

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

**RA-süsteemi võtmegeenide ekspressioonide iseloomustamine Wolframi sündroomi roti
hipokampuses**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Silvia Kirillov

Juhendaja PhD Mario Plaas
Kaasjuhendajad PhD Kadri Seppa
PhD Tambet Tõnissoo

TARTU 2022

INFOLEHT

RA-süsteemi võtmegeenide ekspressioonide iseloomustamine Wolframi sündroomi roti hipokampuses

Wolframi sündroom (WS) on haruldane tänaseni ravimatu monogeenne geneetiline haigus, mis on põhjustatud mutatsioonidest *WFS1* geenis ning mille täpne funktsioon pole teada. Samas, üha enam spekulieritakse *WFS1* rolli üle reniin-angiotensiinsüsteemis (RA-süsteemis). On näidatud, et juba noorte *Wfs1*-puudulike rottide südames, kopsudes ning primaarsetes kortikaalsetes neuronites on mitmete RA-süsteemi võtmegeenide ekspressioonid tugevalt alla reguleeritud. RA-süsteemi on kirjeldatud ka hipokampuses, kus on ekspresseerunud ka *WFS1*. Käesolevas bakalaureusetöös uuriti RA-süsteemi võtmegeenide ekspressioone *Wfs1*-puudulike rottide hipokampustes. Leiti, et nende rottide hipokampustes on *Mas1*, *ACE* ja *ACE2* geeniekspressioonid alla reguleeritud, mis viitab lokaalse RA-süsteemi kompensatoorse raja alatalitlusele, mis võib aga võimendada WS-i patoloogiate välja kujunemist.

Märksõnad: Wolframi sündroom, RA-süsteem, patoloogiad, hipokampus

CERCS kood: B470 Füsioloogia; B640 Neuroloogia, neuropsühholoogia, neurofüsioloogia

Characterization of the RAS key gene expressions in a Wolfram syndrome rat's hippocampus

Wolfram syndrome (WS) is a rare, currently incurable monogenic genetic disease, which is caused by mutations in the *WFS1* gene and the exact function of this gene is not known. However, it is more and more speculated, that the *WFS1* might have a role in the renin-angiotensin system (RAS). It has been shown, that several RAS key gene expressions are drastically downregulated already in young *Wfs1*-deficient rats in the heart, lungs and primary cortical neurons. The RAS has also been described in the hippocampus, where the *WFS1* gene is also expressed. This bachelor thesis analyzed the expressions of the RAS key genes of the *Wfs1*-deficient naive rats hippocampi. It was found that *Mas1*, *ACE* and *ACE2* gene expressions are downregulated in these rats, which indicates that the RAS compensatory pathway is underactive, however, it might contribute to the development of the WS pathologies.

Keywords: Wolfram syndrome, RAS, pathologies, hippocampus

CERCS code: B470 Physiology; B640 Neurology, neuropsychology, neurophysiology

SISUKORD

INFOLEHT.....	2
SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1. Wolframi sündroom.....	7
1.2. <i>WFS1</i> geen ja valk	7
1.2.1. <i>WFS1</i> valk ja endoplasmaatiline retiikulum	8
1.3. Klassikaline reniin-angiotensiin-aldosteroonsüsteem.....	9
1.4. Mitteklassikaline reniin-angiotensiinsüsteem.....	11
1.4.1. Aju reniin-angiotensiinsüsteem	13
1.5. Reniin-angiotensiin-aldosteroonsüsteem ja Wolframi sündroom.....	15
1.6. Reniin-angiotensiin-aldosteroonsüsteemi inhibiitorid.....	16
1.7. Wolframi sündroomi ravivõimalused	16
2. EKSPERIMENTAALOSA	19
2.1. Töö eesmärgid	19
2.2. Materjal ja meetodika	19
2.2.1. Katseloomad	19
2.2.2. RNA eraldamine hipokampuse kudedest	19
2.2.3. cDNA süntees	20
2.2.4. Kvantitatiivne reaalka PCR cDNA-dest	20
2.2.5. Statistiline analüüs.....	21
2.3. Tulemused.....	21
2.3.1. RA-süsteemi kuuluvate geenide ekspressiooni analüüs hipokampustes	21
2.4. Arutelu	23
KOKKUVÕTE	26
SUMMARY	27
TÄNUSÕNAD	29
KIRJANDUSE LOETELU.....	30
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	46
LIHTLITSENTS.....	47

KASUTATUD LÜHENDID

<i>ACE</i>	angiotensiini konverteeriva ensüümi geen
<i>ACE2</i>	angiotensiini konverteeriva ensüüm 2 geen
ACE	angiotensiini konverteeriv ensüüm
ACE2	angiotensiini konverteeriv ensüüm 2
AD	Alzheimeri tõbi (ingl <i>Alzheimer's disease</i>)
<i>Agtr1</i>	angiotensiin tüüp 1 retseptori geen
<i>Agtr1a</i>	angiotensiin tüüp 1a retseptori geen
<i>Agtr1b</i>	angiotensiin tüüp 1b retseptori geen
<i>Agtr2</i>	angiotensiin tüüp 2 retseptori geen
angI	angiotensiin I
angII	angiotensiin II
ATF6 α	ingl <i>activating transcription factor 6</i>
AT1	angiotensiin tüüp 1 retseptor
AT1a	angiotensiin tüüp 1a retseptor
AT1b	angiotensiin tüüp 1b retseptor
AT2	angiotensiin tüüp 2 retseptor
AT4	angiotensiin tüüp 4 retseptor
A1–7	angiotensiin 1–7
AIV	angiotensiin-4
<i>Bdkrb1</i>	bradükiniin-1 geen
<i>Bdkrb2</i>	bradükiniin-2 geen
BDKRB1	bradükiniini retseptor 1
BDKRB2	bradükiniini retseptor 2
BDNF	aju närvikasvu faktor (ingl <i>brain-derived neurotrophic factor</i>)
CA	ammoni sarv hipokampuses (ingl <i>cornu ammonis</i>)
DIDMOAD	akronüüm ingliskeelsetest sõnadest <i>diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy</i> ja <i>deafness</i>
ECM	ekstratsellulaarne maatiks (ingl <i>extracellular matrix</i>)
ER	endoplasmaatiline retiikulum
GLP-1	glükagoonilaadne peptiid-1
GLUT4	glükoosi transporter 4 (ingl <i>glucose transporter type 4</i>)
<i>Hprt1</i>	hüpoksantiin guaniin fosforibosüül transferaas 1 geen (koduhooidja geen)
HRD1	endoplasmaatilise retiikulumi E3 ubikvitiinligaas

IP-3	inositool trifosfaat
IRAP	insuliini poolt reguleeritav aminopeptidaas (ingl <i>insulin-regulated aminopeptidase</i>)
KKS-süsteem	ingl <i>kinin-kallikrein system</i>
KO	ingl <i>knock-out</i>
LTP	pikaajaline sünapside vaheline ülekandmine (ingl <i>long-term potentiation</i>)
MQ	Milli-Q vesi
qPCR	kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon (ingl <i>quantitative polymerase chain reaction</i>)
RAA-süsteem	reniin-angiotensiin-aldosteroonsüsteem
RA-süsteem	reniin-angiotensiinsüsteem
SEM	keskväärtuse standardviga (ingl <i>Standard Error of the Mean</i>)
SMURF1	E3 ubikvitiinligaas (ingl <i>Smad Ubiquitination Regulatory Factor 1</i>)
UPR	mittevoltunud valkude vastus (ingl <i>unfolded protein response</i>)
WFS1	wolframiin 1 valk inimesel ja loomal
<i>Wfs1</i>	wolframiin 1 kodeeriv geen hiirel ja rottil
<i>WFS1</i>	wolframiin 1 kodeeriv geen inimesel
WS	Wolframi sündroom
WS-i rott	<i>Wfs1232ex5KO</i> -rotimudel, kelle <i>Wfs1</i> geenist on deleteeritud viies kodeeriv ekson
WT	metsik-tüüp (ingl <i>wild-type</i>)
7,8-DHF	7,8-dihüdrosüflavoon (ingl <i>7,8-dihydroxyflavone</i>)

SISSEJUHATUS

Wolframi sündroom (WS) on harva esinev monogeenne geneetiline haigus, mis on põhjustatud mutatsioonidest *WFS1* geenis. WS-i peamisteks sümptomiteks on mage- ja suhkurdiabeet, optiline atroofia ja kurtus. Haigus kujuneb üldjuhul välja lapseas. Hetkeseisuga puudub ravi Wolframi sündroomi tarbeks, kuid on leitud ravimeid, mis selle sündroomi välja arenemist aeglustada aitavad. WS-iga invidiidid surevad keskmiselt kolmekümnendates eluaastates.

Enim seostatakse *WFS1* valgu rolli kaltsiumi homöostaasi tagamise ja raku endoplasmaatilise retiikulumi stressivastuse kujundamisega, kuigi valgu täpne funktsioon on teadmata. Samas, üha enam spekuleeritakse *WFS1* rolli üle reniin-angiotensiinsüsteemis (RA-süsteemis). Nimelt on näidatud, et juba noorte *Wfs1*-puudulike rottide südames, kopsudes ja primaarsetes kortikaalsetes neuronites on mitmete RA-süsteemi kompensatoorse poole eest vastutavate võtmegeenide ekspressioonid tugevalt alla reguleeritud, mis aitavad organismil võidelda põletiku, oksüdatiivse stressi ja neurodegeneratsiooni vastu. RA-süsteemi on kirjeldatud ka hipokampuses ning selle süsteemi alatalitlusi seostatakse hulga neuroloogiliste häiretega. Samuti on hipokampuses ekspresseerunud *WFS1*.

Tartu Ülikooli katseloomakeskuses on WS-i uurimise tarbeks loodud *Wfs1232ex5KO*-rotimudel, kelle *Wfs1* geenist on deleteeritud viies kodeeriv ekson (edaspidi WS-i rott). Antud bakalaureusetöö keskendub WS-i, reniin-angiotensiin-aldosteroonsüsteemi (RAA-süsteemi) ning lokaalsete reniin-angiotensiinsüsteemide (RA-süsteemide) uurimisele. RAA-süsteem tervikuna vastutab organismis vererõhu muutuste, aga ka soola ja vee tasakaalu hoidmise eest. Lisaks on RA-süsteemi komponentide tasakaal oluline vältimaks mitmesuguseid patofüsioloogiaid nagu dementsus ja neurodegeneratiivsed haigused. Varasemalt ei ole WS-i ja RA-süsteemi vahelisi interaktsioone põhjalikult uuritud, kuid on näidatud, et wolframiin 1 geen ekspresseerub seal, kus RA-süsteemi võtmegeenidki.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärk on uurida, mil moel *Wfs1*-puudulikkus mõjutab RA-süsteemi kuuluvate võtmegeenide ekspressiooni eakate WS-i rottide hipokampustes.

Bakalaureusetöö koostati Tartu Ülikooli bio- ja siirdemeditiini instituudi katseloomakeskuses.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Wolframi sündroom

Wolframi sündroom (WS) on haruldane pärilikult edasi kanduv neurodegeneratiivne haigus, mis on põhjustatud mutatsioonidest *WFS1* geenis (Rigoli *et al.*, 2011). WS diagnoositi esimest korda 1938. aastal, mil kaheksast perekonna lapsest neljal tuvastati juveniilne diabeet ehk suhkurtõbi ning optilise närvi atroofia (Wolfram ja Wagener, 1938). *WFS1* geen moodustub kaheksast eksonist, mis kodeerivad wolframiin 1 valku (Hardy *et al.*, 1999). Wolframiin 1 funktsioon on tänaseni ebaselge, ehkki seda on seostatud näiteks kaltsiumi homöostaasi tagamisega pankrease beeta-rakkude endoplasmaatilises retiikulumis (ER-is) (Fonseca *et al.*, 2005). Wolframi sündroomi avaldumine algab üldjuhul kuuendal kuni kümnendal eluaastal ning kõige sagedasemad kaasnevad haigusnähud, mille järgselt on alust eeldada, et haiguse puhul võib tegu olla WS-iga, on suhkurtõbi ja optiline atroofia (Barrett *et al.*, 1995; Barrett ja Bunday, 1997).

Wolframi sündroomi tuntakse ka ingliskeelse lühendina DIDMOAD. DIDMOAD on akronüüm, mis on moodustunud sõnadest *diabetes insipidus* (magediabeet), *diabetes mellitus* (suhkurdiabeet), *optic atrophy* (optiline atroofia ehk kõhetumine) ja *deafness* (kurtus) (Barrett ja Bunday, 1997). Tavaliselt on üks esimesi välja kujunevaid haigustunnuseid suhkurtõbi, millele järgneb umbes üheteistkümnendal eluaastal optilise närvi atroofia ilmumine, mis seisneb täpsemalt värvide eristamatuse tekkes ning perifeerse nägemise kaotamises (Barrett *et al.*, 1995). Veel on WS-i haigetel sagedasteks vaevusteks mitmesugused kuseteedega seonduvad probleemid, mille hulka kuuluvad näiteks urineerimishäired, aga ka neerude töö häirimine (Urano, 2016). Wolframi sündroomiga isikutel on täheldatud ka mitmesuguseid neuroloogilisi häireid, sealhulgas depressiooni ja psühhooosi (Swift *et al.*, 1990). Keskmise WS-i haigete eluiga on ligikaudu kolmkümmend eluaastat ning individid surevad sageli ajutüve atroofiast tingitud hingamispuudulikkusesse (Urano, 2016).

1.2. *WFS1* geen ja valk

WFS1 geeni on tänaseks väga palju uuritud, ent siiski ei teata selle kindlaid funktsioone. Wolframi sündroomi põhjustava *WFS1* geeni tegid 1998. aastal kindlaks kaks eraldiseisvat töögruppi (Inoue *et al.*, 1998; Strom *et al.*, 1998). Inimesel asub *WFS1* geen neljanda kromosoomi lühikesel õlal positsioonis 16.1 ja koosneb kaheksast eksonist (Abbasi *et al.*,

2016), millest esimene ekson on mittekodeeriv (Inoue *et al.*, 1998). *WFS1* geen kodeerib wolframiin 1 (WFS1) valku, mis on moodustunud 890-st aminohappest molekulmassiga 100 kDa (Inoue *et al.*, 1998). WFS1 valku ekspresseeritakse rohkelt paljudes kudedes, kuid eriti küllaldaselt kopsudes, ajus, südames ja pankreases (Hofmann *et al.*, 2003; Inoue *et al.*, 1998). *WFS1* geeni mutatsioonide korral ei sünteesita funktsionaalset wolframiin 1 valku (de Heredia *et al.*, 2013). Seega osaliselt või täielikult mittefunktsionaalne WFS1 valk on Wolframi sündroomi välja kujunemise aluseks.

