

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Kattri-Liis Eskla

**Dopamiinergilise süsteemi valkude diferentsiaalne ekspressioon
Wfs1-puudulike hiirte dorsaalses striatumis**

Magistritöö

Juhendajad: Tanel Visnapuu, MA

Kersti Lilleväli, PhD

Tartu 2014

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1. Dopamiinergiline süsteem	7
1.1.1. Dopamiin	7
1.1.2. Dopamiini ja insuliini vahendatud Akt-i regulatsioon	8
1.1.3. DARPP-32 roll dopamiinergilise neurotransmissiooni regulatsioonis.....	9
1.2. Wolframi sündroom ja Wfs1 geen.....	9
1.2.1. Wolframi sündroom.....	9
1.2.2. WFS1 geen ja valk.....	10
2. EKSPERIMENTAALOSA	12
2.1. Töö eesmärgid.....	12
2.2. Materjal ja meetodika	12
2.2.1. Katseloomad	12
2.2.2. Ravimid	12
2.2.3. Käitumisaktiivsuse mõõtmine ja ajukoe prepareerimine.....	12
2.2.4. Valgu eraldamine ja <i>Western blot</i>	13
2.2.5. Statistiline analüüs.....	14
2.3. Tulemused.....	15
2.3.1. Käitumisaktiivsuse analüüs	15
2.3.2. Valgu ekspressiooni analüüs	15
2.4. Arutelu	25
KOKKUVÕTE	29
TÄNUAVALDUSED.....	30
Wfs1-deficient mice display altered expression of dopamine signaling proteins in the striatum	31

KASUTATUD KIRJANDUS	33
KASUTATUD VEEBIAADDRESSID	39

KASUTATUD LÜHENDID

-/-	Homosügootne Wfs1-puudulik hiir
+/+	Metsiktüüpi hiir
AMF	Amfetamiin
ANOVA	Dispersioonanalüüs (<i>Analysis of variance</i>)
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
DA	Dopamiin
DARPP-32	Dopamiini ja cAMP poolt reguleeritud fosfovalk (<i>Dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein</i>)
DAT	Dopamiini transporter
DIDMOAD	<i>Diabetes Insipidus, Diabetes Mellitus, Optic Atrophy, Deafness</i>
FÜS	Füsioloogiline lahus
GSK3	Glükogeeni süntaasi kinaas 3
PI3K	Fosfatidüülinositol-3-kinaas
PKA	Proteiin kinaas A
PKB/Akt	Proteiin kinaas B ehk Akt
PP1	Proteiin fosfataas 1
PP2A	Proteiin fosfataas 2A
TH	Türosiini hüdroksülaas
Wfs1	Wolframi sündroomi 1 geen või valk inimesest erineval liigil
WFS1	Wolframi sündroomi 1 geen või valk inimesel

SISSEJUHATUS

WFS1 geeni mutatsioonid põhjustavad harvaesinevat pärilikku haigust - Wolframi sündroomi (WS), mida iseloomustab suhkruhaigus, magedihaigus, optiline atroofia ja kurtus (Strom *et al*, 1998). Lisaks eelnevale põhjustavad heterosügootsed mutatsioonid WFS1 geenis mitmeid neuroloogilisi ja psühhiaatrilisi häireid, mille tekkes etendab olulist rolli dopamiin (Swift *et al*, 1998). Tartu Ülikooli füsioloogia instituudis on aastaid tagasi loodud WS-i loomudel, Wfs1-puudulikkusega hiirelin (Luuk *et al*, 2008), kelle dopamiinergilises süsteemis on leitud olulisi kõrvalekaldeid. Neil hiirtel on liikumisaktiivsust stimuleeriv amfetamiini (dopamiini kaudne agonist) toime nõrgem kui metsiktüüpi hiirtel (Luuk *et al*, 2009; Visnapuu *et al*, 2013). Me oleme leidnud, et Wfs1-puudulikel hiirtel on dopamiini tase ajukoes madalam, mis võib viidata dopamiini vähenenud vabanemisele: erinevalt metsiktüüpi hiirtest ei suurenda amfetamiini akuutne manustamine Wfs1-puudulike hiirte dopamiini tasemeid striatumis võrreldes füsioloogilist lahust saanud hiirtega. Samas on dopamiini baastasemed Wfs1-puudulikel ja metsiktüüpi hiirtel sarnased (Visnapuu *et al*, 2013). Lisaks puuduvad dorsaalses striatumis dopamiini transporteri (DAT) valgu ekspressiooni baastasemetes genotüüpide vahelised erinevused (Visnapuu *et al*, 2013). DAT vastutab ekstratsellulaarse dopamiini presünaptilise tagasihaarde eest (Giros, 1996; Torres *et al*, 2003; Gainetdinov *et al*, 2003) ning on psühhostimulantide peamine märklaud. Siinjuures on oluline, et amfetamiini toime DAT-le suurendab dopamiini vabanemist presünaptilistest närviterminalidest (Sulzer *et al*, 2005).

Lisaks dopamiinisüsteemi häiretele on Wfs1-puudulikel hiirtel hüpoinsulineemia, insuliini resistentsus ning häirunud glükoositolerantsus (Noormets *et al*, 2011; Terasmaa *et al*, 2011). Akt on teadaolevalt oluline insuliini signaalirajas ning reguleerib DAT-i ekspressiooni neuroni pinnal (Carvelli *et al*, 2002; Williams *et al*, 2007; Lute *et al*, 2008). Akt-i aktivatsioon toimub läbi kahe fosforüleerimiskoha - Thr308 ja Ser473. Akt on aktiivne, kui ta on fosforüleeritud mõlemal positsioonil (Wei *et al*, 2007). Peale selle on leitud, et D2 retseptorite aktivatsiooni tulemusena moodustub Akt/ β -arrestin2/PP2A kompleks ning defosforüleeritakse Akt Thr308 (Beaulieu *et al*, 2004; Beaulieu *et al*, 2005; Beaulieu *et al*, 2007). Lisaks Akt-le on teine dopamiinergilises neurotransmissioonis oluline signaali ülekandja DARPP-32. See on klassikaline valk, mida uuritakse amfetamiini toimes ja seostub, erinevalt D2/Akt rajast pigem D1/cAMP/PKA rajaga (Nishi *et al*, 2000; Svenningsson *et al*, 2003; Beaulieu *et al*, 2005). Dopamiini toime D1 retseptoritele aktiveerib PKA, mis fosforüleerib DARPP-32 Thr34 (Hemmings *et al*, 1984).

Selleks, et paremini mõista Wfs1 valgu puudumise mõju dopamiinergilisele süsteemile oli töö esimene eesmärk välja selgitada, kas Wfs1-puudulikel hiirtel esineb dopamiini vabanemise ja sünteesiga seotud valkude ekspressioonis erinevusi võrreldes metsiktüüpi hiirtega, mistõttu mõõdeti DAT ja TH valgu ekspressiooni. Teiseks sooviti näha, kas Wfs1-puudulikel hiirtel on olulisi muutusi D1 ja D2 retseptoritest allavoolu jäävate valkude, täpsemalt fosfo-DARPP-32 (Thr34) ja fosfo-Akt (Thr308 ja Ser473), ekspressioonis. Katsetes manustati homosügootsetele Wfs1-puudulikele hiirtele ja nende metsiktüüpi pesakonnakaaslastele akuutselt amfetamiini (5 mg/kg) või füsioloogilist lahust. Peale liikumisaktiivuse mõõtmist eraldati kolmes erinevas ajapunktis (20 min, 45 min ja 120 min) dorsaalne striatum. Valguekspressioonid mõõdeti (*Western blot* meetodiga) just selles aju regioonis, kuna dorsaalne striatum on liigutuste vahendamises oluline piirkond (Yin *et al*, 2005) ning seal ekspresseeruvad tugevalt kõik käesolevas töös vaadeldavad valgud (Anden *et al*, 1964; Ciliax *et al*, 1995; Svenningsson *et al*, 2003; Beaulieu *et al*, 2004). Katsed viidi läbi Tartu Ülikooli bio- ja siirdemeditsiini instituudis.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Dopamiinergiline süsteem

