RK.** (2010). Absence of mitochondrial uncoupling protein 1 affects apoptosis in thymocytes, thymocyte/T-cell profile and peripheral T-cell number. *Biochim Biophys Acta* **1797**, 807-816.
- Arch JR.** (2002). beta(3)-Adrenoceptor agonists: potential, pitfalls and progress. *Eur J Pharmacol* **440**, 99-107.
- Barrett TG, Bunday SE & Macleod AF.** (1995). Neurodegeneration and diabetes: UK nationwide study of Wolfram (DIDMOAD) syndrome. *Lancet* **346**, 1458-1463.
- Bartelt A, Bruns OT, Reimer R, Hohenberg H, Ittrich H, Peldschus K, Kaul MG, Tromsdorf UI, Weller H, Waurisch C, Eychmuller A, Gordts PL, Rinninger F, Bruegelmann K, Freund B, Nielsen P, Merkel M & Heeren J.** (2011). Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat Med* **17**, 200-205.
- Bautista DM, Siemens J, Glazer JM, Tsuruda PR, Basbaum AI, Stucky CL, Jordt SE & Julius D.** (2007). The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. *Nature* **448**, 204-208.
- Behrendt HJ, Germann T, Gillen C, Hatt H & Jostock R.** (2004). Characterization of the mouse cold-menthol receptor TRPM8 and vanilloid receptor type-1 VR1 using a fluorometric imaging plate reader (FLIPR) assay. *Br J Pharmacol* **141**, 737-745.
- Brennan CM, Breen EP & Porter RK.** (2006). Cold acclimation and oxygen consumption in the thymus. *Biochim Biophys Acta* **1757**, 1463-1468.
- Cai H, Cong WN, Ji S, Rothman S, Maudsley S & Martin B.** (2012). Metabolic dysfunction in Alzheimer's disease and related neurodegenerative disorders. *Curr Alzheimer Res* **9**, 5-17.
- Cannon B & Nedergaard J.** (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* **84**, 277-359.
- Cano A, Rouzier C, Monnot S, Chabrol B, Conrath J, Lecomte P, Delobel B, Boileau P, Valero R, Procaccio V, Paquis-Flucklinger V & Vialettes B.** (2007). Identification of novel mutations in WFS1 and genotype-phenotype correlation in Wolfram syndrome. *Am J Med Genet A* **143A**, 1605-1612.
- Carroll AM, Haines LR, Pearson TW, Fallon PG, Walsh CM, Brennan CM, Breen EP & Porter RK.** (2005). Identification of a functioning mitochondrial uncoupling protein 1 in thymus. *J Biol Chem* **280**, 15534-15543.
- Cederberg A, Gronning LM, Ahren B, Tasken K, Carlsson P & Enerback S.** (2001). FOXC2 is a winged helix gene that counteracts obesity, hypertriglyceridemia, and diet-induced insulin resistance. *Cell* **106**, 563-573.
- Clayton GM, Altieri S, Heginbotham L, Unger VM & Morais-Cabral JH.** (2008). Structure of the transmembrane regions of a bacterial cyclic nucleotide-regulated channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 1511-1515.
- Collier DA, Barrett TG, Curtis D, Macleod A, Arranz MJ, Maassen JA & Bunday S.** (1996). Linkage of Wolfram syndrome to chromosome 4p16.1 and evidence for heterogeneity. *Am J Hum Genet* **59**, 855-863.
- Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, Kuo FC, Palmer EL, Tseng YH, Doria A, Kolodny GM & Kahn CR.** (2009). Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med* **360**, 1509-1517.
- Enerback S, Jacobsson A, Simpson EM, Guerra C, Yamashita H, Harper ME & Kozak LP.** (1997). Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. *Nature* **387**, 90-94.
- Erler I, Al-Ansary DM, Wissenbach U, Wagner TF, Flockerzi V & Niemeyer BA.** (2006). Trafficking and assembly of the cold-sensitive TRPM8 channel. *J Biol Chem* **281**, 38396-38404.