1.2.1. WFS1 valk ja endoplasmaatiline retiikulum

WFS1 valk on endoplasmaatilisel retiikulumil (ER-il) asetsev valk (Takeda *et al.*, 2001). ER vastutab valkude õige voltumise eest, kuid stressi korral ER-is ei saa valgud korrektselt voltuda. Valkude õige voltumine on vältimatult vajalik nende funktsionaalsuse tagamiseks. ER-i stressi korral käivitub UPR (ingl *unfolded protein response*) signaalirada, mis on mittevoltunud valkude vastus (Fonseca *et al.*, 2010). UPR püüab seega taastada ER-i homöostaasi nii, et surub maha sealsete valkude translatsiooni (Bravo *et al.*, 2013). On leitud, et WFS1 valk osaleb rakkudes kaltsiumi kontsentratsiooni ning rakkude homöostaasi regulatsioonis (Takeda *et al.*, 2001).

Täpsemalt on välja pakutud, et *WFS1* geeni poolt kodeeritav WFS1 valk seondub Ca^{2+} /kalmoduliin kompleksiga, kusjuures mutatsioonid ER-seoselises WFS1 valgus häirivad kalmoduliini seondumist kaltsiumiga (Yurimoto *et al.*, 2009). Lisaks on näidatud, et WFS1 valgu puudulikkuse korral hakkab proinsuliin ER-i kuhjuma, mis omakorda pärsib insuliini sekretsiooni, teisalt funktsionaalse valgu puhul peaks proinsuliin jõudma Golgi kompleksi (Wang *et al.*, 2021). Veel on WFS1 valgu puhul täheldatud, et see interakteerub veel ühe ER-is asuva transmembraanse valgu, sigma-1 retseptoriga (Crouzier *et al.*, 2022). Sigma-1 retseptori ülesanne on reguleerida kaltsiumi tööd ER-is inositol trifosfaadi (IP-3) retseptori abil (Bolshakova *et al.*, 2016).

Lisaks on leitud, et E3 ligaas SMURF1 (ingl *Smad Ubiquitination Regulatory Factor 1*) interakteerub WFS1 valguga. Juhul, kui rakus puudub ER-i stress, siis E3 ubikvitiini ligaas SMURF1 ubikvitineerib ja lagundab ER-is WFS1 valgu (Guo *et al.*, 2011). Endoplasmaatilise retiikulumi stressi korral tõuseb ER-is aga WFS1 valgu hulk (Ueda *et al.*, 2005) ja hoopis SMURF1 degradeeritakse (Guo *et al.*, 2011). ER-is asetsev funktsionaalne WFS1 stabiliseerib E3 ubikvitiinligaasi HRD1, mis omakorda degradeerib ER- i stressivastuses osalevat

transkriptsioonifaktorit ATF6 α -t (Fonseca *et al.*, 2010; Yoshida *et al.*, 1998). Seega funktsionaalne WFS1 valk on negatiivne ER-i stressi regulaator ja pigem kutsub esile, kui hoiab ära ER-i stressivastust (Fonseca *et al.*, 2010).

1.3. Klassikaline reniin-angiotensiin-aldosteroonsüsteem

Inimese organismis on arvukalt bioloogilisi süsteeme. Üheks nendest olulistest süsteemidest on reniin-angiotensiin-aldosteroonsüsteem (RAA-süsteem). RAA-süsteemi avastamisluhu jääb 1898. aastasse, mil füsioloog Robert Tigerstedt ja tema õpilane Per Bergman Karolinska Instituudist tegid kindlaks reniini molekuli (Tigerstedt ja Bergman, 1898). RAA-süsteemi peamine ülesanne on vererõhu reguleerimine, aga ka vee ja naatriumi tasakaalu säilitamine (Navar, 2014; Schweda, 2015).

Sisuliselt võib RAA-süsteemi jaotada kaheks, klassikaliseks reniin-angiotensiin-aldosteroonsüsteemiks ja mitteklassikaliseks reniin-angiotensiinsüsteemiks (RA-süsteemiks) (Romero *et al.*, 2015). On mitmeid lokaalseid ehk mitteklassikalisi RA-süsteeme, sealhulgas on selle süsteemi komponente ekspresseeritud ajus, südames, neerupealistes, kuid ka näiteks neerudes ja on tõenäoline, et RAA-süsteemi häirumised tervikuna võivad viia mitmete patofüsioloogiateni (Paul *et al.*, 2006).

Lähtuvalt nimest koosneb klassikaline RAA-süsteem järgnevatest põhikomponentidest: reniinist, angiotensiin II-st ja aldosteroonist. Kaskaad algab proteolüütilise ensüümi reniini biosünteesiga proreniinist, mille eest vastutavad neerude jukstaglomerulaarrakud (Atlas, 2007). Proreniini eelnev aktivatsioon toimub neerudes proteolüütiliselt kas neuroendokriinse konverteas 1 (ingl *neuroendocrine convertase 1*) või katepsiin B poolt ja teistes kudedes mitteproteolüütiliselt reniini/proreniini retseptori abil (Patel *et al.*, 2017). Reniini võib tegelikult nimetada hormooniks (Brown, 2007), mis vallandub madala vererõhu ja soolasisalduse ning sümpaatilise närvisüsteemi mõjul (Drenjančević-Perić *et al.*, 2011). See hormoon tagab maksast pärineva ensüümi angiotensinogeeni üle viimise esmalt angiotensiin I-ks (angI-ks) ja seejärel juba angiotensiini konverteeriva ensüümi (ACE) poolt kopsudes angiotensiin II-ks (angII-ks) (Kuba *et al.*, 2006; Schweda, 2015). Teisalt, kõrge reniini tase organismis võib päädida haruldase Addisoni tõve (neerupealiste puudulikkus), madala vererõhu, maksatsirroosi, aga ka näiteks neerukasvajatega (Baker *et al.*, 2012; Patel *et al.*, 2017). Angiotensiin II hõlbustab angiotensiin tüüp 1 retseptori (AT1) kaudu aldosterooni vabastamist neerupealiste koorest (Atlas, 2007).

ACE on reniin-angiotensiin-aldosteroonsüsteemi olulisi põhikomponente ja on tähtsal kohal ka KKS-süsteemis (ingl *kinin-kallikrein system*) (Crisan ja Carr, 2000). RAA-süsteemiga angiotensiini konverteeriva ensüümi kaudu tihedalt seotud keerukas KKS-süsteem koosneb bradükiniinist, kallidiinist ja kallikreiinist, kusjuures viimase ülesanne on aktiveerida proreniin (da Graça Naffah-Mazzacoratti *et al.*, 2014; Patel *et al.*, 2017). KKS-süsteem on lisaks RAA-süsteemile vererõhu reguleerija ja omab rolli põletikutekkes (Punapart *et al.*, 2021; Schmaier, 2002), selle peamiseks retseptoriteks on bradükiniin-1 (BDKRB1) ja bradükiniin-2 (BDKRB2) (Girolami *et al.*, 2021).

Samal ajal on ka angiotensiin II oluline RAA-süsteemi komponent, mis põhjustab silelihaste kokkutõmmet, tõstab vererõhku ja pulsisagedust (Feener *et al.*, 1995; Patel *et al.*, 2017). Aldosterooni ülesanne on säilitada naatrium-kaalium homöostaasi (Chiolero *et al.*, 2000), kuid näiteks veepeetuse korral on angiotensiin II tasemed ning aldosterooni hulk tavapärasest palju kõrgemad (White *et al.*, 2011).

Süsteemis on olulised ka angiotensiin II retseptorid ja nende erinevad alamtüübid. Angiotensiin II peamised retseptorid on angiotensiin tüüp 1 (AT1) ja angiotensiin tüüp 2 retseptor (AT2) (Guo *et al.*, 2001). Valku kodeeriv geen nimega angiotensiin tüüp 1 retseptor (*Agtr1*) kodeerib AT1 retseptorit (Taylor *et al.*, 2012) ning geen angiotensiin tüüp 2 retseptor (*Agtr2*) AT2 retseptorit (National Center for Biotechnology Information, 2022). AT1 retseptorit leidub näiteks ajukudedes, kuid eriti rohkelt neerupealistes, vaskulaarsetes silelihasrakkudes, neerudes ja südames. AT1 kutsub muuhulgas esile vasokonstriksiooni, vabastab aldosterooni ja vasopressiini (Unger, 2002).

AT1 retseptori üleaktivatsiooni on seostatud mitmete krooniliste haigustega, samal ajal kui sellele antagonistlik AT2 retseptor võib aidata kaasa mitmetele kudede regeneratsiooni protsessidele (Unger, 2002), sealhulgas kahjustunud DNA parandamisele (Farak *et al.*, 2017). Lisaks soodustab AT2 retseptori aktivatsioon rakkude apoptoosi (Pei *et al.*, 2017; Yamada *et al.*, 1996), on antiproliferatiivne (Nakajima *et al.*, 1995) ja osaleb ka näiteks ekstratsellulaarse maatriksi (ECM) kujundamises (Brassard *et al.*, 2005).

Närilistel esinevad lisaks angiotensiin II retseptorite alamtüübid angiotensiin tüüp 1a retseptor (AT1a) ja angiotensiin tüüp 1b retseptor (AT1b), mille valku kodeerivad vastavalt geenid *Agtr1a* ja *Agtr1b* (Bogdarina *et al.*, 2009). RAA-süsteem on keerukas ja selle teevad veelgi komplekssemaks erinevad mitteklassikalised ehk lokaalsed RA-süsteemid.

1.4. Mitteklassikaline reniin-angiotensiinsüsteem

Eelnevalt on töös välja toodud, et RAA-süsteem ei moodusta ühtset tervikut, vaid selle komponente võib sisalduda erineval määral väga erinevates kudedes. Mõlemad, nii klassikaline RAA-süsteem kui ka mitteklassikaline RA-süsteem on kardiovaskulaarse ja neuroloogilise tervise seisukohalt keskse tähtsusega (Yagi *et al.*, 2013). Mitteklassikalise aju RA-süsteemi avastasid Kanada teadlased 1971. aastal (Ganten *et al.*, 1971), mis muutis esmast arusaama kogu RAA-süsteemist. Kuna ka WFS1 valk ekspresseerub ajus (Luuk *et al.*, 2008), tasub põhjalikumalt uurida lisaks reniin-angiotensiin-aldosteroonsüsteemile lokaalseid reniin-angiotensiinsüsteeme. Kindlasti ei ole töös esitatav info RAA-süsteemide kohta täielik, kuna pidevalt selgub uusi detaile ja komponente.

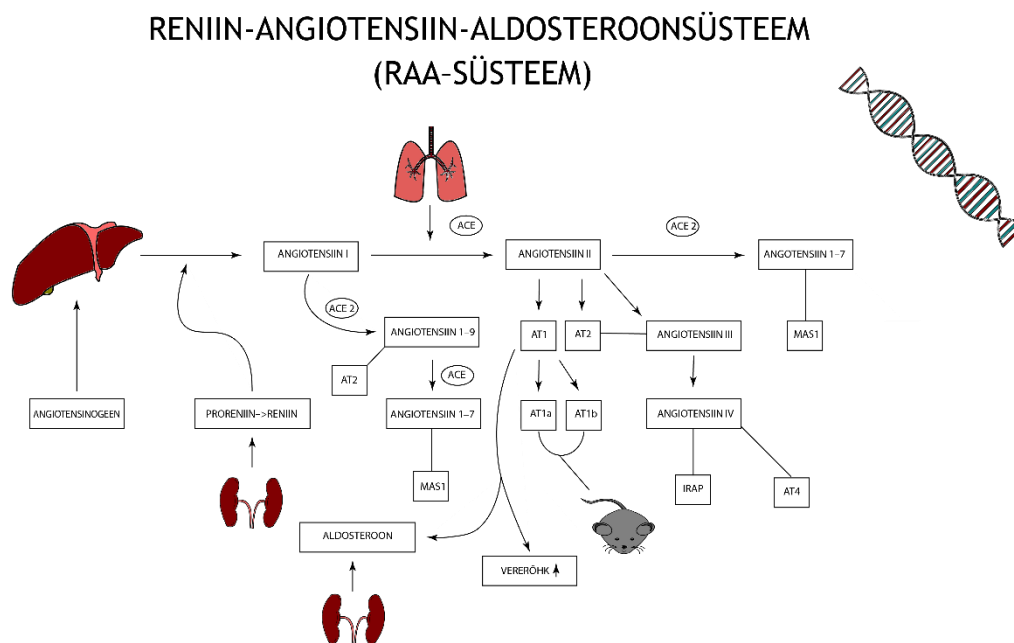
Mitteklassikalise reniin-angiotensiinsüsteemi rada koosneb täpsemalt angiotensiini konverteerivast ensüüm 2-st (ACE2-st), angiotensiin 1–7-st (A1–7), angiotensiin-4 (AIV) peptiididest, MAS1 retseptorist ning insuliini poolt reguleeritavast aminopeptidaasist (ingl *insulin-regulated aminopeptidase* ehk IRAP) (Romero *et al.*, 2015). RA-süsteemi mitteklassikalise raja saab lihtsustatult jaotada omakorda kaheks: ACE2/A1–7/MAS1 ja AIV/IRAP teljeks (Mascolo *et al.*, 2017). ACE2/A1–7/MAS1 süsteem mõjutab kardiovaskulaarset homöostaasi, selle süsteemi ekspressioon ja funktsioon on seotud kardiovaskulaarsete haigustega (Ferreira *et al.*, 2010). AIV/IRAP süsteem vabastab seevastu lämmastikoksiidi ja on põletikuvastane (Mascolo *et al.*, 2017).