1.1.1. Dopamiin

Käesolevas töös oluline Wfs1 valk (volframiin) võib mõjutada dopamiinergilise süsteemi talitlust (Luuk *et al*, 2009, Matto *et al*, 2011, Visnapuu *et al*, 2013). Dopamiinergiline närviülekanne vahendab mitmeid füsioloogilisi protsesse (Missale *et al*, 1998; Carlsson, 2001; Iversen ja Iversen, 2007). Imetaja ajus on tuvastatud neli peamist dopamiinergilist juhteteed. Antud töö raames on oluline nigrostriataalne juhteteed, kuna volframiin ning töös uuritavad valgud - türosiini hüdroksülaas (TH), dopamiini transporter (DAT), proteiin kinaas B ehk Akt (PKB/Akt) ning dopamiini ja cAMP poolt reguleeritud fosfovalk (DARPP-32) - ekspresseeruvad suurel määral just dorsaalses striatumis (*caudate putamen*) (Anden *et al*, 1964; Ciliax *et al*, 1995; Svenningsson *et al*, 2003; Beaulieu *et al*, 2004), kuhu saavad dopamiinergilised projektsioonid ventraalsest keskajust (*substantia nigra*) (Fallon ja Moore, 1978). Ühtlasi on dorsaalne striatum liigutuste kontrollis oluline aju regioon (Yin *et al*, 2005). Dopamiinisüsteemi düsregulatsioon selles piirkonnas on seotud mitmete psühhiaatriliste ja neuroloogiliste häiretega (Creese *et al*, 1976; Missale *et al*, 1998; Jakel ja Maragos, 2000; Carlsson *et al*, 2001; Swanson *et al*, 2007; Iversen ja Iversen, 2007).

Dopamiini (DA) süntees toimub neuroni kehas ja selle kiirust piirav ensüüm on TH (Nagatsu *et al*, 1964). DA-d säilitatakse sekretoorsetes vesiikulites ning vabastatakse vastusena aktsioonipotentsiaalile sünapssisse, misjärel toimub seostumine postsünaptilistel neuronitel paiknevatele retseptoritele (Beaulieu, 2012). Nende retseptorite funktsioon on seotud cAMP ja proteiin kinaas A (PKA) regulatsiooniga G-valk vahendatud signalisatsiooni kaudu (Missale *et al*, 1998), mille tööd moduleerib oluline signaali ülekandja DARPP-32 (vt peatükk 1.1.3.). Üha suurem andmete hulk näitab, et DA retseptorite signalisatsioon võib olla seotud ka cAMP-st sõltumatute signalisatsiooni mehhanismidega Akt/ β -arrestin2/PP2A (PP2A – proteiin fosfataas 2A) kompleksi vahendusel (Beaulieu *et al*, 2004; Beaulieu *et al*, 2005) (vt peatükk 1.1.2.).

Rakuvälise DA taset reguleerib presünaptiline plasmamembraani valk DAT (Giros, 1996; Gainetdinov *et al*, 2003). Lisaks sellele, et DAT kontrollib ajus DA homöostaasi on ta ka psühhostimulantide peamine märklaud (Sulzer *et al*, 2005). Psühhostimulandid (nt amfetamiin) avaldavad oma mõju suurendades ekstratsellulaarse DA kontsentratsiooni aju limbilistes regioonides, sealhulgas ka striatumis (Koob ja Bloom, 1988; Wise, 1996). Amfetamiin siseneb dopamiinergilistesse neuronitesse DAT-i kaudu (Sulzer *et al*, 2005),

asendab DA-d sekretoorsetes vesiikulites ning paigutab DA ümber neuroni tsütoplasmasse (Sulzer ja Rayport, 1990; Floor *et al*, 1995; Floor ja Meng, 1996). DA suurenenud tsütoplasmaatiline kontsentratsioon ja amfetamiini otsene toime DAT-le panevad transporteri teistpidi tööle, mille tulemusena vabastatakse rohkem DA-d ekstratsellulaarsesse ruumi (Sulzer *et al*, 2005). Mitmed amfetamiini poolt esile kutsutud käitumuslikud efektid on seotud selle ravimi võimega suurendada DA vabanemist presünaptilistest närviterminalidest ja inhibeerida DA tagasihaaret sünapst (Seiden *et al*, 1993; Kantor *et al*, 1999).

1.1.2. Dopamiini ja insuliini vahendatud Akt-i regulatsioon

D2 retseptorite aktivatsiooni tulemusena moodustub Akt/ β -arrestin2/PP2A kompleks, kus β -arrestin2 on Akt-i deaktivatsioonis oluline tugivalk ning PP2A defosforüleerib Akt Thr308 (Beaulieu *et al*, 2004; Beaulieu *et al*, 2005; Beaulieu *et al*, 2007). Akt on aktiivne, kui ta on fosforüleeritud Thr308 ja Ser473 positsioonil (Wei *et al*, 2007), kuid D2 retseptorite stimulatsiooni tulemusena defosforüleeritakse vaid Thr308 (Beaulieu *et al*, 2004; Beaulieu *et al*, 2005). Amfetamiini akuutne manustamine inhibeerib metsiktüüpi hiirtel Akt-i fosforülatsiooni ajast sõltuvalt (Beaulieu *et al*, 2004). Akt-i deaktivatsiooni tulemusena aktiveeritakse glükogeeni süntaasi kinaas 3 (GSK3) (Beaulieu *et al*, 2004). See valk vahendab transkriptsioonifaktor CREB-i (*cAMP response element-binding protein*) aktivatsiooni (Grimes *et al*, 2001), mis reguleerib DA poolt vahendatud käitumise avaldumist.

Dopamiinisüsteemi mõjutavad ka mitmed hormonaalsed faktorid. Siinkohal on oluline, et insuliini signaalirada reguleerib DA neurotransmissiooni. Lisaks põhjalikult kirjeldatud süsteemsetele mõjudele (vere glükoosisisalduse regulatsioon) on insuliinil roll ka ajus. Insuliin on võimeline läbima vere-aju barjääri ja seostuma insuliini retseptoritega (Banks ja Kastin, 1998). Need retseptorid on tihedalt koondunud aju piirkondadesse, kus on palju DA neuronite kehasid, DA retseptoreid ja DAT-i (Ciliax *et al*, 1995; Schulingkamp *et al*, 2000; Figlewicz *et al*, 2003). Teadaolevalt kontrollib vere insuliin DAT-i aktiivsust ajus. Insuliini madalam tase inhibeerib PI3K/Akt-i (PI3K - fosfatidüülinositol-3-kinaas) signaali, mille tulemusena väheneb DAT-i ekspressioon neuroni pinnal (Carvelli *et al*, 2002; Williams *et al*, 2007; Lute *et al*, 2008). DAT-i madalam tase omakorda vähendab psühhostimulantidest tingitud ülemäärast liikumisaktiivsust (Gainetdinov *et al*, 1999; Zhuang *et al*, 2001) ning DA vabanemist (Carvelli *et al*, 2002; Williams *et al*, 2007; Lute *et al*, 2008).