- Feldmann HM, Golozoubova V, Cannon B & Nedergaard J.** (2009). UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality. *Cell Metab* **9**, 203-209.
- Fonseca SG, Fukuma M, Lipson KL, Nguyen LX, Allen JR, 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 SG, Ishigaki S, Osowski CM, Lu S, Lipson KL, Ghosh R, Hayashi E, Ishihara H, Oka Y, Permutt MA & Urano F.** (2010). Wolfram syndrome 1 gene negatively regulates ER stress signaling in rodent and human cells. *J Clin Invest* **120**, 744-755.
- Fujisawa T, Ikegami H, Kawaguchi Y & Ogihara T.** (1998). Meta-analysis of the association of Trp64Arg polymorphism of beta 3-adrenergic receptor gene with body mass index. *J Clin Endocrinol Metab* **83**, 2441-2444.
- Gaba AM, Zhang K, Marder K, Moskowitz CB, Werner P & Boozer CN.** (2005). Energy balance in early-stage Huntington disease. *Am J Clin Nutr* **81**, 1335-1341.
- Ghorbani M, Claus TH & Himms-Hagen J.** (1997). Hypertrophy of brown adipocytes in brown and white adipose tissues and reversal of diet-induced obesity in rats treated with a beta3-adrenoceptor agonist. *Biochem Pharmacol* **54**, 121-131.
- Granneman JG, Burnazi M, Zhu Z & Schwamb LA.** (2003). White adipose tissue contributes to UCP1-independent thermogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **285**, E1230-1236.
- Gunawardana SC & Piston DW.** (2012). Reversal of type 1 diabetes in mice by brown adipose tissue transplant. *Diabetes* **61**, 674-682.
- Hamann A, Flier JS & Lowell BB.** (1996). Decreased brown fat markedly enhances susceptibility to diet-induced obesity, diabetes, and hyperlipidemia. *Endocrinology* **137**, 21-29.
- Hansen L, Eiberg H, Barrett T, Bek T, Kjaersgaard P, Tranebjaerg L & Rosenberg T.** (2005). Mutation analysis of the WFS1 gene in seven Danish Wolfram syndrome families; four new mutations identified. *Eur J Hum Genet* **13**, 1275-1284.
- Harding HP & Ron D.** (2002). Endoplasmic reticulum stress and the development of diabetes: a review. *Diabetes* **51 Suppl 3**, S455-461.
- Heaton GM, Wagenvoord RJ, Kemp A, Jr. & Nicholls DG.** (1978). Brown-adipose-tissue mitochondria: photoaffinity labelling of the regulatory site of energy dissipation. *Eur J Biochem* **82**, 515-521.
- Hofmann S & Bauer MF.** (2006). Wolfram syndrome-associated mutations lead to instability and proteasomal degradation of wolframin. *FEBS Lett* **580**, 4000-4004.
- Hofmann S, Philbrook C, Gerbitz KD & Bauer MF.** (2003). Wolfram syndrome: structural and functional analyses of mutant and wild-type wolframin, the WFS1 gene product. *Hum Mol Genet* **12**, 2003-2012.
- Inokuma K, Ogura-Okamatsu Y, Toda C, Kimura K, Yamashita H & Saito M.** (2005). Uncoupling protein 1 is necessary for norepinephrine-induced glucose utilization in brown adipose tissue. *Diabetes* **54**, 1385-1391.
- Inokuma K, Okamatsu-Ogura Y, Omachi A, Matsushita Y, Kimura K, Yamashita H & Saito M.** (2006). Indispensable role of mitochondrial UCP1 for antiobesity effect of beta3-adrenergic stimulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **290**, E1014-1021.
- Inoue H, Tanizawa Y, Wasson J, Behn P, Kalidas K, Bernal-Mizrachi E, Mueckler M, Marshall H, Donis-Keller H, Crock P, Rogers D, Mikuni M, Kumashiro H, Higashi K, Sobue G, Oka Y & Permutt MA.** (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, Takahashi R, Yamaguchi S, Takei D, Yamada T, Inoue**