Mitteklassikalise reniin-angiotensiinsüsteemi üks põhikomponente angiotensiin-IV on reguleeritud angiotensiin-4 (AT4) retseptori poolt (Farag *et al.*, 2017). Angiotensiin-4 retseptor ekspresseerub laialdaselt näiteks neokorteksis, väikeajus, motoorkorteksis, ajutüve mootorsetes neuronites, aga ka hipokampuses (Farag *et al.*, 2017; Wright *et al.*, 1995). Angiotensiin-IV on otseselt seotud IRAP-iga (Wright ja Harding, 2011). Angiotensiin-IV roll AIV/IRAP süsteemis on inhibeerida IRAP-i tööd (Farag *et al.*, 2017). Angiotensiin II võidakse teatud juhul reniin-angiotensiinsüsteemis degradeerida angiotensiin III-ks (Padia *et al.*, 2008).

Lisaks võib ensüüm ACE2 angiotensiin II-st konverteerida angiotensiin 1–7-e (McKinney *et al.*, 2014). Angiotensiin 1–7-e puhul on nähtud kardioprotektiivseid mõjusid (Zhao *et al.*, 2015), lisaks suudab see pärssida kahjustunud südames reaktiivsete hapnikuühendite tootmist (ingl *reactive oxygen species*, ROS) (McKinney *et al.*, 2014). Veel on teada, et MAS1 retseptori kaudu toimiv A1–7 põhjustab vasodilatatsiooni (Santos *et al.*, 2003), hoiab ära kõrget vererõhku

(Zhang *et al.*, 2019) ja on antiproliferatiivne (Ferrario *et al.*, 2005). Tegelikult on lisaks angiotensiin 1–7-le olemas veel angiotensiin 1–9, mille kohta teatakse tunduvalt vähem. Enamjaolt konverteerib just ensüüm ACE2 angiotensiin I-e angiotensiin 1–9-ks (Donoghue *et al.*, 2000). Angiotensiin 1–9 võidakse edasi muuta angiotensiin 1–7-ks või omab see toimet AT2 retseptori kaudu (McKinney *et al.*, 2014). MAS1 on seevastu G-valguga seotud retseptor, mille põhiline ülesanne on kaitsta aju, südant, veresooni ning neere (Bennion *et al.*, 2015; Gironacci, 2015; Santos, 2014). MAS1 retseptori aktiveerumine pidurdab rakkude kasvu ja on põletikuvastane ning antifibrotiline (e Silva ja Teixeira, 2016; Santos, 2014). A1–7/MAS1 rada on angiotensiin II-le ja selle retseptorile AT1-le vastupidise töövooluga (Cerniello *et al.*, 2017).

RAA-süsteemi tervikuna ei mõjuta ainult inimese toitumine, näiteks päevane tarbitav soola hulk. Tegu on väga mitmekülgse süsteemiga. RAA-süsteemi (ja ka RA-süsteemide) erinevate osade ekspressiooni võivad tegelikult mõjutada väga mitmed tegurid, sealhulgas kontraseptiivide tarvitamine, rasedus, kuid ka taolised hormoonid nagu östrogeen, testosteroon ning kortisool, erinevad vererõhuravimid ja muud medikamendid (Patel *et al.*, 2017; Ueki *et al.*, 2015). Joonisel 1 on toodud skeem klassikalise RAA-süsteemi ja mitteklassikalise RA-süsteemi peamiste komponentide ja radade kohta.



Joonis 1. Reniin-angiotensiin-aldosteroonsüsteem. Joonisel on lihtsustatult ja kokkuvõtlikult peatükkide 1.3 ja 1.4 põhjal toodud klassikalise reniin-angiotensiin-aldosteroonsüsteemi rada ja mitteklassikalise reniin-angiotensiinsüsteemi rajad. Lühendid: ACE – angiotensiini konverteeriv ensüüm; ACE2 – angiotensiini konverteeriv ensüüm 2; AT1 – angiotensiin tüüp 1 retseptor; AT2 – angiotensiin tüüp 2 retseptor; AT1a – angiotensiin tüüp 1a retseptor; AT1b – angiotensiin tüüp 1b retseptor; IRAP – insuliini poolt reguleeritav aminiopetidaas. (Arvutikujundus Martin Paal).

1.4.1. Aju reniin-angiotensiinsüsteem

Lokaalseks ehk mitteklassikaliseks RA-süsteemiks on ka ajus esinev RA-süsteem. Nimelt on leitud, et RA-süsteemi komponente esineb näiteks hipokampuses (Huang *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2012), kuid samal ajal ekspresseerub hipokampuse ammoni sarve CA1 (ingl *cornu ammonis*) regioonis väga tugevalt ka WFS1 valk (Tekko *et al.*, 2017), mida on illustreeritud joonisel 2. On täheldatud, et enamjaolt ekspresseeruvad angiotensinogeeni (angiotensiini eellasmolekul) peptiidid ajus just astrotsüütides (Grobe *et al.*, 2008; Milsted *et al.*, 1990; Sherrod *et al.*, 2005), kuid vähemal määral ka neuronites (Agassandian *et al.*, 2017; Lavoie *et al.*, 2004).

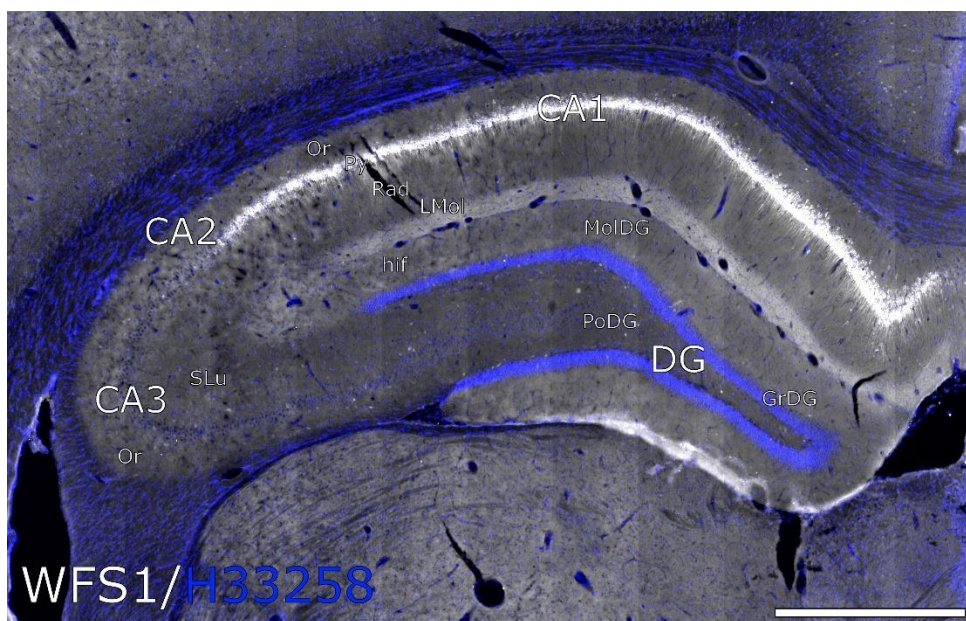
RA-süsteemi AT1 retseptori kontrollimatu üleaktivatsioon on kahjulik, põhjustades kognitiivse võimekuse langust, rakusurma, kuid ka põletikku (Labandeira-Garcia *et al.*, 2017). Kusjuures AT1 retseptori inhibeerimine on näidanud vanadel rottidel õppimisvõimekuse kasvu, mälu paranemist, ent ka motoorsete oskuste taastumist (Hellner *et al.*, 2005; Kerr *et al.*, 2005). Lisaks on välja pakutud, et AT1 blokaatorid võivad aidata vältida voltumata valkude kuhjumist rakus. AT1 retseptori antagonistid võivad pakkuda kaitset ka oksüdatiivsete kahjustuste tekke ning põletikku esile kutsuva β -amüloidi akumulatsioonist eest (Bodiga ja Bodiga, 2013; Wright ja Harding, 2010).

Just Alzheimerit kirjeldab väga hästi β -amüloidi kuhjumine ajus (Murphy ja LeVine III, 2010). Kusjuures ACE aktiivsus aitab β -amüloidi lagundada, ACE inhibeerimisel koguneb seda aga veelgi enamal hulgal (Hemming ja Selkoe, 2005). Veel on leitud, et näiteks trauma või insuldi järgselt on bradükiniini tootmine ajus oluliselt hoogustunud, olles sealjuures põletikuvastane ja neuroprotektiivne. Bradükiniinil on kaks retseptorit, BDKRB1 ja BDKRB2, mille kaudu toimida (Noda *et al.*, 2007) ning RA-süsteemi võtmekomponendi A1–7 kõrge ekspressioonitase aitab bradükiniini hulka tõsta (Lu *et al.*, 2008).

Hipokampus on eriti oluline õppimiseks ja heaks mäluks, samuti CA1 piirkond. Nimelt hipokampuse CA1 piirkonnas on näidatud, et A1–7 omab rolli neuraalse plastilisuse tagamisel (Hellner *et al.*, 2005), mis võib aidata hoiduda neurodegeneratiivsetest haigustest (Mercerón-Martínez *et al.*, 2021). Järelikult on RA-süsteemil osa ka vaimse võimekuse kontekstis. Eelnev on oluline, kuna 2050. aastaks ennustatakse neurodegeneratiivsete haiguste märkimisväärset kasvu, mil dementsete isikute tõenäoline arv maailmas võib ulatuda üle 100 miljoni (Prince *et al.*, 2013).

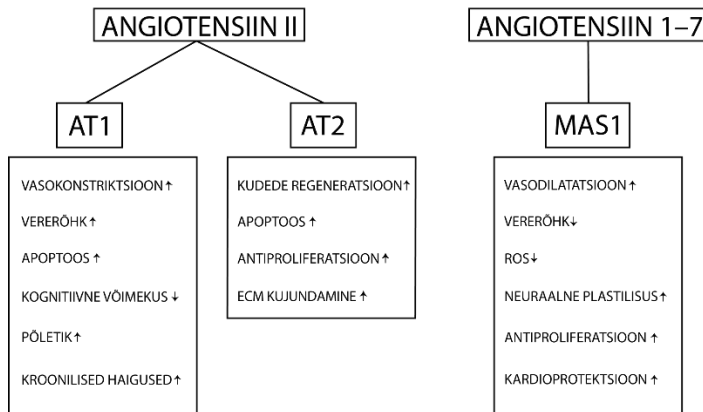
Praeguseks on pikaajaliste uuringute abil leitud, et ka kõrgvererõhutõbi (mis on põhjustatud RAA-süsteemi häiretest) võib soodustada kognitiivse võimekuse langust ning seega olla faktoriks erinevate neuuraalsete haiguste välja kujunemisel (Launer *et al.*, 1995; Yoshitake *et al.*, 1995; Skoog *et al.*, 1996). Dementsuse alaliigid sõltuvalt patogeneesist on Alzheimeri tõbi (ingl *Alzheimer's disease*, AD) ja vaskulaarne dementsus, millest esimene on põhjustatud kolinergiliste neuronite kahjustustest ning teine võib olla tingitud insuldi tagajärjel kahjustada saanud neuronitest (Yagi *et al.*, 2013). Veel on näidatud, et keskeas kõrget süstoolset vererõhku omavatel inimestel on täheldatud esmaseid markereid AD-st nii neokorteksis kui ka hipokampus (Petrovitch *et al.*, 2000). Seega RAA-süsteemi (ka RA-süsteemi) pikaajaline häirumine võib viia neurodegeneratiivsete haiguste välja kujunemiseni.

RAA-süsteemi erinevate radade aktiveerumine võib päädida erinevate tulemustega. See tähendab antud kontekstis kohati vastupidiseid efekte organismis. Joonisel 3 on kujutatud kokkuvõtlikult peatükkide 1.3, 1.4 ja 1.4.1 põhjal erinevate radade (angiotensiin II-e retseptorite AT1 ja AT2 aktivatsioon või ACE2/A1–7/MAS1) aktivatsiooniga kaasnevad toimed.



Joonis 2. WFS1 valk roti hipokampus. Joonisel on ilmestatud wolframiin 1 valgu (WFS1) paiknemine (valgelt) 3 kuu vanuse roti aju koronaallõigul. Hipokampuse piirkonnas on intensiivne piiritletud signaal ammoni sarve (*cornu ammonis*, CA) esimeses väljas (CA1). Lühendid: CA1–3 – hipokampuse ammoni sarve piirkonnad (*cornu ammonis*); DG – hammaskäär (*dentate gyrus*); GrDG – hammaskääru granulaarrakkude kiht; hif – hipokampuse lõhe (*hippocampal fissure*); LMol – molekulaarkiit (*lacunosum moleculare*); MolDG – hammaskääru molekulaarkiit; Or – *oriens*; PoDG – hammaskääru polümorfne kiht; Py – püramidaalkiit; Rad – radiaalkiit; SLu – *stratum lucidum*. Rakutuomad on värvitud siniselt Hoechst 33258 värviga. Mõõtlõik 1 mm. (Joonise ja allkirja autor Toomas Jagomäe, kohandatud).

RAA-SÜSTEEMI RADADE AKTIVATSIOONI EFEKTID



Joonis 3. RAA-süsteemi radade aktivatsiooni efektid organismis. Kujutatud on angiotensiin II (üleminekul vastavalt AT1-ks või AT2-ks) ja ACE2/A1–7/MAS1 raja aktivatsiooni tulemusi peatükkide 1.3, 1.4 ja 1.4.1 põhjal. Lühendid: AT1 – angiotensiin tüüp 1 retseptor; AT2 – angiotensiin tüüp 2 retseptor; ECM – ekstratsellulaarne maatriks. (Arvutikujundus Martin Paal).

1.5. Reniin-angiotensiin-aldosteroonsüsteem ja Wolframi sündroom

On teada, et nii WFS1 geen ja WFS1 valk kui ka RAA-süsteemi võtmekomponendid ekspresseeruvad teatud määral samades kudedes, näiteks kopsudes, reetinas, pankreases, südames ning erinevates aju osades (Hofmann *et al.*, 2003; Inoue *et al.*, 1998; Mascolo *et al.*, 2017; Nehme *et al.*, 2015; Schmidt-Kastner *et al.*, 2009; Wilkinson-Berka *et al.*, 2019).