Wfs1 geeni inaktivatsioon võib häirida insuliini rajas oluliste valkude tööd. Käesolevas töös uuriti D2 retseptoritest signaalirajas allavoolu jäävat Akt-i. Amfetamiini võimetus suurendada homosügootsete Wfs1-puudulike hiirte (edaspidi Wfs1-puudulik hiir) liikumisaktiivsust

(Luuk *et al*, 2009; Visnapuu *et al*, 2013) võib tuleneda insuliinisüsteemi häiritusest (Noormets *et al*, 2011; Terasmaa *et al*, 2011).

1.1.3. DARPP-32 roll dopamiinergilise neurotransmissiooni regulatsioonis

Enamasti seostatakse DA retseptorite funktsiooni D1/cAMP/PKA signaaliraja regulatsiooniga, milles on oluline roll DARPP-32-l. See bifunktsionaalne signaalimolekul on tüüpiline valk, mida uuritakse amfetamiini toimes (Nishi *et al*, 2000; Svenningsson *et al*, 2003; Beaulieu *et al*, 2005). DARPP-32 kontrollib seriin/treoniin fosfataasi ja seriin/treoniin kinaasi aktiivsust: sõltuvalt fosforülatsiooni seisundist inhibeerib DARPP-32 kas proteiin fosfataas 1 (PP1) või PKA-d. D1 retseptorite aktivatsiooni tulemusena aktiveeritakse PKA, mis fosforüleerib DARPP-32 Thr34 (Hemmings *et al*, 1984). See muudab DARPP-32 PP1 inhibiitoriks (Hemmings *et al*, 1984), mille tagajärjel võimendub dopamiinergiline signaal. Seevastu D2 retseptorite aktivatsioon viib DARPP-32 Thr75 fosforülatsioonini (Nishi *et al*, 2000), mis konverteerib DARPP-32 PKA inhibiitoriks (Bibb *et al*, 1999). Selle tulemusena aktiveeritakse PP1 ning väheneb dopamiinergiline signaal. *In vivo* põhjustab DARPP-32 Thr75 fosforülatsiooni vähenemine DA poolt vahendatud biokeemiliste ja füsioloogiliste vastuste suurenemise (Bibb *et al*, 1999). Amfetamiini akuutne manustamine suurendab DARPP-32 Thr34 fosforülatsiooni ning vähendab Thr75 fosforülatsiooni striatumis (Svenningsson *et al*, 2003). DARPP-32-puudulikel hiirtel on amfetamiinist tingitud käitumuslikud efektid vähenenud (Svenningsson *et al*, 2003).

1.2. Wolframi sündroom ja Wfs1 geen

1.2.1 Wolframi sündroom

Mutatsioonid WFS1 geeni kodeerivas alas põhjustavad selle geeni mutatsiooni homosügootsetel ja heterosügootsetel kandjatel harva esinevat autosomaalset retsessiivset haigust Wolframi sündroomi (WS), mida tuntakse ka nime all DIDMOAD (*Diabetes Insipidus, Diabetes Mellitus, Optic Atrophy, Defness*) (Wolfram ja Wagener, 1938; Inoue *et al*, 1998; Strom *et al*, 1998). WS-i diagnoos põhineb lapseas algaval suhkruhaigedil ja progressiivsel nägemisnärvide atroofial. Lisaks nendele sümptomitele esinevad veel sensoneuraalne kurtus, magediabeet, ataksia, kusetrakti ebanormaalsused (atroofia), psühhiaatrilised häired ja paljud muud sümptomid (Swift *et al*, 1990; Barrett *et al*, 1995). Patsientide keskmine eluiga on 30 aastat ning peamine surmapõhjus on hingamispuudulikkus koos ajutüve atroofiaga (Barrett *et al*, 1995; Kinsley *et al*, 1995). WS-i esinemissagedus Inglismaal on hinnanguliselt 1:770 000 inimese kohta (Barrett *et al*, 1995).

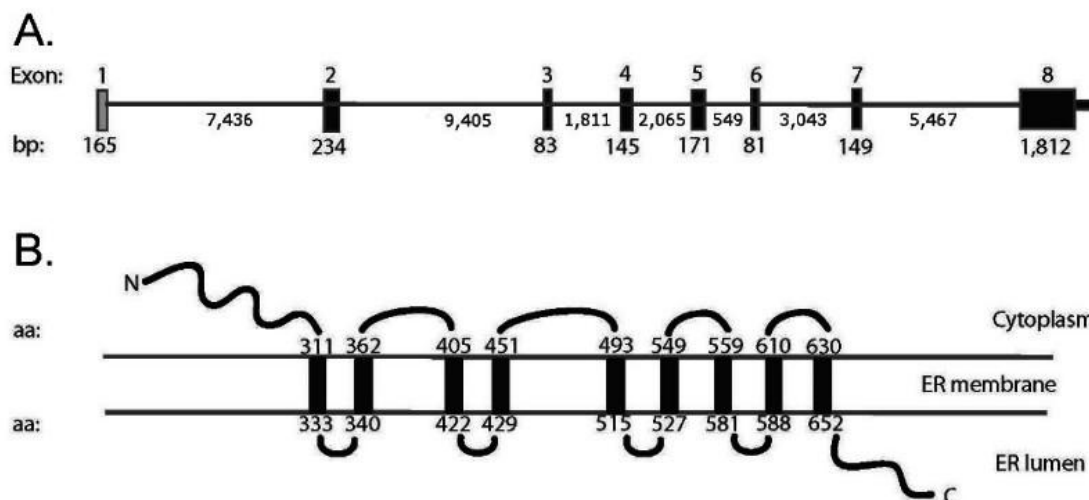
Mutatsioonid WFS1 geenis põhjustavad homosügootidel ja heterosügootsetel kandjatel mitmeid psühhiaatrilisi häireid (Swift *et al*, 1990; Swift *et al*, 1998), milles DA-1 on oluline roll. Luuk jt (2008) on näidanud, et Wfs1 valk on ekspresseerunud *nucleus accumbens*'is ja kaudaalses dorsaalses striatumis, kuhu jõuavad dopamiinergilised projektsioonid keskajust. Samuti oli näha, et *nucleus accumbens*'ist saabusid Wfs1-ergilised projektsioonid keskajusse (peamiselt *substantia nigra pars reticulata* ja ventraalse tegmentaalse ala piirkonda). Wfs1 tugevat ekspressiooni on leitud ärevus- ja meeleoluhäiretega seotud struktuurides: mandelkeha, dorsaalne ja ventraalne striatum, prefrontaalkoor ja hipokampuse CA1 piirkond (Takeda *et al*, 2001; Luuk *et al*, 2008). Siinjuures on oluline, et Wfs1-puudulike hiirte dopamiinergilises süsteemis on leitud olulisi kõrvalekaldeid (Luuk *et al*, 2009; Visnapuu *et al*, 2013). Vaatamata WS-i väikesele esinemissagedusele on WFS1 mutatsioonid olulised ka üldpopulatsioonis, kuna WFS1 mutatsioonide heterosügootsetel kandjatel (1% populatsioonist) on suurem risk sattuda psühhiaatriliste häirete tõttu haiglasse (Swift *et al*, 1991). Lisaks psühhiaatrilistele sümptomitele põhjustavad mutatsioonid WFS1 geenis pankrease β -rakkude enneaegset surma, mis omakorda viib juveniilse insuliinist sõltuva suhkruhaiguse välja kujunemiseni (Karasik *et al*, 1989). Wfs1-puudulike hiirte fenotüpeerimisel on leitud, et neil hiirtel on hüpoinsulineemia, insuliini resistentsus ning häirunud glükoositaluvus võrreldes nende metsiktüüpi pesakonnakaaslastega (Noormets *et al*, 2011; Terasmaa *et al*, 2011).