- H, Soga H, Katagiri H, Tanizawa Y & Oka Y.** (2004). Disruption of the WFS1 gene in mice causes progressive beta-cell loss and impaired stimulus-secretion coupling in insulin secretion. *Hum Mol Genet* **13**, 1159-1170.
- Jespersen NZ, Larsen TJ, Peijs L, Daugaard S, Homoe P, Loft A, de Jong J, Mathur N, Cannon B, Nedergaard J, Pedersen BK, Moller K & Scheele C.** (2013). A classical brown adipose tissue mRNA signature partly overlaps with brite in the supraclavicular region of adult humans. *Cell Metab* **17**, 798-805.
- Klingenberg M.** (1999). Uncoupling protein--a useful energy dissipator. *J Bioenerg Biomembr* **31**, 419-430.
- Klingenspor M.** (2003). Cold-induced recruitment of brown adipose tissue thermogenesis. *Exp Physiol* **88**, 141-148.
- Koks S, Soomets U, Paya-Cano JL, Fernandes C, Luuk H, Plaas M, Terasmaa A, Tillmann V, Noormets K, Vasar E & Schalkwyk LC.** (2009). Wfs1 gene deletion causes growth retardation in mice and interferes with the growth hormone pathway. *Physiol Genomics* **37**, 249-259.
- Kozak LP & Anunciado-Koza R.** (2008). UCP1: its involvement and utility in obesity. *Int J Obes (Lond)* **32 Suppl 7**, S32-38.
- Kozyreva TV, Tkachenko EY & Khramova GM.** (2013). Effects of pharmacological activation of TRPM8 ion channels on the thermoregulatory responses during warming. *Bull Exp Biol Med* **155**, 335-338.
- Kurokawa N, Young EH, Oka Y, Satoh H, Wareham NJ, Sandhu MS & Loos RJ.** (2008). The ADRB3 Trp64Arg variant and BMI: a meta-analysis of 44 833 individuals. *Int J Obes (Lond)* **32**, 1240-1249.
- Latorre R, Brauchi S, Orta G, Zaelzer C & Vargas G.** (2007). ThermoTRP channels as modular proteins with allosteric gating. *Cell Calcium* **42**, 427-438.
- Lee P, Greenfield JR, Ho KK & Fulham MJ.** (2010). A critical appraisal of the prevalence and metabolic significance of brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **299**, E601-606.
- Lidell ME & Enerback S.** (2010). Brown adipose tissue--a new role in humans? *Nat Rev Endocrinol* **6**, 319-325.
- Lin CS & Klingenberg M.** (1980). Isolation of the uncoupling protein from brown adipose tissue mitochondria. *FEBS Lett* **113**, 299-303.
- Lin JH, Walter P & Yen TS.** (2008). Endoplasmic reticulum stress in disease pathogenesis. *Annu Rev Pathol* **3**, 399-425.
- Lowell BB & Bachman ES.** (2003). Beta-Adrenergic receptors, diet-induced thermogenesis, and obesity. *J Biol Chem* **278**, 29385-29388.
- Lowell BB & Spiegelman BM.** (2000). Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature* **404**, 652-660.
- Luuk H, Koks S, Plaas M, Hannibal J, Rehfeld JF & 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, Sutt S, Lasner H, Abramov U, Kurrikoff K, Koks S & Vasar E.** (2009). Wfs1-deficient mice display impaired behavioural adaptation in stressful environment. *Behav Brain Res* **198**, 334-345.
- Ma S, Yu H, Zhao Z, Luo Z, Chen J, Ni Y, Jin R, Ma L, Wang P, Zhu Z, Li L, Zhong J, Liu D & Nilus B.** (2012). Activation of the cold-sensing TRPM8 channel triggers UCP1-dependent thermogenesis and prevents obesity. *J Mol Cell Biol* **4**, 88-96.
- Malhotra JD & Kaufman RJ.** (2007). Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxid Redox Signal* **9**, 2277-2293.
- Martin B, Golden E, Carlson OD, Pistell P, Zhou J, Kim W, Frank BP, Thomas S, Chadwick WA, Greig NH, Bates GP, Sathasivam K, Bernier M, Maudsley S,**