Punapart ja teised on näidanud, et juba 5 kuu vanuse WS-i roti südames ja kopsudes on nii *Agtr2*, *Agtr1b* kui ka *Bdkrb1* geeniekspressioonid olulisemalt madalamad võrreldes nende metsik-tüüpi (ingl *wild-type*, WT) pesakonnakaaslastega. Lisaks näidati, et *Wfs1 knock-down* primaarsetes kortikaalsetes neuronites põhjustas nii *Agtr2* kui ka *Bdkrb1* geeniekspressioonide languse (Punapart *et al.*, 2021). Seega on alust arvata, et *Wfs1-1* võib olla roll RAA-süsteemi kompensatoorse poole aktivatsiooni regulatsioonis, mille rolliks on võidelda rakustressi, põletiku, infektsioonide ja fibrootiliste protsesside vastu.

Lisaks on näiteks RAA-süsteemi võtmekomponendi angiotensiin II puhul on leitud, et see aitab ühe tegurina kaasa nägemisnärvi degeneratsioonile (Garcia ja Marin-Castaño, 2014) ja Wolframi sündroomi puhul on üheks sagedaseks häireks just optilise atroofia väljakujunemine (Wolfram ja Wagener, 1938). AT2 kõrge tase organismis võib olla märk südamehaigustest. Lisaks on katserottidel näidatud AT2 olulisust nii loote kui ka postnataalse optilise närvi arengus ja regulatsioonis (Bertagnolli *et al.*, 2016; Lucius *et al.*, 1998).

1.6. Reniin-angiotensiin-aldosteroonsüsteemi inhibiitorid

RAA-süsteemi inhibiitorite välja töötamine on oluline, pärssimaks erinevate patogeneeside kulgu. Esmaseks RAA-süsteemi inhibitsiooniks on kasutatud reniini inhibiitoreid, kuna reniinist saab alguse kogu süsteemi kaskaad (Atlas, 2007). Prekliinilised uuringud on näidanud, et reniini mahasurumine viib vererõhu alanemiseni (Staessen *et al.*, 2006). Esimene tõhus suukaudselt manustatav reniini inhibiitor ning ühtlasi vererõhuravim võeti vastu 2007. aastal USA Toidu- ja Raviameti poolt (Wal *et al.*, 2011). Teisalt näiteks ACE inhibiitorid takistavad angiotensiin I konverteerimist angiotensiin II-ks, mis omakorda surub maha aldosterooni vabastamist ja on näidatud, et ACE inhibiitorid aitavad ennetada või aeglustada neeruhaigusi (Zhang *et al.*, 2017). Ent näitena paljudest kõrvaltoimetest, ACE inhibiitorite kasutamisel võib osadel patsientidel tekkida köha (Romero *et al.*, 2015), erinevad nahaprobleemid või muud tervisemured (Parish ja Miller, 1992).

Lisaks on olemas mitmesuguseid aldosterooni antagonistide nagu spironolaktoon ja eplerenoon (Zhang *et al.*, 2017), ent nende antagonistide probleem seisneb samuti rohketes võimalikes kõrvaltoimetes, näiteks hüperkaleemia (liiga kõrge kaaliumisisaldus) riski kõrgenemises (Chung *et al.*, 2020). Veel eksisteerib mitmeid angiotensiini retseptorite blokeerijaid, näiteks AT1 retseptori pärssija (Colafella *et al.*, 2019).

Täna on kliinilises kasutuses rida RAA-süsteemi inhibiitoreid peamiselt kardiovaskulaarsete häirete raviks (Maggioni, 2006; Mascolo *et al.*, 2021). Teisalt võivad need ravimid tugevalt mõjutada ka RA-süsteemi toimimist kesknärvisüsteemis, mistõttu on need fookuses ka neurodegeneratiivsete haiguste vastu võitlemisel (Wright *et al.*, 2013).

1.7. Wolframi sündroomi ravivõimalused

Tänapäeval WS-i ravi puudub. Kuigi Wolframi sündroom on haruldane geneetiline tõenäoliselt ravimatu haigus, on leitud mitmeid sümptompõhiseid raviteraapiaid, mis aitavad WS-i patogeneesi kulgu aeglustada. See on vajalik, et pikendada patsientide eluiga. Plaasi töögrupp on näidanud, et GLP-1 (glükagoonilaadse peptiid-1) retseptori agonisti liraglutidi manustamine WS-i rottidele pidurdab nendel nii diabeedi kui ka neurodegeneratsiooni kulgu (Toots *et al.*, 2018; Seppa *et al.*, 2019). Lisaks näidati sama töögrupi poolt, et pooltel WS-i rottidel, kellele manustati liraglutidi, ei arenenud 18. elukuuks välja insuliinist sõltuvat diabeeti. Liraglutidi ravi saanud loomadel ei esinenud nägemisteravuse langust, reetina

ganglioni rakkude surma ega optilise närvi atroofiat, võrreldes kontroll-loomadega, kes 18. elukuuks olid kaotanud silmanägemise (Jagomäe *et al.*, 2021). GLP-1 retseptori agoniste on manustatud ka WS-i patsientidele ning sarnaselt loomudelisel nähtule pidurdasid need nii diabeeti kui ka reetina degeneratsiooni (Frontino *et al.*, 2021; Scully ja Wolfsdorf, 2020). Eelnev tõestab veelkord antud ravimite tõhusust WS-i vastases teraapias ja ka WS-i rotimudeli valiidsust testimaks ning leidmaks uusi WS-i pidurdavaid ravimeid.

Lisaks GLP-1 retseptori agonistidele on veel tüüp II diabeediravimeid, näiteks glipisiid, mis alandas hiirtega läbi viidud eksperimendis vere glükoositaset (Kim *et al.*, 2014). Teisest küljest *Wfs1*-puudulikes hiirtes glipisiid glükoositasemet alandava toimega ei olnud (Sedman *et al.*, 2016). Tüüp II diabeedivastane ravim on ka pioglitason, ravi *Wfs1*-puudulikel hiirtel vältis beeta-rakkude apoptoosi ja aitas ära hoida diabeedi välja kujunemist (Akiyama *et al.*, 2009). Alzheimeri tõvega patsientidel parandas pioglitason kognitiivseid võimeid (Hanyu *et al.*, 2009). Teisalt tasuks uurida pioglitasoni neuroprotektiivset mõju ka Wolframi sündroomiga katserottidel.

Wolframi sündroomi võimalike ravimeetodite kontekstis on asjakohane analüüsida ka aju närvikasvu faktori (ingl *brain-derived neurotrophic factor*, BDNF) mimeetikut 7,8-dihüdroksüflavooni (ingl *7,8-dihydroxyflavone*, 7,8-DHF). Nimelt on BDNF neurotrofiinide perekonda kuuluv valk (Palasz *et al.*, 2020), mida sünteesitakse peamiselt kesknärvisüsteemi poolt (Conner *et al.*, 1997), kuid ka näiteks T- ja B-rakkudes ning monotsüütides (Kerschensteiner *et al.*, 1999). Uuringud on näidanud, et BDNF-il on oluline roll sünaptiliste ülekannete läbi viimises hipokampuses ja ka teistes aju piirkondades (Colucci-D'Amato *et al.*, 2020). BDNF-i probleem on aga suutmatus läbida vere-aju barjääri (Poduslo ja Curran, 1996), mistõttu on vaja sarnase toimemehhanismiga mimeetikuid, mis suudaksid barjääri läbida. Üheks BDNF-i mimeetikuks on 7,8-dihüdroksüflavoon (7,8-DHF), *in vivo* on näidatud, et see suutis eakates kognitiivsete häiretega rottides parandada nende ruumilist mõtlemist ja ka mälu (Zeng *et al.*, 2012). Veel on katseliselt näidatud, et WS-i rottidele 7,8-DHF-i ravi teostades paranes võrreldes WT rottidega muuhulgas nende õppimisvõime, alanes neuronaalne põletik ja lükkus edasi optilise atroofia väljakujunemine (Seppa *et al.*, 2021).

Lisaks on nähtud, et valproaathape ja dantroleen võivad olla WS-i potentsiaalsed ravisihtmärgid (Abreu ja Urano, 2019). Epilepsiaravim valproaathape on apoptoosi ära hoidev ja tuju stabiliseeriva omadusega (Abreu ja Urano, 2019; Gharanei *et al.*, 2013), mis aitab muuhulgas tõsta ka WFS1 valgu taset (Kakiuchi *et al.*, 2009). Lihasspasmide leevendamiseks mõeldud

dantroleeni kasutamine WS-i hiiremudelil aitas neuronites ja ka beeta-rakkudes vältida rakusurma (Lu *et al.*, 2014). Siiski ravimit, mis Wolframi sündroomi elimineeriks, vähemalt hetkel ei ole.

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Bakalaureusetöö eesmärk:

1. Välja selgitada RA-süsteemi võtmegeenide (*Bdkrb1*, *Wfs1*, *Agtr1a*, *Agtr1b*, *ACE*, *Agtr2*, *Mas1*, *ACE2* ja *Bdkrb2*) ekspressioonimuster 13-kuuste WS-i rottide (KO) hipokampus võrrelduna kontroll-pesakonnakaaslastega (WT).

2.2. Materjal ja meetodika

2.2.1. Katseloomad

Katseloomadena kasutati isaseid *Wfs1-ex5-KO232* rotte (edaspidi käsitletud kui WS-i rott ehk KO). Loomade geneetiline taust: CD[®] (Sprague Dawley) IGS Rat (Charles River Laboratories, USA), kelle genomist on kustutatud viies kodeeriv ekson (Plaas *et al.*, 2017). WS-i rottide (n = 8) vanus oli 13 kuud. Kontroll-loomadeks olid sama vanad metsik-tüüpi pesakonakaaslased (*wild-type littermates*) (n = 8). Analüüsitud loomad olid anesteetikumide vabad ehk kodupuurist võetud rotid. Loomad olid asetatud puuridesse kahe kuni nelja kaupa, kus neid hoiti 12-tunnises valguse ja pimeduse tsüklis. Valguse tsüklil algas kell seitse hommikul. Rottidel oli piiramatult ligipääs toidule ja pöördosmoosiga puhastatud joogiveele. Loomade dekapiteerimine viidi läbi ajavahemikus kell 09.00–17.00. Loomkatsed sooritati loomkatseprojekti loakomisjoni nõusolekuga (No 195, 27. aprill 2021).

2.2.2. RNA eraldamine hipokampuse kudedest

Katseloomadelt dissekteeritud koetükid hipokampustest külmutati esmalt –80 °C juures. Analüüsiti kokku 16 proovi (KO, n = 8; WT, n = 8). Hipokampuse koetükkidele pipeteeriti 700 µl *TRI Reagent*[®] (Zymo Research, Irvine, CA, USA, kat. R2050-1-200) ning seejärel homogeniseeriti homogeniseerimistuubides *Precellys lysing Kit CK14* (Bertin Instruments, Montigny-le-Bretonneux, France), kasutades homogenisaatorit *Precellys homogenizer* (Bertin Instruments). Summaarse RNA eraldamine proovidest toimus *Direct-zol RNA MiniPrep* (Zymo Research, kat. R2052) abil, vastavalt tootja protokollile. Kõik proovid läbisid ka DNAasi töötused. RNA elueerimiseks kolonnist lisati 30 µl DNAasi/RNaasi vaba vett. Saadud RNA

konsentratsioonid ja kvaliteetid mõõdeti spektrofotomeetriga NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific). Proovidele konsentratsiooniga üle 500 ng tehti vajalikud lahjendused, kasutades selleks DNAasi/RNAasi vaba vett. RNA-d hoiustati edasiseks analüüsiks $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ juures.

2.2.3. cDNA süntees

Komplementaarse DNA (cDNA) sünteesiks vajalik RNA hulk (500 ng) viidi puhtasse PCR tuubi. cDNA sünteesiks vajaminev RNA ja MQ vee lõppmaht oli 10 μl . RNA ja vee 10 μl -sele segule lisati 2 μl heksameeri (50 nM) (Invitrogen, USA), mis on cDNA sünteesi praimer. Pärast heksameeri lisamist asetati proovid 10-ks minutiks termotsüklerisse $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ juurde, hoiti 1 minut jääl ja seejärel tehti *spin-down*. Proovidele lisati SuperScript III segu (Invitrogen), mis koosnes 1 μl -st dNTP-st (10 mM), 4 μl -st *5x First Strand* puhvrast, 1 μl -st DTT-st (0,1 M), 1,5 μl -st MQ veest ja 0,5 μl -st SuperScript III Reverse Transcriptase (200 U/ μl) ensüümist. Kokku pipeteeriti seega 8 μl SuperScript III segu igale proovile. Proovid segati ja tehti taas *spin-down* ning asetati komplementaarse DNA sünteesiks Mastercycler[®] nexus PCR masinasse (Eppendorf AG, Saksamaa) 90 minutiks (toatemperatuuril – 10 min; $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ – 5 min; $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ – 60 min; $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ – 15 min). Valminud cDNA-d asetati $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ juurde.

2.2.4. Kvantitatiivne reaalaja PCR cDNA-dest

Kõikidele uuritavatele cDNA-dele lisati 60 μl MQ vett. Kvantitatiivse reaalaja PCR-i tegemiseks kasutati QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR-i süsteemi (PE Applied Biosystems, USA) ja QuantStudio[™] 12K Flex versioon 1.2.2 tarkvarasüsteemi. Proovide ettevalmistus qPCR-iks toimus vastavalt Taqman süsteemi (PE Applied Biosystems) protokollile. Töös kasutatud praimerite ja sondide nimetused on toodud tabelis 1. Koduhoidja geenina (ingl *Housekeeping gene*) kasutati hüpoksantiin guaniin fosforibosüül transferaas 1 (*Hprt1*) geeni. Kõik reaktsioonid teostati kolmes korduses. Kvantitatiivse reaalaja PCR-i segu valmistamiseks oli ühe proovi kohta vaja 2 μl 5x HOT FIREPol[®] Probe Universal qPCR Mix-i (Solis Biodyne), 5,5 μl MQ vett ja 0,5 μl sondi (tabel 1) uuritava geeni jaoks. Reaktsioonide lõppmaht oli 10 μl , millest 2 μl moodustas cDNA. Geeniekspressiooni analüüsimiseks kasutati $2^{-\Delta\Delta C_t}$ meetodit (Livak ja Schmittgen, 2001).