Farmakoloogilised käitumiskatsed amfetamiiniga näitavad, et Wfs1-puudulikel hiirtel esineb käitumuslikult pidurdatud fenotüüp, mis peegeldab häirunud dopamiinergilist süsteemi (Luuk *et al*, 2009; Visnapuu *et al*, 2013). Vastupidiselt metsiktüüpi hiirtele ei muutnud amfetamiini akuutne manustamine Wfs1-puudulike hiirte DA taset dorsaalses striatumis võrreldes füsioloogilist lahust saanud grupiga. Need tulemused näitavad, et Wfs1-puudulikel hiirtel võib DA vabanemine või tase ajukoes olla madalam (Visnapuu *et al*, 2013). Ka amfetamiini korduv manustamine ei aktiveerinud Wfs1-puudulike hiirte liikumisaktiivsust (Visnapuu *et al*, 2013). Peale selle puudusid genotüüpide vahelised erinevused DAT valgu ekspressiooni baastasemetes (Visnapuu *et al*, 2013). Selleks, et välja selgitada, kas vabanemise ja sünteesiga seotud mehhanismides esineb diferentsiaalset ekspressiooni peale amfetamiini akuutset manustamist, mõõdeti käesolevas töös TH ja DAT valgu ekspressiooni.

1.2.2. WFS1 geen ja valk

WFS1 geen asub 4. kromosoomi p16.1 piirkonnas (Polymeropoulos *et al*, 1994). Geen koosneb kaheksast eksonist: eksonid 2-7 ning suurem osa 8. eksonist on kodeerivad (Strom *et*

al, 1998) (Joonis 1A). WFS1 geeni (kogupikkus 33,4 kb) pealt transkribeeritakse 3,6 kb pikkune mRNA, mis kodeerib 890 aminohappe pikkust WFS1 valku molekulmassiga 100 kDa (Inoue *et al*, 1998; Strom *et al*, 1998). WFS1 valgul on 9 transmembraanset domeeni. Valgu N-terminaalne ots paikneb tsütoplasmas ning C-terminaalne ots endoplasmaatilise retiikulumi luumenis (Hofmann *et al*, 2003) (Joonis 1B).



Joonis 1. (A) Skemaatiline ülevaade WFS1 geenist, (B) WFS1 valgu oletatav struktuur. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK4144/>)

Enamik WFS1 geeni mutatsioonidest asub 8. eksonis, mis kodeerib valgu transmembraanseid osi ja C-terminaalset domeeni (Inoue *et al*, 1998; Strom *et al*, 1998). Biokeemilised uuringud näitavad, et WFS1 valk on membraaniläbiv glükoproteiin, mis lokaliseerub peamiselt endoplasmaatilises retiikulumis (Takeda *et al*, 2001). WFS1 valgu oletatav funktsioon on valkude posttranslatsiooniline modifitseerimine ja pakkimine ning Ca^{2+} homöostaasi regulatsioon (Hofmann *et al*, 2003). WFS1 valgu ekspressiooni tase on kõrge ajus, pankreases, südames ja lihastes. Maksas, neerudes ning põrnas on WFS1 valgu ekspressiooni tase madalam (Hofmann *et al*, 2003).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Töö eesmärk oli välja selgitada, kas Wfs1-puudulikel hiirtel on võrreldes metsiktüüpi hiirtega erinevusi:

1. DA vabanemise ja sünteesiga seotud valkude (DAT ja TH) tasemetes,
2. DA retseptoritest allavoolu jäävate valkude, fosfo-Akt-i (Thr308 ja Ser473) ja fosfo-DARPP-32 (Thr34) tasemetes peale amfetamiini või füsioloogilise lahuse akuutset manustamist.

2.2. Materjal ja meetodika

2.2.1. Katseloomad

Katseid tehti 2.5 kuu vanuste isaste homosügootsete Wfs1-puudulike hiirte (edaspidi ka Wfs1-puudulik hiir) ja nende metsiktüüpi pesakonnakaaslastega (katses kasutatud loomade arv oli 85). Hiired olid 129S6/SvEvTac ja C57BL/6J segatüüpi geneetilise taustaga F2 hübriidid. Katseloomi hoiti puurides kaheksa kaupa, 12h/12h valge/pime tsükkel (valge tsükkel algas kell 7.00). Metsiktüüpi hiiri kasutati alati paralleelselt homosügootsete Wfs1-puudulike hiirtega. Loomad valiti gruppidesse juhuslikult. Katseloomadel oli vaba ligipääs veele ja toidule, väljaarvatud katsete ajal.

Luba saadi Eesti loomkatseprojekti loakomisjonilt (nr 13, välja antud 16.09.2009).

2.2.2. Ravimid

Katseloomadele manustati kas füsioloogilist lahust (0.9% NaCl, B. Braun Melsungen AG, Saksamaa) või amfetamiini (5 mg/kg, amfetamiin hemisulfaat, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) intraperitoneaalselt 100 µl/10g. Amfetamiin lahustati füsioloogilises lahuses.

2.2.3. Käitumisaktiivsuse mõõtmine ja ajukoe prepareerimine

Enne liikumisaktiivsuse mõõtmist teostati katseloomadele habituatsioon (1h), et vähendada närilistele omast uudistamiskäitumist ja näha selgemat ravimiefekti. Pärast harjutamist testiti loomi samades mootorikapuurides amfetamiini või füsioloogilise lahusega. Mõõtmised teostati pleksiklaasist mootorikapuurides, mis olid kohandatud käitumisaktiivsuse mõõtmiseks: eemaldati söömis- ja joomisanumad ning varjualused (PhenoTyper puuri mõõtmised 30 x 30 x 36 cm ja juhitud EthoVision XT tarkvaraga; Noldus Information Technology, Holland). Katsete ajal oli valguse intensiivsus umbes 400 luksit. Loomkatsed teostati kella 11.00-15.00 vahel. Läbitud vahemaa registreeriti 20 min, 45 min ja 120 min

jooksul. 20 min ajapunkt valiti, kuna amfetamiini toime indutseerib cAMP-st sõltuva DARPP-32 fosforülatsiooni umbes 20 min peale ravimi manustamist (Lindskog, 2001). 45 min ajapunkti on eelnevalt kasutatud amfetamiini toime uurimiseks (Visnapuu *et al*, 2013). 120 min ajapunkt valiti, kuna varasemad katsed on näidanud, et seal põhjustab amfetamiin (5 mg/kg) suurima liikumisaktiivsuse erinevuse homosügootsete Wfs1-puudulike ja metsiktüüpi loomade vahel. Kohe peale lokomotoorika mõõtmist teostati dekapitatsioon ja eraldati ajud. Paxinos ja Franklin atlase (2012) järgi dissekteeriti dorsaalne striatum. Loomkatsed viis läbi Tanel Visnapuu.

2.2.4. Valgu eraldamine ja Western blot

Pilootkatsed näitasid, et DAT valgu ekspressioon metsiktüüpi hiirtel on kõrgem dorsaalses striatumis võrreldes ventraalse striatumi ja ventraalse keskajuga (avaldamata andmed). Sarnaselt DAT-le oli TH valgu ekspressioon dorsaalses striatumis kõrgem kui keskajus (avaldamata andmed). Seega mõõdeti uuritavate valkude ekspressioonid dorsaalses striatumis. DARPP-32 valgu ekspressiooni uuriti ainult 20 min ja 45 min ajapunktides, kuna DARPP-32 fosforüleerumine saavutab maksimumi 20 min ajapunktis (Lindskog, 2001).