- Mattson MP & Egan JM.** (2009). Exendin-4 improves glycemic control, ameliorates brain and pancreatic pathologies, and extends survival in a mouse model of Huntington's disease. *Diabetes* **58**, 318-328.
- Masamoto Y, Kawabata F & Fushiki T.** (2009). Intra-gastric administration of TRPV1, TRPV3, TRPM8, and TRPA1 agonists modulates autonomic thermoregulation in different manners in mice. *Biosci Biotechnol Biochem* **73**, 1021-1027.
- McKemy DD, Neuhauser WM & Julius D.** (2002). Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* **416**, 52-58.
- Medlej R, Wasson J, Baz P, Azar S, Salti I, Loiselet J, Permutt A & Halaby G.** (2004). Diabetes mellitus and optic atrophy: a study of Wolfram syndrome in the Lebanese population. *J Clin Endocrinol Metab* **89**, 1656-1661.
- Montell C.** (2005). The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE* **2005**, re3.
- Morales LM, Estevez J, Suarez H, Villalobos R, Chacin de Bonilla L & Bonilla E.** (1989). Nutritional evaluation of Huntington disease patients. *Am J Clin Nutr* **50**, 145-150.
- Nibbelink M, Moulin K, Arnaud E, Duval C, Penicaud L & Casteilla L.** (2001). Brown fat UCP1 is specifically expressed in uterine longitudinal smooth muscle cells. *J Biol Chem* **276**, 47291-47295.
- Nilius B, Mahieu F, Karashima Y & Voets T.** (2007). Regulation of TRP channels: a voltage-lipid connection. *Biochem Soc Trans* **35**, 105-108.
- Noormets K, Koks S, Ivask M, Aunapuu M, Arend A, Vasar E & Tillmann V.** (2014). Energy Metabolism and Thyroid Function of Mice with Deleted Wolframin (Wfs1) Gene. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*.
- Noormets K, Koks S, Muldmaa M, Mauring L, Vasar E & Tillmann V.** (2011). Sex differences in the development of diabetes in mice with deleted wolframin (Wfs1) gene. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association* **119**, 271-275.
- Olsson T, Nasman B, Rasmuson S & Ahren B.** (1998). Dual relation between leptin and cortisol in humans is disturbed in Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* **44**, 374-376.
- Ouellet V, Routhier-Labadie A, Bellemare W, Lakhali-Chaieb L, Turcotte E, Carpentier AC & Richard D.** (2011). Outdoor temperature, age, sex, body mass index, and diabetic status determine the prevalence, mass, and glucose-uptake activity of 18F-FDG-detected BAT in humans. *J Clin Endocrinol Metab* **96**, 192-199.
- Pedretti A, Marconi C, Bettinelli I & Vistoli G.** (2009). Comparative modeling of the quaternary structure for the human TRPM8 channel and analysis of its binding features. *Biochim Biophys Acta* **1788**, 973-982.
- Peier AM, Moqrich A, Hergarden AC, Reeve AJ, Andersson DA, Story GM, Earley TJ, Dragoni I, McIntyre P, Bevan S & Patapoutian A.** (2002). A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* **108**, 705-715.
- Pfannenberger C, Werner MK, Ripkens S, Stef I, Deckert A, Schmadl M, Reimold M, Haring HU, Claussen CD & Stefan N.** (2010). Impact of age on the relationships of brown adipose tissue with sex and adiposity in humans. *Diabetes* **59**, 1789-1793.
- Power DA, Noel J, Collins R & O'Neill D.** (2001). Circulating leptin levels and weight loss in Alzheimer's disease patients. *Dement Geriatr Cogn Disord* **12**, 167-170.
- Pratley RE, Salbe AD, Ravussin E & Caviness JN.** (2000). Higher sedentary energy expenditure in patients with Huntington's disease. *Ann Neurol* **47**, 64-70.
- Rigoli L, Lombardo F & Di Bella C.** (2011). Wolfram syndrome and WFS1 gene. *Clin Genet* **79**, 103-117.
- Rohayem J, Ehlers C, Wiedemann B, Holl R, Oexle K, Kordonouri O, Salzano G, Meissner T, Burger W, Schober E, Huebner A & Lee-Kirsch MA.** (2011). Diabetes and neurodegeneration in Wolfram syndrome: a multicenter study of phenotype and