Tabel 1. qPCR-i reaktsiooni kasutatud Taqmani praimerid ja sondid

Geen	Assay ID	Tootja
<i>ACE</i>	Taqman Assay Rn00561094_m1	Thermo Fisher Scientific
<i>ACE2</i>	Taqman Assay Rn01416293_m1	Thermo Fisher Scientific
<i>Agtr1a</i>	Taqman Assay Rn02758772_s1	Thermo Fisher Scientific
<i>Agtr1b</i>	Taqman Assay Rn02132799_s1	Thermo Fisher Scientific
<i>Agtr2</i>	Taqman Assay Rn00560677_s1	Thermo Fisher Scientific
<i>Bdkrb1</i>	Taqman Assay Rn02064589_s1	Thermo Fisher Scientific
<i>Bdkrb2</i>	Taqman Assay Rn01430057_m1	Thermo Fisher Scientific
<i>Hprt1</i>	Taqman Assay Rn01527840_m1	Thermo Fisher Scientific
<i>Mas1</i>	Taqman Assay Rn00562673_s1	Thermo Fisher Scientific
<i>Wfs1</i>	Taqman Assay Rn00582735_m1	Thermo Fisher Scientific

2.2.5. Statistiline analüüs

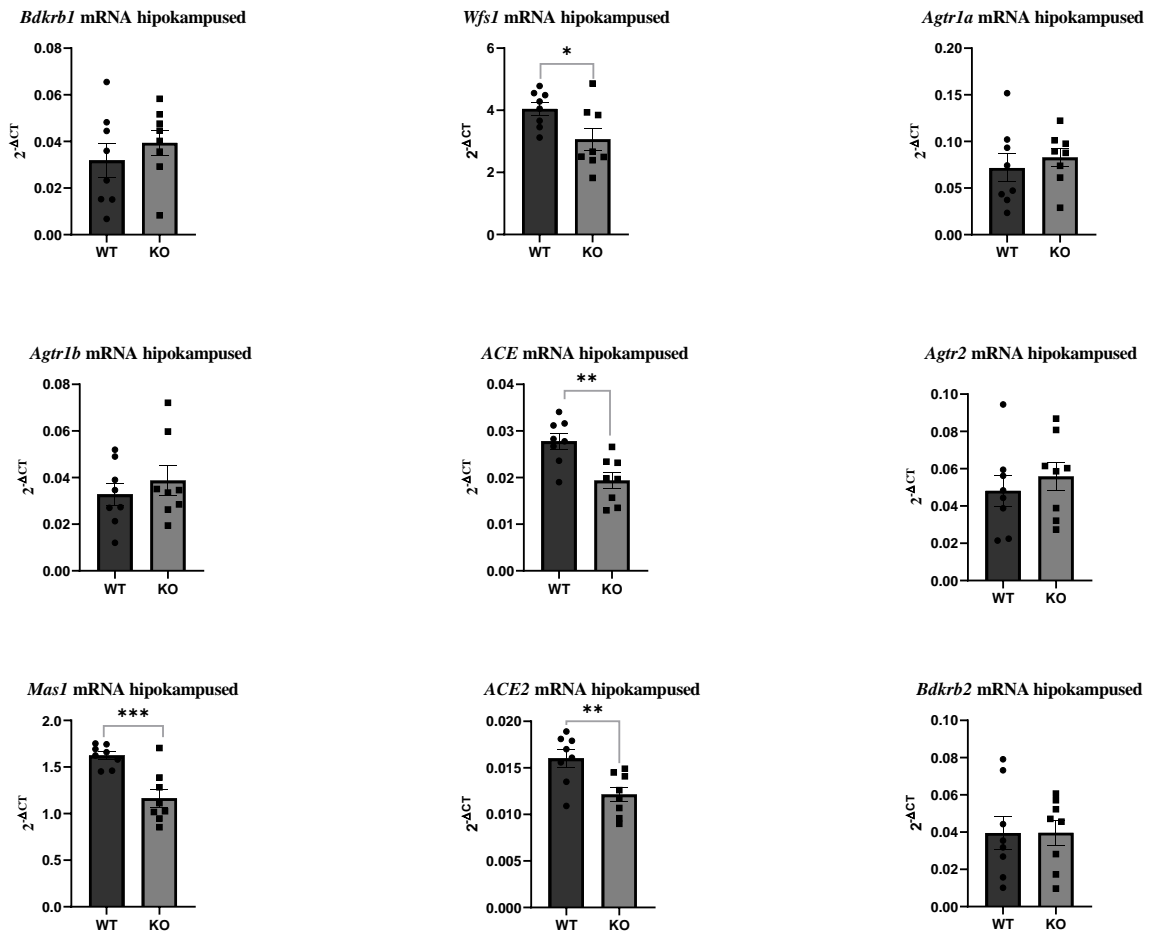
Töö andmed on esitatud keskväärtuse standardveana \pm SEM (ingl *Standard Error of the Mean*). Statistiline analüüs ja graafiku loomine viidi läbi GraphPad Prism'i (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) versioon 8.4.3 abil. Andmete statistika tehti kasutades Studenti t-testi. Statistiliselt oluliseks loeti tulemused, mille p-väärtus oli väiksem kui 0,05 ($p < 0,05$).

2.3. Tulemused

2.3.1. RA-süsteemi kuuluvate geenide ekspressiooni analüüs hipokampustes

Selleks, et hinnata RA-süsteemi geenide ekspressiooni KO ($n = 8$) ja WT ($n = 8$) rottide hipokampustes, teostati reaallaja kvantitatiivne PCR vastavatest cDNA-dest. Uuriti järgmiste geenide ekspressioone: *Bdkrb1*, *Wfs1*, *Agtr1a*, *Agtr1b*, *ACE*, *Agtr2*, *Mas1*, *ACE2* ja *Bdkrb2* (joonis 4). Koduhoidja geenina kasutati *Hprt1*-e. Ekspressiooni tulemuste analüüsimisel leiti statistiliselt oluline ($p < 0,05$) tulemus *Wfs1* geeni puhul, kus KO grupil oli *Wfs1* mRNA suhteline ekspressioon oluliselt madalam kui WT loomadel (joonis 4). Samuti ekspresseerusid *ACE*, *Mas1* ja *ACE2* KO loomades märkimisväärselt ($p < 0,01$) vähem kui WT pesakonnakaaslastel (joonis 4). *Bdkrb1*, *Agtr1a*, *Agtr1b* ja *Agtr2* ekspresseerusid KO rottides mõnel määral enam kui WT rottides, kuid statistiliselt olulist erinevust ei esine. *Bdkrb2* mRNA ekspressioonis WT ja KO loomade vahel märgatavaid tulemusi ei esine (joonis 4).

13-kuuste kodupuuri rottide geeniekspressioonid hipokampustes



Joonis 4. RA-süsteemi spetsiifiliste mRNA-de suhteline ekspressioon 13-kuuste KO ja WT rottide hipokampustes (*hippocampus*). Analüüsitud on *Bdkrb1*, *Wfs1*, *Agr1a*, *Agr1b*, *ACE*, *Agr2*, *Mas1*, *ACE2* ja *Bdkrb2* mRNA suhtelist ekspressiooni KO ehk WS-i rott (n = 8) ja WT (n = 8) rottide hipokampustes. WT hipokampustes on statistiliselt oluliselt kõrgemalt ekspresseeritud vastavalt *Wfs1*, *ACE*, *Mas1* ja *ACE2* võrrelduna KO loomadega. *Bdkrb1*, *Agr1a*, *Agr1b* ja *Agr2* ekspresseeruvad KO rottides mõningal määral rohkem kui WT rottides, kuid statistiliselt olulist erinevust ei esine. *Bdkrb2* ekspressioonis WT ja KO loomade vahel märkimisväärseid erinevusi ei ilmnud. Geeniekspressiooni analüüsimiseks kasutati $2^{-\Delta\Delta C_t}$ meetodit (Livak ja Schmittgen, 2001). Sisemise kontrollina kasutati *Hprt1*. Katsed on tehtud kolmes korduses. Töö andmed on esitatud keskväärtuse standardveana (SEM), andmete statistika tehti kasutades Studenti t-testi. * p < 0,05; ** p < 0,01; * p < 0,001.**

2.4. Arutelu

Wolframi sündroom (WS) on harva esinev monogeenne geneetiline haigus, millel täna puudub kinnitatud „ametlik“ ravi. Enim on raviks kõneainet pakkunud GLP-1 retseptori agonistide kasutamine, mis on näidanud tõhusat efektiivsust pidurdamaks WS-i kulgu nii WS-i loomudelites (Jagomäe *et al.*, 2021; Seppa *et al.*, 2019; Toots *et al.*, 2018) kui ka WS-i patsientidel (Frontino *et al.*, 2021; Scully ja Wolfsdorf, 2020). Samuti ei ole teada *WFS1* geeni täpne funktsioon, kuid enim seostatakse selle rolli kaltsiumi homöostaasi ja ER-i stressivastuse tagamisega (Fonseca *et al.*, 2005; Fonseca *et al.*, 2010; Takeda *et al.*, 2001; Ueda *et al.*, 2005).

Wolframiin 1 on organismis laialdaselt ekspresseerunud valk. Rohkelt võib seda leida nii kõhunäärrest, südamest, reetinast, kesknärvisüsteemist kui ka kopsudest (Hofmann *et al.*, 2003; Inoue *et al.*, 1998; Luuk *et al.*, 2008; Schmidt-Kastner *et al.*, 2009). Asjaolu, et *WFS1* ekspresseerub kopsudes, on pannud teadlasi mõtlema, et ehk põhjustab *WFS1* funktsiooni kadu ka patoloogiaid nii RAA- kui ka RA-süsteemides, kuna kopsudes toimub peamine angiotensiinide konverteerimine ACE ja ACE2 kaudu (Kuba *et al.*, 2006; McKinney *et al.*, 2014; Schweda, 2015; vt joonis 1, peatükk 1.4). WS-i rotte uurides leiti, et juba varajases eas põhjustab funktsionaalse *WFS1* kadu nii kopsudes kui ka südames *Agtr2* ja *Bdkrb1* geeniekspressioonide languse nii *in vivo* ja *in vitro* (Punapart *et al.*, 2021). See aga viitab RA-süsteemi kompensatoorse poole funktsiooni häiretele, mille eesmärk on võidelda lokaalse stressi, põletiku, infektsioonide ja fibrootiliste protsesside vastu. Olgugi, et antud töö limiteerivaks faktoriks oli ainult geeniekspressioonide analüüsimine (valguekspressioone ei analüüsitud), siis võib tõstatada küsimuse, kas uuritud geenide ekspresioonides võib olla erinevusi ka neuraalsetes kudedes eriti just vanemaealistel rottidel. Seda seetõttu, kuna neuroloogilised sümptomid (sealhulgas õpiraskused ja lateraalsete vatsakeste laienemine) on välja arenenud vanadel WS-i rottidel (Seppa *et al.*, 2019; Seppa *et al.*, 2021).

Vältimaks keskkonna ja stressi mõjusid RA-süsteemi võtmegeenide ekspresioonidele, otsustati esialgu uurida naiivseid rotte (kellega polnud tehtud mitte ühtegi katset), kuna on teada, et pikaajaline krooniline stress, erinevad ravimid, protseduurid (sealhulgas näiteks õppimine) võivad lokaalseid RA-süsteeme ja selle geeniekspressioone otseselt mõjutada (Diniz *et al.*, 2018; Saavedra ja Benicky, 2007). Sellest tulenevalt uuriti ja võrreldi käesolevas bakalaureusetöös RA-süsteemi võtmegeenide geeniekspressioone 13 kuud vanade WS-i ja nende pesakonnakaaslastest metsik-tüüpi rottide hipokampustes, kus hipokampuse ammoni sarve (ingl *cornu ammonis*, CA) CA1 regioonis on *WFS1* väga tugevalt ekspresseerunud

(Tekko *et al.*, 2017). Selleks prepareeriti manipuleerimata loomade ajast hipokampused, kust eraldati RNA ning analüüsiti qPCR-i meetodil järgnevate geenide ekspressioone: *Bdkrb1*, *Wfs1*, *Agtr1a*, *Agtr1b*, *ACE*, *Agtr2*, *Mas1*, *ACE2* ja *Bdkrb2*. Leiti, et WS-i roti hipokampustest olid alla reguleeritud nii *Mas1*, *ACE* kui ka *ACE2* geenide ekspressioonid (lisaks *Wfs1* geen), mis viitab sellele, et WFS1 valgu puudulikkus võib põhjustada kõrvalekaldeid lokaalsete RA-süsteemide normaalses toimimises.

Sarnaselt „suurele“ ehk klassikalisele RAA-süsteemile konverteeritakse ka lokaalsetes RA-süsteemides ensüümide ACE ja ACE2 poolt angiotensiini vastavalt angiotensiin II-ks, angiotensiin 1–9-ks ja angiotensiin 1–7-ks (Donoghue *et al.*, 2000; McKinney *et al.*, 2014). ACE2/A1–7/MAS1 raja aktivatsioon stimuleerib kesknärvisüsteemis barorefleksi, alandab vererõhku ning soodustab bradükiniini ja lämmastikoksiidi (NO) vabanemist. Bradükiniin ja NO omakorda võimendavad veresoonte laienemist, mis aitab kaasa kahjustunud koe varustamisele vajalike toitainete ja metaboliitidega (Xia ja Lazartigues, 2008), soodustades nii kiiremat paranemist. MAS1 retseptori agonist AVE0991 hoiab ära hipokampuse närviraku sünapside degeneratsiooni kroonilise aju hüpoperfusiooni (vähenenud verevool) mudelis, vähendab β -amüloidi tasemeid ja neuraalset põletikku (Xue *et al.*, 2021).