Peale käitumiskatseid hiired hukati ning ajud eraldati 90 sekundi jooksul peale dekapiteerimist, et säilitada valgu fosforülatsioon. Dissekteeritud ajuosaga *ependorf*²i tuubid pandi koheselt vedellämmastikku ning säilitati kuni valgu eraldamiseni -80°C juures. Valgu eraldamiseks kasutati PARIS Kit'i (Life Technologies) koos proteaasi ja fosfataasi inhibiitoritega (Thermo Scientific) vastavalt tootja poolt välja töötatud protokollile. Koed sonikeeriti ning tsentrifuugiti 10 min 12,000g 4°C juures. Valgu kontsentratsioonid mõõdeti BCA meetodiga (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific) ning supernatant säilitati -80°C juures. Elektroforeesis ja valgu ülekandes oluliste reagentide ning seadmete kasutamisel lähtuti tootja juhendist, mis oli kooskõlas NuPAGE süsteemiga (Life Technologies).

Western blot'i analüüsis blokeeriti membraane üks tund 3% BSA/PBS-s. Pärast seda inkubeeriti membraane 3% BSA/PBS-0,1% Tween-20-s primaarsete antikehadega (Tabel 1) üleöö 4°C juures. Järgmisel päeval pesti membraane 6 korda Milli-Q veega ning inkubeeriti PBS-0,1% Tween-20-s vastava sekundaarse antikehaga (Tabel 2) üks tund toatemperatuuril. Sellele järgnes uuesti membraani pesu 6 korda Milli-Q veega ning 20 min pesuetapp PBS-0,1% Tween-20-ga. Antikehasid detekteeriti LI-COR Odyssey CLx system'iga (LI-COR Biotechnologies). Pildid muudeti must-valgeks ja kvantifitseeriti Image Studio Lite v 3.1.4 (LI-COR Biotechnologies).

Tabel 1. *Western blot*'is kasutatud primaarsed antikehad

Valk	Liigid	Firma	Cat #	Lahjendus
Dat	Rott	Santa Cruz Biotechnologies	sc-32258	1:1000
TH	Lammas	Novus Biologicals	NB300-110	1:3000
Pan-Akt	Küülik	Cell Signaling	4691L	1:1000
Fosfo-Akt Thr308	Küülik	Cell Signaling	2965L (C31E5E)	1:1000
Fosfo-Akt Thr308	Küülik	Millipore	05-802R	1:1000
Fosfo-Akt Ser473	Küülik	Cell Signaling	9271S	1:1000
Pan-DARPP-32	Küülik	PhosphoSolutions	374-DARPP	1:1000
Fosfo-DARPP-32 Thr34	Küülik	PhosphoSolutions	p1025-34	1:1000
β -aktiin	Küülik	Cell Signaling	4970	1:10 000

*Pan – koguvalk

Tabel 2. *Western blot*'is kasutatud sekundaarsed antikehad

Antikeha liik	Antigeeni liigid	Firma	Lahjendus	Konjugaat	Cat #
Eesel	Lammas	Jackson ImmunoResearch	1:40 000	Alexa-680	713-625-147
Eesel	Küülik	Jackson ImmunoResearch	1:40 000	Alexa-790	711-655-152
Eesel	Rott	Jackson ImmunoResearch	1:40 000	Alexa-680	712-625-150

2.2.5. Statistiline analüüs

Andmete analüüsis kasutati Statistica (StatSoft, Inc., USA) 8.0 versiooni. Joonistel on toodud keskmine ja keskväärtuse standardviga. Käitumisaktiivsus analüüsiti kahefaktorilise (genotüüp x ravim) ANOVA-ga (dispersioonanalüüs).

DAT-i ja TH suhteline valgu ekspressioon (edaspidi nimetatud ka valgu ekspressioon) normaliseeriti β -aktiini suhtes. Fosfovalkude suhtelised ekspressioonitasemed normaliseeriti pan-vormile. Pärast kalkulatsioone määrati metsiktüüpi hiirtele ja füsioloogilise ravimi rühmadele väärtus 100% (kontroll). Valguekspressioon analüüsiti ühefaktorilise ANOVA-ga.

Kui ANOVA oli statistiliselt oluline, rakendati Tukey's (HSD) *post hoc* testi, et kontrollida millised grupid ja mis suunas omavahel erinevad.

2.3. Tulemused

2.3.1. Käitumisaktiivsuse analüüs

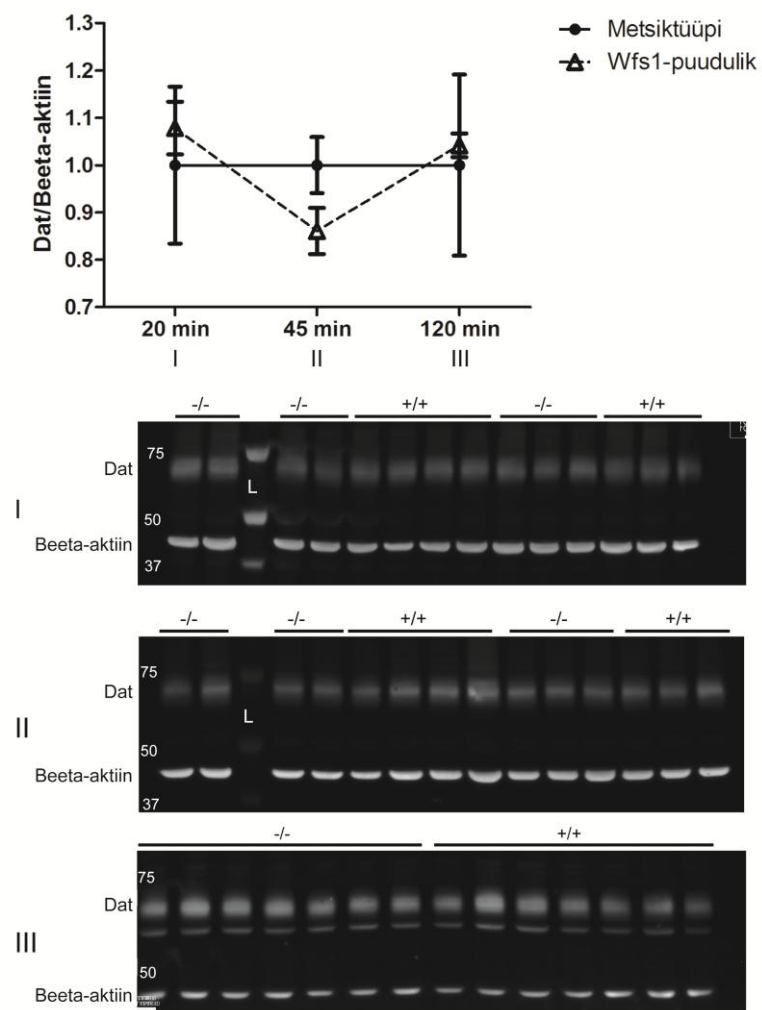
20 min ajapunktis puudus genotüüpide vaheline erinevus (Tukey *post hoc* test: $p=0.33$) läbitud kogudistantsis (cm) füsioloogilise lahuse gruppides, kuigi läbitud distants oli Wfs1-puudulikel hiirtel mõnevõrra madalam. Sarnaselt füsioloogilisele lahusele, 20 min ajapunktis ei olnud statistiliselt olulist erinevust läbitud distantsis metsiktüüpi ja Wfs1-puudulike hiirte amfetamiini rühmade vahel (Tukey *post hoc* test: $p=0.07$); seegipoolest, läbitud kogudistants oli Wfs1-puudulikel tunduvalt väiksem. 20 min (läbitud distants) genotüüp x ravim efekt: $F(1,24)=0.5$, $p=0.49$.