- genotype. *Diabetes Care* **34**, 1503-1510.
- Rossato M, Granzotto M, Macchi V, Porzionato A, Petrelli L, Calcagno A, Vencato J, De Stefani D, Silvestrin V, Rizzuto R, Bassetto F, De Caro R & Vettor R.** (2014). Human white adipocytes express the cold receptor TRPM8 which activation induces UCP1 expression, mitochondrial activation and heat production. *Mol Cell Endocrinol* **383**, 137-146.
- Sacks H & Symonds ME.** (2013). Anatomical locations of human brown adipose tissue: functional relevance and implications in obesity and type 2 diabetes. *Diabetes* **62**, 1783-1790.
- Saito M.** (2013). Brown adipose tissue as a regulator of energy expenditure and body fat in humans. *Diabetes Metab J* **37**, 22-29.
- Seale P, Kajimura S, Yang W, Chin S, Rohas LM, Uldry M, Tavernier G, Langin D & Spiegelman BM.** (2007). Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16. *Cell Metab* **6**, 38-54.
- Shimizu Y, Nikami H & Saito M.** (1991). Sympathetic activation of glucose utilization in brown adipose tissue in rats. *J Biochem* **110**, 688-692.
- Sramkova D, Krejbichova S, Vcelak J, Vankova M, Samalikova P, Hill M, Kvasnickova H, Dvorakova K, Vondra K, Hainer V & Bendlova B.** (2007). The UCP1 gene polymorphism A-3826G in relation to DM2 and body composition in Czech population. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association* **115**, 303-307.
- Stoy N & McKay E.** (2000). Weight loss in Huntington's disease. *Ann Neurol* **48**, 130-131.
- Strom TM, Hortnagel K, Hofmann S, Gekeler F, Scharfe C, Rabl W, Gerbitz KD & Meitinger T.** (1998). Diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy and deafness (DIDMOAD) caused by mutations in a novel gene (wolframin) coding for a predicted transmembrane protein. *Hum Mol Genet* **7**, 2021-2028.
- Swift RG, Perkins DO, Chase CL, Sadler DB & Swift M.** (1991). Psychiatric disorders in 36 families with Wolfram syndrome. *Am J Psychiatry* **148**, 775-779.
- Swift RG, Sadler DB & Swift M.** (1990). Psychiatric findings in Wolfram syndrome homozygotes. *Lancet* **336**, 667-669.
- Tajino K, Hosokawa H, Maegawa S, Matsumura K, Dhaka A & Kobayashi S.** (2011). Cooling-sensitive TRPM8 is thermostat of skin temperature against cooling. *PLoS One* **6**, e17504.
- Takeda K, Inoue H, Tanizawa Y, Matsuzaki Y, Oba J, Watanabe Y, Shinoda K & Oka Y.** (2001). WFS1 (Wolfram syndrome 1) gene product: predominant subcellular localization to endoplasmic reticulum in cultured cells and neuronal expression in rat brain. *Hum Mol Genet* **10**, 477-484.
- Takei D, Ishihara H, Yamaguchi S, Yamada T, Tamura A, Katagiri H, Maruyama Y & Oka Y.** (2006). WFS1 protein modulates the free Ca(2+) concentration in the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett* **580**, 5635-5640.
- Trejo A, Tarrats RM, Alonso ME, Boll MC, Ochoa A & Velasquez L.** (2004). Assessment of the nutrition status of patients with Huntington's disease. *Nutrition* **20**, 192-196.
- Tsavalier L, Shapero MH, Morkowski S & Laus R.** (2001). Trp-p8, a novel prostate-specific gene, is up-regulated in prostate cancer and other malignancies and shares high homology with transient receptor potential calcium channel proteins. *Cancer Res* **61**, 3760-3769.
- Tseng YH, Cypess AM & Kahn CR.** (2010). Cellular bioenergetics as a target for obesity therapy. *Nat Rev Drug Discov* **9**, 465-482.
- Tsuruda PR, Julius D & Minor DL, Jr.** (2006). Coiled coils direct assembly of a cold-activated TRP channel. *Neuron* **51**, 201-212.
- van Marken Lichtenbelt WD, Vanhommel JW, Smulders NM, Drossaerts JM,**