Lisaks on näidatud, et A1–7-e krooniline lokaalne manustamine vähendab infarkti mõjuala suurust näriliste ajuinsuldi mudelites (Ferreira *et al.*, 2010). Veel on näidatud, et nii angiotensiin II-l kui ka angiotensiin 1–7-l on oluline roll hipokampuse CA1 regioonis neuronite vaheliste sünapside pikalt kestva (ingl *long-term potentiation*, LTP) ülekande regulatsioonis, tagades nii neuraalset plastilisust. Kusjuures A1–7 seondudes MAS1 retseptoriga võimendab ning angiotensiin II seondudes AGTR1 retseptoriga pidurdab LTP-d (Hellner *et al.*, 2005).

Wolframi sündroomi roti ACE ja ACE2 ekspressiooni langus hipokampuses (vt joonis 4) võib kaudselt viidata angiotensiinide konverteerimise häirele, mille tagajärjel võib olla langenud nii AGTR1a (AT1a), AGTR1b (AT1b), AGTR2 (AT2) kui ka MAS1 retseptorite vahendatud signaali ülekande (vt joonis 1). Varasemalt on näidatud, et nii ACE kui ka ACE2 aktiivsuse languse tagajärjel halveneb närvirakkude vastupanuvõime stressile ja põletikule. Selle tagajärjel hakkab neuronites kuhjuma nii bradükiniin, TAU kui ka β -amüloid, mis on ühine nimetaja paljudele neurodegeneratiivsetele haigustele, sealhulgas Alzheimeri tõvele ja Wolframi sündroomile (Chen *et al.*, 2020; Delpech *et al.*, 2021; Hemming ja Selkoe, 2005; Kehoe *et al.*, 2016; Medeiros *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2020; Oba *et al.*, 2005). Nimelt on leitud, et WFS1 valku sisaldavad närvirakud entorinaalkoores (ingl *entorhinal cortex*) ekspresseerivad

TAU-d ja suunavad selle hipokampuse CA1 püramidaalrakkudesse, mille tagajärjel halveneb nii õpivõime kui ka mälu (Delpech *et al.*, 2021). Lisaks on näidatud, et wolframiin 1 puudulikkus suurendab ja selle üleekspressioon vähendab oluliselt TAU kuhjumist (Chen *et al.*, 2020).

Seega pole välistatud, et WFS1-l on oluliselt suurem roll ka teiste neurodegeneratiivsete haiguste välja kujunemisel ning selle ekspressiooni mõjutavatel ravimitel võib olla tugev terapeutiline väljund neuroloogiliste ja neuropsühhiaatriliste haiguste raviks. Kuigi antud bakalaureusetöö limiteerivaks teguriks on ainult geeniekspressiooni analüüside sooritamine, võib siiski eeldada, et WFS1 puudulikkus põhjustab muutusi mitteklassikalises RA-süsteemis, mille tulemusena on vähenenud *ACE*, *ACE2* ja *Mas1* geeniekspressioonid.

Täna seostatakse *WFS1* geeni ja valku enim kaltsiumi homöostaasi tagamisega ER-i stressivastuse regulatsioonis. Võttes arvesse varasemaid (Punapart *et al.*, 2021) ja käesolevat uuringut, saab siiski oletada, et *WFS1*-puudulikkus võib mõjutada RA-süsteemi funktsiooni, mille tulemusena võimendub oksüdatiivne stress ja põletik. Kokkuvõtvalt võib lokaalse RA-süsteemi kompensatoorse poole (*ACE2/A1-7/MAS1*) alatalitus kiirendada WS-iga seotud patoloogiate välja kujunemist. Kindlasti tasuks edasi uurida, mil viisil on Wolframi sündroomi roti hipokampuse RA-süsteem mõjutatav erisuguste stressorite, aga ka farmakonide poolt. Veel tasuks uurida, kas ravimid, mille sihtmärgiks on RA-süsteem, võivad olla neuroprotektiivsed WS-i loomudelisel või laiemalt neurodegeneratiivsetes haigustes.

KOKKUVÕTE

Käesolevas bakalaureusetöös iseloomustati aju reniin-angiotensiinsüsteemi (RA-süsteemi) võtmegeenide *Bdkrb1*, *Wfs1*, *Agtr1a*, *Agtr1b*, *ACE*, *Agtr2*, *Mas1*, *ACE2* ja *Bdkrb2* ekspressioone 13 kuu vanuste *Wfs1-ex5-KO232* loomade (WS-i rott) hipokampustes. Antud eksperimendi tarvis kasutati naiivseid ehk otse kodupuurist võetud rotte, säästmaks neid erinevatest stressoritest, mis tähendab seda, et vastavate loomadega ei olnud eelnevalt mitte ühtegi manipulatsiooni läbi viidud. Selleks eraldati hipokampuste kudetest RNA, sünteesiti cDNA ja teostati reaalaja kvantitatiivne PCR. Seejärel analüüsiti saadud tulemusi.

Tulemuseks saadi, et WS-i rottide hipokampustes ekspresseerusid oluliselt madalamalt *Wfs1*, *ACE*, *Mas1* ja *ACE2* geenid võrreldes nende pesakonnakaaslastest kontroll-loomadega. Teisalt *Bdkrb1*, *Agtr1a*, *Agtr1b* ja *Agtr2* ekspresseerusid *knock-out* (KO) katseloomades mõningal määral rohkem kui nende pesakonnakaaslastest WT rottides, kuid statistiliselt olulist erinevust siiski ei esinenud. *Bdkrb2* ekspressioonis WT ja KO loomade vahel vahesid ei ilmnunud. Saadud geeniekspressiooni mustrid võivad kaudselt viidata sellele, et WFS1 valgu puudulikkus võib põhjustada häireid aju RA-süsteemi normaalses töös, vastutades seejuures võimalike õppimishäirete ja neuroloogiliste haiguste välja kujunemise eest.

Bakalaureusetöö limiteerivaks faktoriks on see, et vastavate geenide valguekspressiooni tasemeid ei uuritud. Käesolevast tööst võib järeldada, et WS-i rottides on võimalik RA-süsteemi häirumine just angiotensiinide konverteerimise seisukohalt. Kuna ka *Mas1* geenil oli madalam ekspressioon võrreldes pesakonnakaaslastest WT loomadega, võib see viidata ACE2/A1–7/MAS1 telje töö probleemidele.

Characterization of the RAS key gene expressions in a Wolfram syndrome rat's hippocampus

Silvia Kirillov

SUMMARY

Wolfram syndrome (WS) is a rare monogenic disease, which is caused by mutations in the *WFS1* gene and is mainly characterized by diabetes mellitus, optic atrophy and neurodegeneration. WFS1 protein is a transmembrane protein localized in the endoplasmic reticulum (ER) and is often associated with an increased ER stress response. In other words, WFS1 acts as a negative regulator of the ER stress response. The WS patients usually die from respiratory failure (with an average age of about thirty), which is caused by brain stem atrophy.

This research paper also gave an overview of the famous renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS), as well as the local renin-angiotensin systems (RAS). The RAAS is a critical regulator of blood pressure, responsible for the maintenance of sodium and water balance, while the overactivation of this system is often related to many chronic diseases, including cardiovascular problems. The local brain RAS is no less important and the dysregulations of this system are associated with several neurodegenerative diseases like the Alzheimer's. Additionally, there is also an interesting link between an elevated blood pressure and neural diseases.

The WFS1 protein is expressed in various tissues, such as in the brain, pancreas, retina, heart and lungs. Interestingly, the RAAS and RAS key components are expressed in the same tissues as well. The scientists thought that the *Wfs1*-deficiency might have a role or even be responsible for causing pathologies in the RAS system. So, the aim of this study was to evaluate the gene expressions of the brain RAS key genes in the 13-month-old *Wfs1*-deficient (*Wfs1232ex5KO*) naive rats. The following gene expressions were analyzed in the hippocampi: *Bdkrb1*, *Wfs1*, *Agtr1a*, *Agtr1b*, *ACE*, *Agtr2*, *Mas1*, *ACE2* and *Bdkrb2*. The first step of the experiment was the RNA isolation from the rat's hippocampi, followed by the cDNA synthesis and lastly, the quantitative real-time PCR and analysis, was performed.

As a result, the WS rats showed a statistically significant ($p < 0,05$) lower expression in the *Wfs1*, *ACE*, *Mas1* and *ACE2* genes compared to their wild-type littermates (as a control). No

statistically significant differences were noticed in the following gene expressions: *Bdkrb1*, *Agtr1a*, *Agtr1b*, *Agtr2* and *Bdkrb2*. These results might indicate that in the Wolfram syndrome rats there are possibly interruptions in the ACE2/A1–7/MAS1 axis, which could be responsible for causing pathologies in the RAS.

The author is aware of the limitations, such as no protein levels were analyzed. It is known that the gene expression and protein levels do not always correlate with each other. It should be further studied, whether the RAS-targeted therapies could have a neuroprotective role in a Wolfram syndrome rat model or in other neurodegenerative diseases.

TÄNUSÕNAD

Siirad tänuavaldused minu juhendajale Mario Plaasile ning kaasjuhendajatele Kadri Seppale ja Tambet Tõnissoole! Tänan ka oma lähedasi, kes on olnud suureks toeks sel retkel.

KIRJANDUSE LOETELU

Abbasi, R., Bitarafan, F., Khodaeian, M., Ebrahim-Habibi, A., Abbasi, F. and Amoli, M. M. (2016). Molecular investigation of WFS1 gene exon 8 in Iranian patients with Wolfram syndrome. *International Journal of Diabetes in Developing Countries* 36(1): 75–80.

Abreu, D. and Urano, F. (2019). Current landscape of treatments for Wolfram syndrome. *Trends in Pharmacological Sciences* 40(10): 711–714.

Agassandian, K., Grobe, J. L., Liu, X., Agassandian, M., Thompson, A. P., Sigmund, C. D. and Cassell, M. D. (2017). Evidence for intraventricular secretion of angiotensinogen and angiotensin by the subfornical organ using transgenic mice. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 312(6): R973–R981.

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(4): 653–663.

Atlas, S. A. (2007). The renin-angiotensin aldosterone system: Pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *Journal of Managed Care & Specialty Pharmacy* 13(8 Supp B): 9–20.

Baker, P. R., Nanduri, P., Gottlieb, P. A., Yu, L., Klingensmith, G. J., Eisenbarth, G. S. and Barker, J. M. (2012). Predicting the onset of Addison's disease: ACTH, renin, cortisol and 21-hydroxylase autoantibodies. *Clinical Endocrinology* 76(5): 617–624.

Barrett, T. G. and Bunday, S. E. (1997). Wolfram (DIDMOAD) syndrome. *Journal of Medical Genetics* 34(10): 838–841.

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

Bennion, D. M., Haltigan, E., Regenhardt, R. W., Steckelings, U. M. and Summers, C. (2015). Neuroprotective mechanisms of the ACE2–Angiotensin-(1-7)-Mas axis in stroke. *Current Hypertension Reports* 17(2): 1–10.

- Bertagnolli, M., Dios, A., Béland-Bonenfant, S., Gascon, G., Sutherland, M., Lukaszewski, M.-A., Cloutier, A., Paradis, P., Schiffrin, E. L. and Nuyt, A. M. (2016). Activation of the cardiac renin-angiotensin system in high oxygen-exposed newborn rats: Angiotensin receptor blockade prevents the developmental programming of cardiac dysfunction. *Hypertension* 67(4): 774–782.
- Brassard, P., Amiri, F. and Schiffrin, E. L. (2005). Combined angiotensin II type 1 and type 2 receptor blockade on vascular remodeling and matrix metalloproteinases in resistance arteries. *Hypertension* 46(3): 598–606.
- Bravo, R., Parra, V., Gatica, D., ... Lavandero, S. (2013). Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: Dynamics and metabolic integration. *International Review of Cell and Molecular Biology* 301: 215–290.
- Bodiga, V. L. and Bodiga, S. (2013). Renin angiotensin system in cognitive function and dementia. *Asian Journal of Neuroscience* 2013.
- Bogdarina, I. G., King, P. J. and Clark, A. J. (2009). Characterization of the angiotensin (AT1b) receptor promoter and its regulation by glucocorticoids. *Journal of Molecular Endocrinology* 43(2): 73.
- Bolshakova, A. V., Kukanova, E. O., Gainullina, A. N., Zhemkov, V. A., Korban, S. A. and Bezprozvanny, I. B. (2016). Sigma-1 receptor as a potential pharmacological target for the treatment of neuropathology. *St. Petersburg Polytechnical University Journal: Physics and Mathematics* 2(1): 31–40.
- Brown, M. J. (2007). Renin: Friend or foe? *Heart* 93(9): 1026–1033.
- Cerniello, F. M., Carretero, O. A., Longo Carbajosa, N. A., Cerrato, B. D., Santos, R. A., Grecco, H. E. and Gironacci, M. M. (2017). Mas1 receptor trafficking involves ERK1/2 activation through a β -Arrestin2–Dependent pathway. *Hypertension* 70(5): 982–989.
- Chen, S., Venkaraman, L., Liang, J., ... Fu, H. (2020). Deficiency of WFS1 increases vulnerability to pathological tau in vitro and in vivo: *Molecular and cell biology/tau. Alzheimer's & Dementia* 16: e042085.

- Chiolero, A., Maillard, M., Nussberger, J., Brunner, H.-R. and Burnier, M. (2000). Proximal sodium reabsorption: An independent determinant of blood pressure response to salt. *Hypertension* 36(4): 631–637.
- Chung, E. Y., Ruospo, M., Natale, P., Bolignano, D., Navaneethan, S. D., Palmer, S. C. and Strippoli, G. F. (2020). Aldosterone antagonists in addition to renin angiotensin system antagonists for preventing the progression of chronic kidney disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 10.
- Colafella, K. M. M., Bovée, D. M. and Danser, A. J. (2019). The renin-angiotensin-aldosterone system and its therapeutic targets. *Experimental Eye Research* 186: 107680.
- Colucci-D'Amato, L., Speranza, L. and Volpicelli, F. (2020). Neurotrophic factor BDNF, physiological functions and therapeutic potential in depression, neurodegeneration and brain cancer. *International Journal of Molecular Sciences* 21(20): 7777.
- Conner, J. M., Lauterborn, J. C., Yan, Q., Gall, C. M. and Varon, S. (1997). Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport. *Journal of Neuroscience* 17(7): 2295–2313.
- Crisan, D. and Carr, J. (2000). Angiotensin I-converting enzyme: Genotype and disease associations. *The Journal of Molecular Diagnostics* 2(3): 105–115.
- Crouzier, L., Danese, A., Yasui, Y., ... Delprat, B. (2022). Activation of the sigma-1 receptor chaperone alleviates symptoms of Wolfram syndrome in preclinical models. *Science Translational Medicine* 14(631): eabh3763.
- da Graça Naffah-Mazzacoratti, M., Gouveia, T. L. F., Simões, P. S. R. and Perosa, S. R. (2014). What have we learned about the kallikrein-kinin and renin-angiotensin systems in neurological disorders? *World Journal of Biological Chemistry* 5(2): 130.
- de Heredia, M. L., Clèries, R. and Nunes, V. (2013). Genotypic classification of patients with Wolfram syndrome: Insights into the natural history of the disease and correlation with phenotype. *Genetics in Medicine* 15(7): 497–506.