45 ja 120 min peale füsioloogilise lahuse manustamist oli vastavates ajagruppides Wfs1-puudulikel ja metsiktüüpi hiirtel peaaegu võrdne läbitud distants (mõlemas ajapunktis Tukey *post hoc* test: $p=0.99$), st nende rühmade lokomotoorne aktiivsus ei erinenud statistiliselt. Erinevalt füsioloogilisest lahusest, 45 ja 120 min peale amfetamiini süsti oli Wfs1-puudulike hiirte käitumuslik aktiivsus kogudistantsilt oluliselt madalam kui amfetamiini saanud metsiktüüpi hiirte rühmadel sama näitaja vastavas ajapunktis (mõlemas ajapunktis Tukey *post hoc* test: $p<0.05$). 45 min (läbitud distants) genotüüp x ravim efekt: $F(1,26)=4.57$, $p<0.05$; 120 min (läbitud distants) genotüüp x ravim efekt: $F(1,25)=5.37$, $p<0.05$).

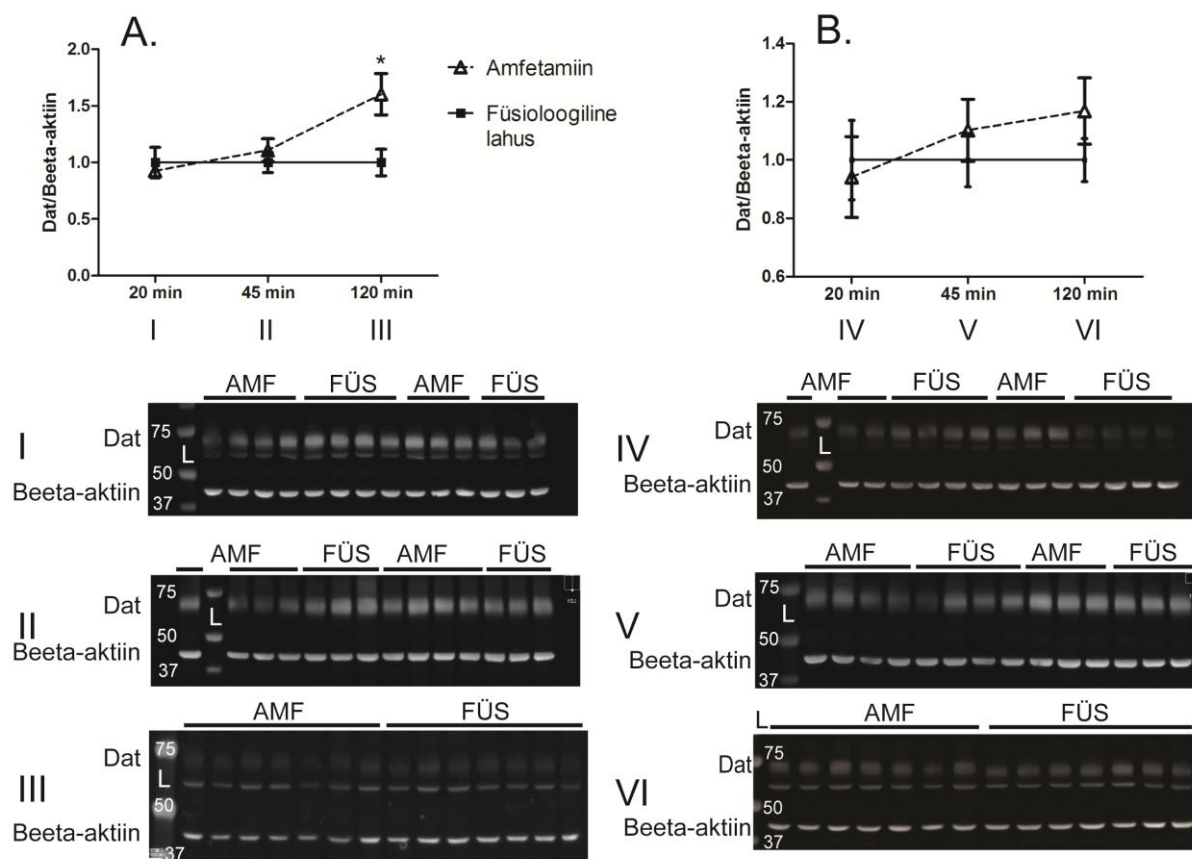
2.3.2. Valgu ekspressiooni analüüs

2.3.2.1. *DAT valgu ekspressioon striatumis peale amfetamiini või füsioloogilise lahuse akuutset manustamist*

DAT valgu ekspressiooni baastasemetes puudusid genotüüpide vahelised erinevused: 20 min, 45 min ja 120 min peale füsioloogilise lahuse manustamist oli metsiktüüpi ja Wfs1-puudulikel hiirtel sarnane DAT valgu ekspressioon (Joonis 2). 20 min ja 45 min peale amfetamiini manustamist ei tõusnud metsiktüüpi ja Wfs1-puudulike hiirte DAT valgu ekspressioon võrreldes vastavate kontrollrühmadega (Joonis 3). 120 min peale amfetamiini manustamist oli metsiktüüpi hiirte DAT valgu ekspressioon statistiliselt oluliselt kõrgem vastava füsioloogilise lahuse grupist $F(1,12)=7.67$, $p<0.05$ (Joonis 3A). Wfs1-puudulikel hiirtel seevastu ei suurendanud amfetamiin DAT valgu ekspressiooni 120 min peale ravimi manustamist $F(1,12)=1.54$, $p=0.23$ (Joonis 3B).



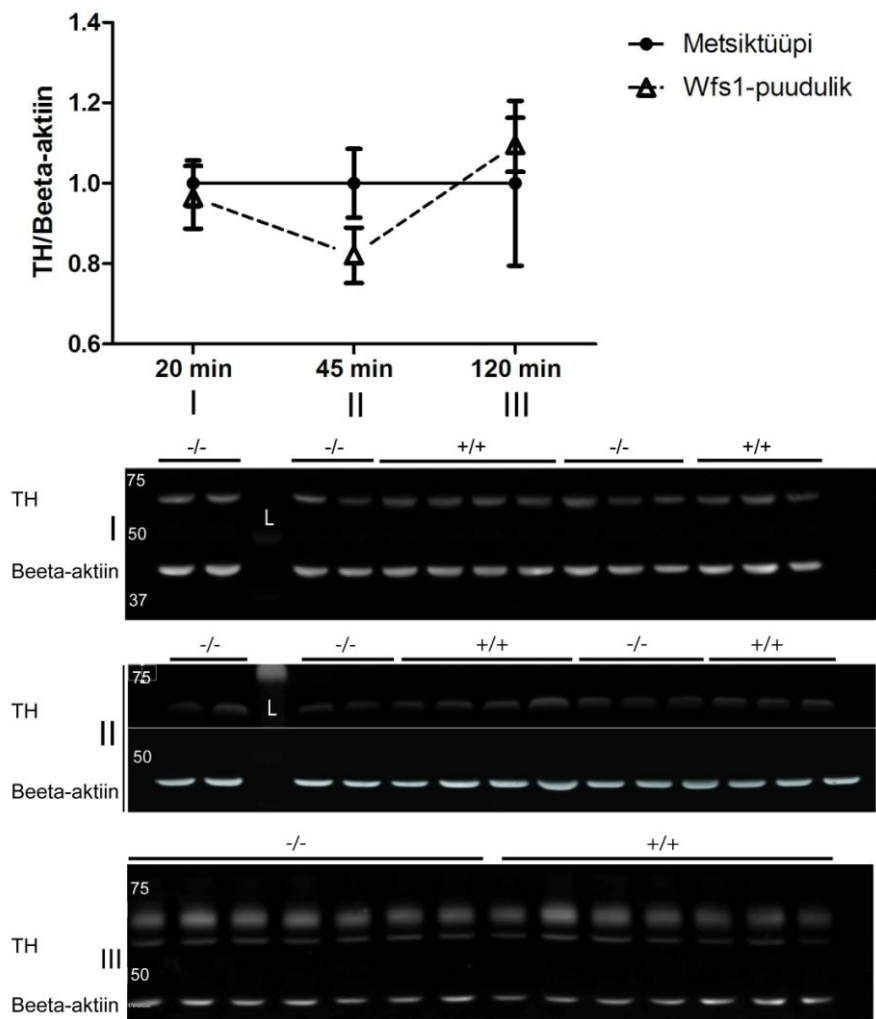
Joonis 2. Suhteline DAT valguekspressioon metsiktüüpi ja Wfs1-puudlike hiirte dorsaalses striaatumis kolmes erinevas ajapunktis peale füsioloogilise lahuse manustamist. Joonisel on toodud suhtelise DAT valgu taseme kvantitatiivsed tulemused ja vastavad *immunoblot*'id (I-III). Igas grupis oli 6-7 looma. -/- - Wfs1-puudulik, +/+ - metsiktüüpi, L - ladder.