- Kemerink GJ, Bouvy ND, Schrauwen P & Teule GJ.** (2009). Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med* **360**, 1500-1508.
- Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T, Taittonen M, Laine J, Savisto NJ, Enerback S & Nuutila P.** (2009). Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med* **360**, 1518-1525.
- Watson GS, Cholerton BA, Reger MA, Baker LD, Plymate SR, Asthana S, Fishel MA, Kulstad JJ, Green PS, Cook DG, Kahn SE, Keeling ML & Craft S.** (2005). Preserved cognition in patients with early Alzheimer disease and amnesic mild cognitive impairment during treatment with rosiglitazone: a preliminary study. *Am J Geriatr Psychiatry* **13**, 950-958.
- Whittle AJ, Carobbio S, Martins L, Slawik M, Hondares E, Vazquez MJ, Morgan D, Csikasz RI, Gallego R, Rodriguez-Cuenca S, Dale M, Virtue S, Villarroya F, Cannon B, Rahmouni K, Lopez M & Vidal-Puig A.** (2012). BMP8B increases brown adipose tissue thermogenesis through both central and peripheral actions. *Cell* **149**, 871-885.
- Yamada T, Ishihara H, Tamura A, Takahashi R, Yamaguchi S, Takei D, Tokita A, Satake C, Tashiro F, Katagiri H, Aburatani H, Miyazaki J & Oka Y.** (2006). WFS1-deficiency increases endoplasmic reticulum stress, impairs cell cycle progression and triggers the apoptotic pathway specifically in pancreatic beta-cells. *Hum Mol Genet* **15**, 1600-1609.
- Yamaguchi S, Ishihara H, Tamura A, Yamada T, Takahashi R, Takei D, Katagiri H & Oka Y.** (2004). Endoplasmic reticulum stress and N-glycosylation modulate expression of WFS1 protein. *Biochem Biophys Res Commun* **325**, 250-256.
- Yoneshiro T, Aita S, Matsushita M, Okamatsu-Ogura Y, Kameya T, Kawai Y, Miyagawa M, Tsujisaki M & Saito M.** (2011). Age-related decrease in cold-activated brown adipose tissue and accumulation of body fat in healthy humans. *Obesity (Silver Spring)* **19**, 1755-1760.
- Yurimoto S, Hatano N, Tsuchiya M, Kato K, Fujimoto T, Masaki T, Kobayashi R & Tokumitsu H.** (2009). Identification and characterization of wolframin, the product of the wolfram syndrome gene (WFS1), as a novel calmodulin-binding protein. *Biochemistry* **48**, 3946-3955.
- Zatyka M, Ricketts C, da Silva Xavier G, Minton J, Fenton S, Hofmann-Thiel S, Rutter GA & Barrett TG.** (2008). Sodium-potassium ATPase 1 subunit is a molecular partner of Wolframin, an endoplasmic reticulum protein involved in ER stress. *Hum Mol Genet* **17**, 190-200.

Kasutatud veebilehed

<http://genome.ucsc.edu/>

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Marite Ehrlich (16.04.1991)

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

„Mentooli ainevahetuslike toimete analüüs WFS1-puudulikel hiirtel“,

mille juhendajad on Marilin Ivask, Sulev Kõks, Margus Pooga,

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 **02.01.2016** 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, 26.05.2014