Delpech, J.-C., Pathak, D., Varghese, M., ... Ikezu, T. (2021). Wolframin-1-expressing neurons in the entorhinal cortex propagate tau to CA1 neurons and impair hippocampal memory in mice. *Science Translational Medicine* 13(611): eabe8455.

Diniz, C. R., Casarotto, P. C., Fred, S. M., Biojone, C., Castrén, E. and Joca, S. R. (2018). Antidepressant-like effect of losartan involves TRKB transactivation from angiotensin receptor type 2 (AGTR2) and recruitment of FYN. *Neuropharmacology* 135: 163–171.

Donoghue, M., Hsieh, F., Baronas, E., ... Acton, S. (2000). A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circulation Research* 87(5): e1–e9.

Drenjančević-Perić, I., Jelaković, B., Lombard, J., Kunert, M., Kibel, A. and Gros, M. (2011). High-salt diet and hypertension: Focus on the renin-angiotensin system. *Kidney and Blood Pressure Research* 34(1): 1–11.

e Silva, A. C. S. and Teixeira, M. M. (2016). ACE inhibition, ACE2 and angiotensin-(1–7) axis in kidney and cardiac inflammation and fibrosis. *Pharmacological Research* 107: 154–162.

Farag, E., Sessler, D. I., Ebrahim, Z., Kurz, A., Morgan, J., Ahuja, S., Maheshwari, K. and Doyle, D. J. (2017). The renin angiotensin system and the brain: New developments. *Journal of Clinical Neuroscience* 46: 1–8.

Feener, E. P., Northrup, J. M., Aiello, L. P. and King, G. L. (1995). Angiotensin II induces plasminogen activator inhibitor-1 and-2 expression in vascular endothelial and smooth muscle cells. *The Journal of Clinical Investigation* 95(3): 1353–1362.

Ferrario, C. M., Trask, A. J. and Jessup, J. A. (2005). Advances in biochemical and functional roles of angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1–7) in regulation of cardiovascular function. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 289(6): H2281–H2290.

Ferreira, A. J., Santos, R. A., Bradford, C. N., Mecca, A. P., Sumners, C., Katovich, M. J. and Raizada, M. K. (2010). Therapeutic implications of the vasoprotective axis of the renin-angiotensin system in cardiovascular diseases. *Hypertension* 55(2): 207–213.

Fonseca, S. G., Fukuma, M., Lipson, K. L., Nguyen, L. X., Allen, J. R., Oka, Y. and Urano, F. (2005). WFS1 is a novel component of the unfolded protein response and maintains homeostasis of the endoplasmic reticulum in pancreatic β -cells. *Journal of Biological Chemistry* 280(47): 39609–39615.

Fonseca, S. G., Ishigaki, S., Osowski, ... Urano, F. (2010). Wolfram syndrome 1 gene negatively regulates ER stress signaling in rodent and human cells. *The Journal of Clinical Investigation* 120(3): 744–755.

Frontino, G., Raouf, T., Canarutto, D., ... Piemonti, L. (2021). Case Report: Off-Label Liraglutide Use in Children With Wolfram Syndrome Type 1: Extensive Characterization of Four Patients. *Frontiers in Pediatrics* 9.

Ganten, D., Marquez-Julio, A., Granger, P., Hayduk, K., Karsunky, K. P., Boucher, R. and Genest, J. (1971). Renin in dog brain. *American Journal of Physiology-Legacy Content* 221(6): 1733–1737.

Garcia, P. J. M. and Marin-Castaño, M. E. (2014). Angiotensin II-related hypertension and eye diseases. *World Journal of Cardiology* 6(9): 968.

Gharanei, S., Zatyka, M., Astuti, D., Fenton, J., Sik, A., Nagy, Z. and Barrett, T. G. (2013). Vacuolar-type H⁺-ATPase V1A subunit is a molecular partner of Wolfram syndrome 1 (WFS1) protein, which regulates its expression and stability. *Human Molecular Genetics* 22(2): 203–217.

Girolami, J.-P., Bouby, N., Richer-Giudicelli, C. and Alhenc-Gelas, F. (2021). Kinins and kinin receptors in cardiovascular and renal diseases. *Pharmaceuticals* 14(3): 240.

Gironacci, M. M. (2015). Angiotensin-(1–7): Beyond its central effects on blood pressure. *Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease* 9(4): 209–216.

Grobe, J. L., Xu, D. and Sigmund, C. D. (2008). An intracellular renin-angiotensin system in neurons: Fact, hypothesis, or fantasy. *Physiology* 23(4): 187–193.

Guo, D. F., Sun, Y. L., Hamet, P. and Inagami, T. (2001). The angiotensin II type 1 receptor and receptor-associated proteins. *Cell Research* 11(3): 165–180.

- Guo, X., Shen, S., Song, S., ... Zhang, L. (2011). The E3 ligase Smurf1 regulates Wolfram syndrome protein stability at the endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry* 286(20): 18037–18047.
- Hanyu, H., Sato, T., Kiuchi, A., Sakurai, H. and Iwamoto, T. (2009). Pioglitazone improved cognition in a pilot study on patients with Alzheimer's disease and mild cognitive impairment with diabetes mellitus. *Journal of the American Geriatrics Society* 57(1): 177–179.
- Hardy, C., Khanim, F., Torres, R., ... Barrett, T. (1999). Clinical and molecular genetic analysis of 19 Wolfram syndrome kindreds demonstrating a wide spectrum of mutations in WFS1. *The American Journal of Human Genetics* 65(5): 1279–1290.
- Hellner, K., Walther, T., Schubert, M. and Albrecht, D. (2005). Angiotensin-(1–7) enhances LTP in the hippocampus through the G-protein-coupled receptor Mas. *Molecular and Cellular Neuroscience* 29(3): 427–435.
- Hemming, M. L. and Selkoe, D. J. (2005). Amyloid β -protein is degraded by cellular angiotensin-converting enzyme (ACE) and elevated by an ACE inhibitor. *Journal of Biological Chemistry* 280(45): 37644–37650.
- Hofmann, S., Philbrook, C., Gerbitz, K.-D. and Bauer, M. F. (2003). Wolfram syndrome: Structural and functional analyses of mutant and wild-type wolframin, the WFS1 gene product. *Human Molecular Genetics* 12(16): 2003–2012.
- Huang, X., Lu, G., Li, G., Li, H., Li, B., Yin, J. and Cao, S. (2017). Dynamic changes in the renin-angiotensin-aldosterone system and the beneficial effects of renin-angiotensin-aldosterone inhibitors on spatial learning and memory in a rat model of chronic cerebral ischemia. *Frontiers in Neuroscience* 11: 359.
- 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). *Nature Genetics* 20(2): 143–148.
- Jagomäe, T., Seppa, K., Reimets, R., ... Plaas, M. (2021). Early intervention and lifelong treatment with GLP1 receptor agonist liraglutide in a Wolfram Syndrome rat model with an emphasis on visual neurodegeneration, sensorineural hearing loss and diabetic phenotype. *Cells* 10(11): 3193.

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

Kehoe, P. G., Wong, S., Al Mulhim, N., Palmer, L. E. and Miners, J. S. (2016). Angiotensin-converting enzyme 2 is reduced in Alzheimer's disease in association with increasing amyloid- β and tau pathology. *Alzheimer's Research & Therapy* 8(1): 1–10.

Kerr, D. S., Bevilaqua, L. R., Bonini, J. S., Rossato, J. I., Köhler, C. A., Medina, J. H., Izquierdo, I. and Cammarota, M. (2005). Angiotensin II blocks memory consolidation through an AT2 receptor-dependent mechanism. *Psychopharmacology* 179(3): 529–535.

Kerschensteiner, M., Gallmeier, E., Behrens, ... Hohlfeld, R. (1999). Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: A neuroprotective role of inflammation? *The Journal of Experimental Medicine* 189(5): 865–870.

Kim, C.-H., Park, S.-H., Sim, Y.-B., Kim, S.-S., Kim, S.-J., Lim, S.-M., Jung, J.-S. and Suh, H.-W. (2014). Effect of tolbutamide, glyburide and glipizide administered supraspinally on CA3 hippocampal neuronal cell death and hyperglycemia induced by kainic acid in mice. *Brain Research* 1564: 33–40.

Kuba, K., Imai, Y. and Penninger, J. M. (2006). Angiotensin-converting enzyme 2 in lung diseases. *Current Opinion in Pharmacology* 6(3): 271–276.

Labandeira-Garcia, J. L., Rodríguez-Perez, A. I., Garrido-Gil, P., Rodríguez-Pallares, J., Lanciego, J. L. and Guerra, M. J. (2017). Brain renin-angiotensin system and microglial polarization: Implications for aging and neurodegeneration. *Frontiers in aging neuroscience* 9: 129.

Launer, L. J., Masaki, K., Petrovitch, H., Foley, D. and Havlik, R. J. (1995). The association between midlife blood pressure levels and late-life cognitive function: The Honolulu-Asia Aging Study. *The Journal of the American Medical Association* 274(23): 1846–1851.

- Lavoie, J. L., Cassell, M. D., Gross, K. W. and Sigmund, C. D. (2004). Localization of renin expressing cells in the brain, by use of a REN-eGFP transgenic model. *Physiological Genomics* 16(2): 240–246.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25(4): 402–408.
- Lu, J., Zhang, Y. and Shi, J. (2008). Effects of intracerebroventricular infusion of angiotensin-(1–7) on bradykinin formation and the kinin receptor expression after focal cerebral ischemia–reperfusion in rats. *Brain Research* 1219: 127–135.
- Lu, S., Kanekura, K., Hara, T., ... Urano, F. (2014). A calcium-dependent protease as a potential therapeutic target for Wolfram syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(49): E5292–E5301.
- Lucius, R., Gallinat, S., Rosenstiel, P., Herdegen, T., Sievers, J. and Unger, T. (1998). The angiotensin II type 2 (AT2) receptor promotes axonal regeneration in the optic nerve of adult rats. *The Journal of Experimental Medicine* 188(4): 661–670.
- Luuk, H., Koks, S., Plaas, M., Hannibal, J., Rehfeld, J. F. and Vasar, E. (2008). Distribution of Wfs1 protein in the central nervous system of the mouse and its relation to clinical symptoms of the Wolfram syndrome. *Journal of Comparative Neurology* 509(6): 642–660.
- Maggioni, A. P. (2006). Efficacy of angiotensin receptor blockers in cardiovascular disease. *Cardiovascular Drugs and Therapy* 20(4): 295–308.
- Mascolo, A., Scavone, C., Rafaniello, C., De Angelis, A., Urbanek, K., di Mauro, G., Cappetta, D., Berrino, L., Rossi, F. and Capuano, A. (2021). The role of renin-angiotensin-aldosterone system in the heart and lung: Focus on COVID-19. *Frontiers in Pharmacology* 12.
- Mascolo, A., Sessa, M., Scavone, C., De Angelis, A., Vitale, C., Berrino, L., Rossi, F., Rosano, G. and Capuano, A. (2017). New and old roles of the peripheral and brain renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS): Focus on cardiovascular and neurological diseases. *International Journal of Cardiology* 227: 734–742.

- McKinney, C. A., Fattah, C., Loughrey, C. M., Milligan, G. and Nicklin, S. A. (2014). Angiotensin-(1–7) and angiotensin-(1–9): Function in cardiac and vascular remodelling. *Clinical Science* 126(12): 815–827.
- Medeiros, R., Baglietto-Vargas, D. and LaFerla, F. M. (2011). The role of tau in Alzheimer's disease and related disorders. *CNS Neuroscience & Therapeutics* 17(5): 514–524.
- Mercerón-Martínez, D., Ibaceta-González, C., Salazar, C., Almaguer-Melian, W., Bergado-Rosado, J. A. and Palacios, A. G. (2021). Alzheimer's disease, neural plasticity, and functional recovery. *Journal of Alzheimer's Disease* 82(s1): S37–S50.
- Milsted, A., Barna, B. P., Ransohoff, R. M., Brosnihan, K. B. and Ferrario, C. M. (1990). Astrocyte cultures derived from human brain tissue express angiotensinogen mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87(15): 5720–5723.
- Murphy, M. P. and LeVine III, H. (2010). Alzheimer's disease and the β -amyloid peptide. *Journal of Alzheimer's Disease* 19(1): 311–323.
- Nakajima, M., Hutchinson, H. G., Fujinaga, M., Hayashida, W., Morishita, R., Zhang, L., Horiuchi, M., Pratt, R. E. and Dzau, V. J. (1995). The angiotensin II type 2 (AT2) receptor antagonizes the growth effects of the AT1 receptor: Gain-of-function study using gene transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92(23): 10663–10667.
- Navar, L. G. (2014). Physiology: hemodynamics, endothelial function, renin-angiotensin-aldosterone system, sympathetic nervous system. *Journal of the American Society of Hypertension* 8(7): 519.
- Nehme, A., Cerutti, C., Dhaouadi, N., Gustin, M. P., Courand, P.-Y., Zibara, K. and Bricca, G. (2015). Atlas of tissue renin-angiotensin-aldosterone system in human: A transcriptomic meta-analysis. *Scientific Reports* 5(1): 1–14.
- Noda, M., Kariura, Y., Pannasch, U., ... Wada, K. (2007). Neuroprotective role of bradykinin because of the attenuation of pro-inflammatory cytokine release from activated microglia. *Journal of Neurochemistry* 101(2): 397–410.