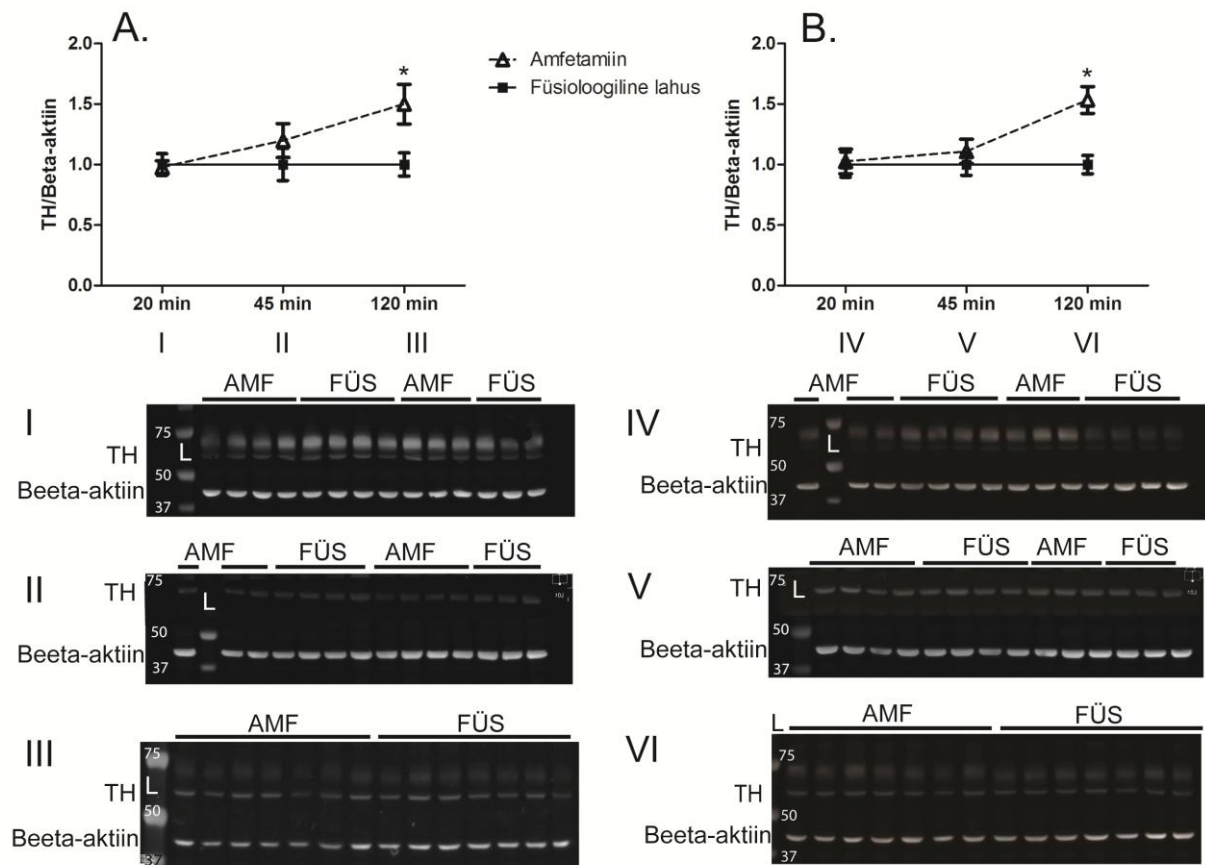
Joonis 3. Suhteline DAT valguekspressioon metsiktüüpi (A) ja Wfs1-puudlike hiirte (B) dorsaalses striatumis kolmes erinevas ajapunktis peale amfetamiini (5 mg/kg) või füsioloogilise lahuse manustamist. Joonisel on toodud suhtelise DAT valgu taseme kvantitatiivsed tulemused ja vastavad immunoblot'id (I-VI). * - $p < 0.05$ võrreldes kontrollgrupi metsiktüüpi hiirtega 120 min ajapunktis (Tukey HSD). Igas grupis oli 6-7 looma. AMF - amfetamiin, FÜS - füsioloogiline lahus, L - ladder.

2.3.2.2. TH valgu ekspressioon striatumis peale amfetamiini või füsioloogilise lahuse akuutset manustamist

Vaadeldud kolmes ajapunktis puudusid TH valgu ekspressiooni baastasemetes genotüüpide vahelised erinevused (Joonis 4). Metsiktüüpi ja Wfs1-puudulikel hiirtel puudusid TH valgu ekspressioonis 20 min ja 45 min peale amfetamiini manustamist erinevused vastavate genotüüpide kontrollgruppidest (Joonis 5). 120 min peale amfetamiini manustamist oli TH valgu ekspressioon oluliselt tõusnud nii metsiktüüpi $F(1,12)=6.93$, $p < 0.05$ (Joonis 5A) kui Wfs1-puudulikel hiirtel $F(1,12)=15.93$, $p < 0.01$ (Joonis 5B) võrreldes vastavate genotüüpide kontrollrühmadega.