- Oba, R., Igarashi, A., Kamata, M., Nagata, K., Takano, S. and Nakagawa, H. (2005). The N-terminal active centre of human angiotensin-converting enzyme degrades Alzheimer amyloid β -peptide. *European Journal of Neuroscience* 21(3): 733–740.
- Padia, S. H., Kemp, B. A., Howell, N. L., Fournie-Zaluski, M.-C., Roques, B. P. and Carey, R. M. (2008). Conversion of renal angiotensin II to angiotensin III is critical for AT2 receptor-mediated natriuresis in rats. *Hypertension* 51(2): 460–465.
- Palasz, E., Wysocka, A., Gasiorowska, A., Chalimoniuk, M., Niewiadomski, W. and Niewiadomska, G. (2020). BDNF as a promising therapeutic agent in Parkinson's disease. *International Journal of Molecular Sciences* 21(3): 1170.
- Parish, R. C. and Miller, L. J. (1992). Adverse effects of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors. *Drug Safety* 7(1): 14–31.
- Patel, S., Rauf, A., Khan, H. and Abu-Izneid, T. (2017). Renin-angiotensin-aldosterone (RAAS): The ubiquitous system for homeostasis and pathologies. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 94: 317–325.
- Paul, M., Poyan Mehr, A. and Kreutz, R. (2006). Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiological Reviews* 86(3): 747–803.
- Pei, N., Mao, Y., Wan, P., ... Hongwei, L. (2017). Angiotensin II type 2 receptor promotes apoptosis and inhibits angiogenesis in bladder cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 36(1): 1–12.
- Petrovitch, H., White, L., Izmirilian, G., Launer, L. J. (2000). Midlife blood pressure and neuritic plaques, neurofibrillary tangles, and brain weight at death: the HAAS☆. *Neurobiology of Aging* 21(1): 57–62.
- Plaas, M., Seppa, K., Reimets, R., ... Vasar, E. (2017). Wfs1-deficient rats develop primary symptoms of Wolfram syndrome: Insulin-dependent diabetes, optic nerve atrophy and medullary degeneration. *Scientific Reports* 7(1): 1–16.

- Poduslo, J. F. and Curran, G. L. (1996). Permeability at the blood-brain and blood-nerve barriers of the neurotrophic factors: NGF, CNTF, NT-3, BDNF. *Molecular Brain Research* 36(2): 280–286.
- Prince, M., Bryce, R., Albanese, E., Wimo, A., Ribeiro, W. and Ferri, C. P. (2013). The global prevalence of dementia: A systematic review and metaanalysis. *Alzheimer's & Dementia* 9(1): 63–75.
- Punapart, M., Seppa, K., Jagomäe, T., ... Plaas, M. (2021). The Expression of RAAS Key Receptors, *Agtr2* and *Bdkrb1*, Is Downregulated at an Early Stage in a Rat Model of Wolfram Syndrome. *Genes* 12(11): 1717.
- Rigoli, L., Lombardo, F. and Di Bella, C. (2011). Wolfram syndrome and *WFS1* gene. *Clinical Genetics* 79(2): 103–117.
- Romero, C. A., Orias, M. and Weir, M. R. (2015). Novel RAAS agonists and antagonists: Clinical applications and controversies. *Nature Reviews Endocrinology* 11(4): 242–252.
- Saavedra, J. M. and Benicky, J. (2007). Brain and peripheral angiotensin II play a major role in stress. *Stress* 10(2): 185–193.
- Santos, R. A. (2014). Angiotensin-(1–7). *Hypertension* 63(6): 1138–1147.
- Santos, R. A. S., Silva, A. C. S. e., Maric, C., ... Walther, T. (2003). Angiotensin-(1–7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(14): 8258–8263.
- Schmaier, A. H. (2002). The plasma kallikrein-kinin system counterbalances the renin-angiotensin system. *The Journal of Clinical Investigation* 109(8): 1007–1009.
- Schmidt-Kastner, R., Kreczmanski, P., Preising, M., Diederer, R., Schmitz, C., Reis, D., Blanks, J. and Dorey, C. K. (2009). Expression of the diabetes risk gene wolframin (*WFS1*) in the human retina. *Experimental Eye Research* 89(4): 568–574.
- Schweda, F. (2015). Salt feedback on the renin-angiotensin-aldosterone system. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 467(3): 565–576.

- Scully, K. J. and Wolfsdorf, J. I. (2020). Efficacy of GLP-1 Agonist Therapy in Autosomal Dominant WFS1-Related Disorder: A Case Report. *Hormone Research in Pediatrics* 93(6): 409–414.
- Sedman, T., Rünkorg, K., Krass, M., Luuk, H., Plaas, M., Vasar, E. and Volke, V. (2016). Exenatide Is an effective antihyperglycaemic agent in a mouse model of Wolfram syndrome 1. *Journal of Diabetes Research* 2016.
- Seppa, K., Jagomäe, T., Kukker, K. G., Reimets, R., Pastak, M., Vasar, E., Terasmaa, A. and Plaas, M. (2021). Liraglutide, 7, 8-DHF and their co-treatment prevents loss of vision and cognitive decline in a Wolfram syndrome rat model. *Scientific Reports* 11(1): 1–14.
- Seppa, K., Toots, M., Reimets, R., ... Plaas, M. (2019). GLP-1 receptor agonist liraglutide has a neuroprotective effect on an aged rat model of Wolfram syndrome. *Scientific Reports* 9(1): 1–13.
- Sherrod, M., Liu, X., Zhang, X. and Sigmund, C. D. (2005). Nuclear localization of angiotensinogen in astrocytes. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 288(2): R539–R546.
- Singh, P. K., Chen, Z.-L., Ghosh, D., Strickland, S. and Norris, E. H. (2020). Increased plasma bradykinin level is associated with cognitive impairment in Alzheimer’s patients. *Neurobiology of Disease* 139: 104833.
- Skoog, I., Nilsson, L., Persson, G., Lernfelt, B., Landahl, S., Palmertz, B., Andreasson, L., Oden, A. and Svanborg, A. (1996). 15-year longitudinal study of blood pressure and dementia. *The Lancet* 347(9009): 1141–1145.
- Staessen, J. A., Li, Y. and Richart, T. (2006). Oral renin inhibitors. *The Lancet* 368(9545): 1449–1456.
- Strom, T. M., Hörtnagel, K., Hofmann, S., Gekeler, F., Scharfe, C., Rabl, W., Gerbitz, K. D. and Meitinger, T. (1998). Diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy and deafness (DIDMOAD) caused by mutations in a novel gene (wolframin) coding for a predicted transmembrane protein. *Human Molecular Genetics* 7(13): 2021–2028.

Swift, R., Sadler, D. and Swift, M. (1990). Psychiatric findings in Wolfram syndrome homozygotes. *The Lancet* 336(8716): 667–669.

Zhang, F., Liu, H., Liu, D., Liu, Y., Li, H., Tan, X., Liu, F., Peng, Y. and Zhang, H. (2017). Effects of RAAS inhibitors in patients with kidney disease. *Current Hypertension Reports* 19(9): 1–7.

Zhang, F., Xu, Y., Pan, Y., Sun, S., Chen, A., Li, P., Bao, C., Wang, J., Tang, H. and Han, Y. (2019). Effects of angiotensin-(1-7) and angiotensin II on acetylcholine-induced vascular relaxation in spontaneously hypertensive rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2019.

Zhang, T.-L., Fu, J.-L., Geng, Z., Yang, J.-J. and Sun, X.-J. (2012). The Neuroprotective Effect of Losartan through Inhibiting AT 1/ASK 1/MKK 4/JNK 3 Pathway Following Cerebral I/R in Rat Hippocampal CA 1 Region. *CNS Neuroscience & Therapeutics* 18(12): 981–987.

Zeng, Y., Lv, F., Li, L., Yu, H., Dong, M. and Fu, Q. (2012). 7, 8-dihydroxyflavone rescues spatial memory and synaptic plasticity in cognitively impaired aged rats. *Journal of Neurochemistry* 122(4): 800–811.

Zhao, W., Zhao, T., Chen, Y. and Sun, Y. (2015). Angiotensin 1-7 promotes cardiac angiogenesis following infarction. *Current Vascular Pharmacology* 13(1): 37–42.

Takeda, K., Inoue, H., Tanizawa, Y., Matsuzaki, Y., Oba, J., Watanabe, Y., Shinoda, K. and Oka, Y. (2001). WFS1 (Wolfram syndrome 1) gene product: Predominant subcellular localization to endoplasmic reticulum in cultured cells and neuronal expression in rat brain. *Human Molecular Genetics* 10(5): 477–484.

Taylor, W. D., Benjamin, S., McQuoid, D. R., Payne, M. E., Krishnan, R. R., MacFall, J. R. and Ashley-Koch, A. (2012). AGTR1 gene variation: Association with depression and frontotemporal morphology. *Psychiatry Research: Neuroimaging* 202(2): 104–109.

Tekko, T., Laksper, T., Allikalt, A., ... Lilleväli, K. (2017). Wfs1 is expressed in dopaminergic regions of the amniote brain and modulates levels of D1-like receptors. *PLOS ONE* 12(3): e0172825.

- Tigerstedt, R. and Bergman, P. (1898). Niere und Kreislauf 1. Skandinavisches Archiv für Physiologie 8(1): 223–271.
- Toots, M., Seppa, K., Jagomäe, T., Koppel, T., Pallase, M., Heinla, I., Terasmaa, A., Plaas, M. and Vasar, E. (2018). Preventive treatment with liraglutide protects against development of glucose intolerance in a rat model of Wolfram syndrome. *Scientific Reports* 8(1): 1–10.
- Ueda, K., Kawano, J., Takeda, K., ... Tanizawa, Y. (2005). Endoplasmic reticulum stress induces Wfs1 gene expression in pancreatic β -cells via transcriptional activation. *European Journal of Endocrinology* 153(1): 167–176.
- Ueki, N., Takeda, S., Koya, D. and Kanasaki, K. (2015). The relevance of the renin-angiotensin system in the development of drugs to combat preeclampsia. *International Journal of Endocrinology* 2015.
- Unger, T. (2002). The role of the renin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease. *The American Journal of Cardiology* 89(2): 3–9.
- Urano, F. (2016). Wolfram syndrome: Diagnosis, management, and treatment. *Current Diabetes Reports* 16(6).
- Wal, P., Wal, A., Rai, A. K. and Dixit, A. (2011). Aliskiren: An orally active renin inhibitor. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences* 3(2): 189.
- Wang, L., Liu, H., Zhang, X., Song, E., Wang, Y., Xu, T. and Li, Z. (2021). WFS1 functions in ER export of vesicular cargo proteins in pancreatic β -cells. *Nature communications* 12(1): 1–13.
- White, C. P., Hitchcock, C. L., Vigna, Y. M. and Prior, J. C. (2011). Fluid retention over the menstrual cycle: 1-year data from the prospective ovulation cohort. *Obstetrics and Gynecology International* 2011.
- Wilkinson-Berka, J. L., Suphapimol, V., Jerome, J. R., Deliyanti, D. and Allingham, M. J. (2019). Angiotensin II and aldosterone in retinal vasculopathy and inflammation. *Experimental Eye Research* 187: 107766.

- Wolfram, D. J. and Wagener, H. P. (1938). Diabetes mellitus and simple optic atrophy among siblings: report of four cases. *Mayo Clinic Proceedings* 13: 715–718.
- Wright, J. W. and Harding, J. W. (2010). The brain RAS and Alzheimer's disease. *Experimental Neurology* 223(2): 326–333.
- Wright, J. W. and Harding, J. W. (2011). Brain renin-angiotensin – A new look at an old system. *Progress in Neurobiology* 95(1): 49–67.
- Wright, J. W., Kawas, L. H. and Harding, J. W. (2013). A role for the brain RAS in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Frontiers in Endocrinology* 4: 158.
- Wright, J. W., Krebs, L. T., Stobb, J. W. and Harding, J. W. (1995). The angiotensin IV system: Functional implications. *Frontiers in Neuroendocrinology* 16(1): 23–52.
- Xia, H. and Lazartigues, E. (2008). Angiotensin-converting enzyme 2 in the brain: Properties and future directions. *Journal of Neurochemistry* 107(6): 1482–1494.
- Xue, X., Duan, R., Zhang, Q.-Q., Wang, S.-Y., Gong, P.-Y., E, Y., Zhang, Y.-D. and Jiang, T. (2021). A non-peptidic MAS1 agonist AVE0991 alleviates hippocampal synaptic degeneration in rats with chronic cerebral hypoperfusion. *Current Neurovascular Research* 18(3): 343–350.
- Yagi, S., Akaike, M., Ise, T., Ueda, Y., Iwase, T. and Sata, M. (2013). Renin–angiotensin–aldosterone system has a pivotal role in cognitive impairment. *Hypertension Research* 36(9): 753–758.
- Yamada, T., Horiuchi, M. and Dzau, V. J. (1996). Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93(1): 156–160.
- Yoshida, H., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T. and Mori, K. (1998). Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins: Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *Journal of Biological Chemistry* 273(50): 33741–33749.
- Yoshitake, T., Kiyohara, Y., Kato, ... Fujishima, M. (1995). Incidence and risk factors of vascular dementia and Alzheimer's disease in a defined elderly Japanese population: The Hisayama Study. *Neurology* 45(6): 1161–1168.

Yurimoto, S., Hatano, N., Tsuchiya, M., Kato, K., Fujimoto, T., Masaki, T., Kobayashi, R. and Tokumitsu, H. (2009). Identification and characterization of wolframin, the product of the wolfram syndrome gene (WFS1), as a novel calmodulin-binding protein. *Biochemistry* 48(18): 3946–3955.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/186> (Külastatud 14.04.2022).

LIHTLITSENTS

Mina, Silvia Kirillov,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „RA-süsteemi võtmegeenide ekspressioonide iseloomustamine Wolframi sündroomi rotimudelis“, mille juhendaja on Mario Plaas ja kaasjuhendajad Kadri Seppa ja Tambet Tõnissoo, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Silvia Kirillov

02.06.2022