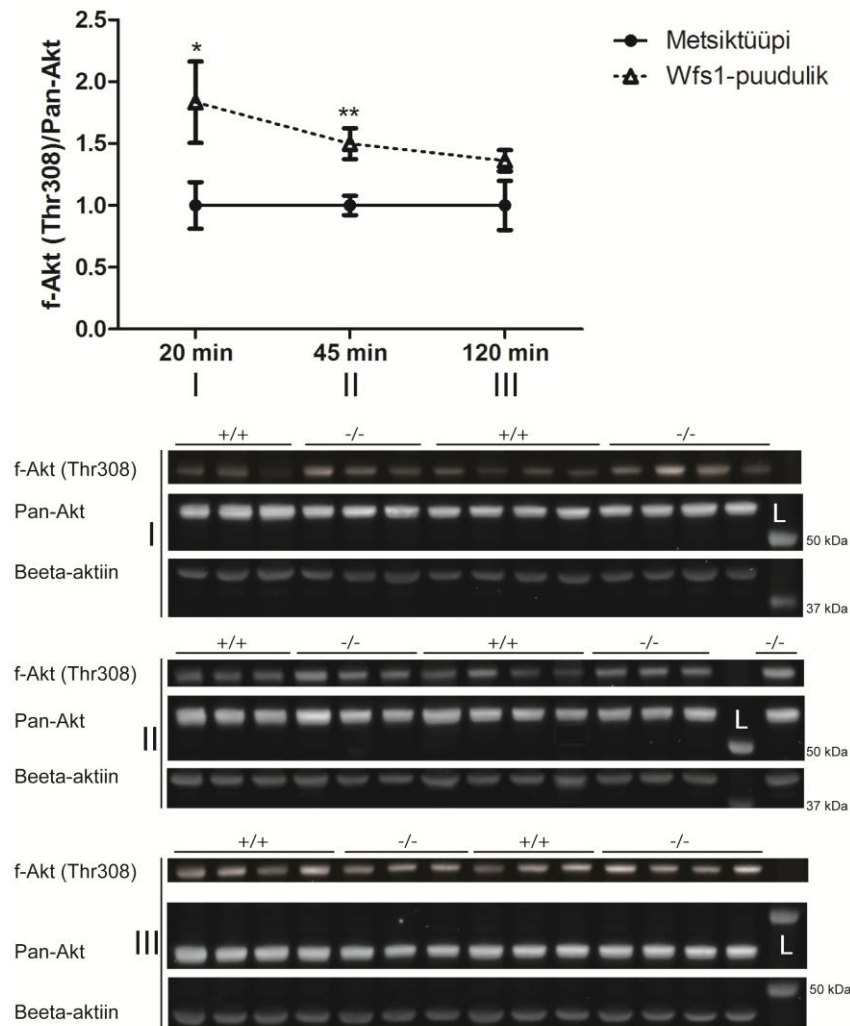
Joonis 4. Suhteline TH valguekspressioon metsiktüüpi ja Wfs1-puudlike hiirte dorsaalses striatumis kolmes erinevas ajapunktis peale füsioloogilise lahuse manustamist. Joonisel on toodud suhtelise TH valgu taseme kvantitatiivsed tulemused ja vastavad *immunoblot*'id (I-III). Igas grupis oli 6-7 looma. -/- - Wfs1-puudulik, +/+ - metsiktüüpi, L - ladder.



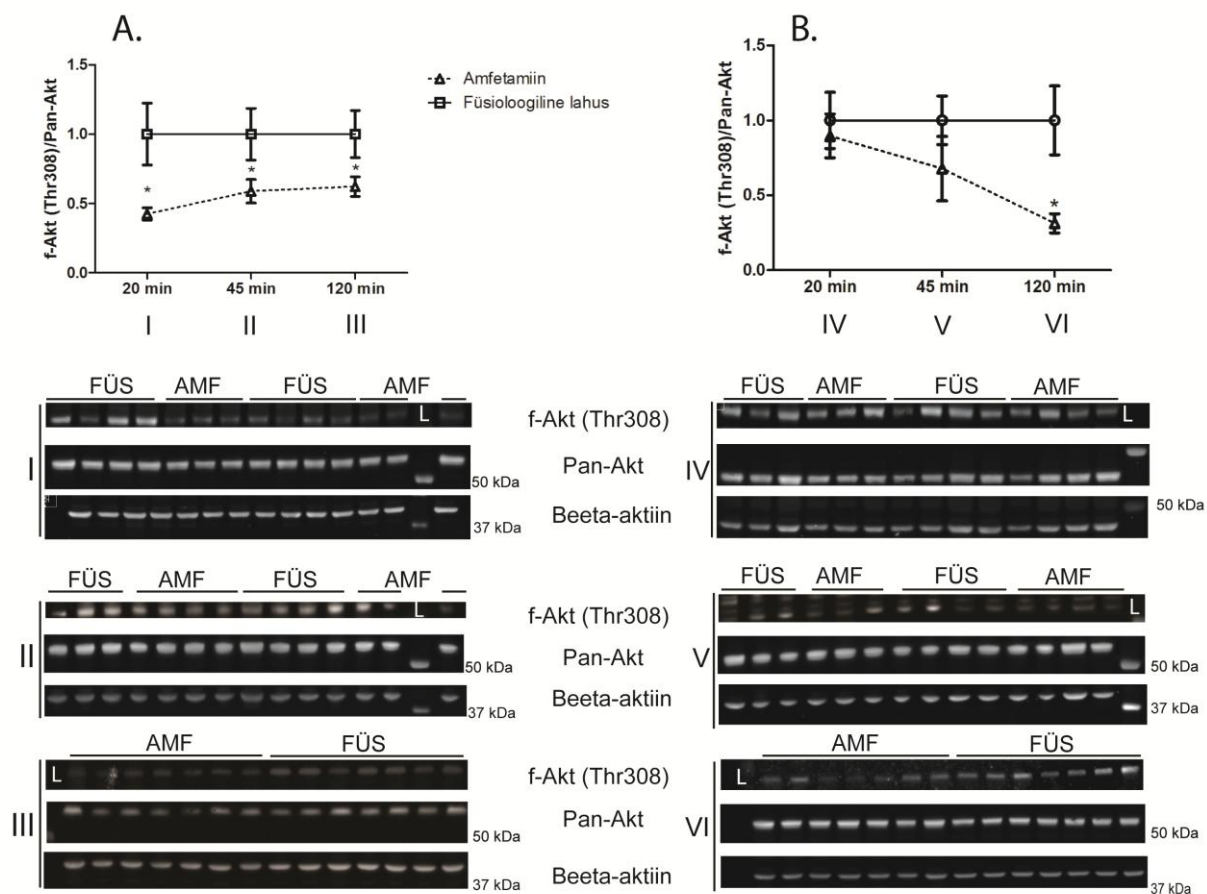
Joonis 5. Suhteline TH valguekspressioon metsiktüüpi (A) ja Wfs1-puudlike hiirte (B) dorsaalses striatumis kolmes erinevas ajapunktis peale amfetamiini (5 mg/kg) või füsioloogilise lahuse manustamist. Joonisel on toodud suhtelise TH valgu taseme kvantitatiivsed tulemused ja vastavad immunoblot'id (I-VI). * - $p < 0.05$ võrreldes sama genotüübi kontrollgrupiga 120 min ajapunktis (Tukey HSD). Igas grupis oli 6-7 looma. AMF - amfetamiin, FÜS - füsioloogiline lahus, L - ladder.

2.3.2.3. Fosfo-Akt Thr308 valgu ekspressioon striatumis peale amfetamiini või füsioloogilise lahuse akuutset manustamist

20 min ja 45 min ajapunktides oli Wfs1-puudulikel hiirtel fosfo-Akt Thr308 valgu ekspressioon oluliselt kõrgem kui metsiktüüpi hiirtel (Joonis 6). 120 min ajapunktis puudusid baastasemetes genotüüpide vahelised erinevused. Ühefaktoriline ANOVA näitas järgnevaid genotüüp efekte: 20 min $F(1,12)=4.82$, $p < 0.05$; 45 min $F(1,12)=11.63$, $p < 0.01$; 120 min $F(1,12)=2.70$, $p=0.13$. Metsiktüüpi hiirtel inhibeeris amfetamiini manustamine 20 min, 45 min ja 120 min ajapunktides statistiliselt oluliselt Akt Thr308 fosforülatsiooni võrreldes vastavate kontrollgruppidega: 20 min $F(1,12)=4.78$, $p < 0.05$; 45 min $F(1,12)=4.95$, $p < 0.05$; 120 min $F(1,12)=5.10$, $p < 0.05$ (Joonis 7A). Wfs1-puudulikel hiirtel inhibeeris amfetamiini toime Akt Thr308 fosforülatsiooni statistiliselt oluliselt alles 120 min peale ravimi manustamist: 20 min $F(1,12)=0.19$, $p=0.67$; 45 min $F(1,12)=2.11$, $p=0.17$; 120 min $F(1,12)=8.30$, $p < 0.05$ (Joonis 7B).



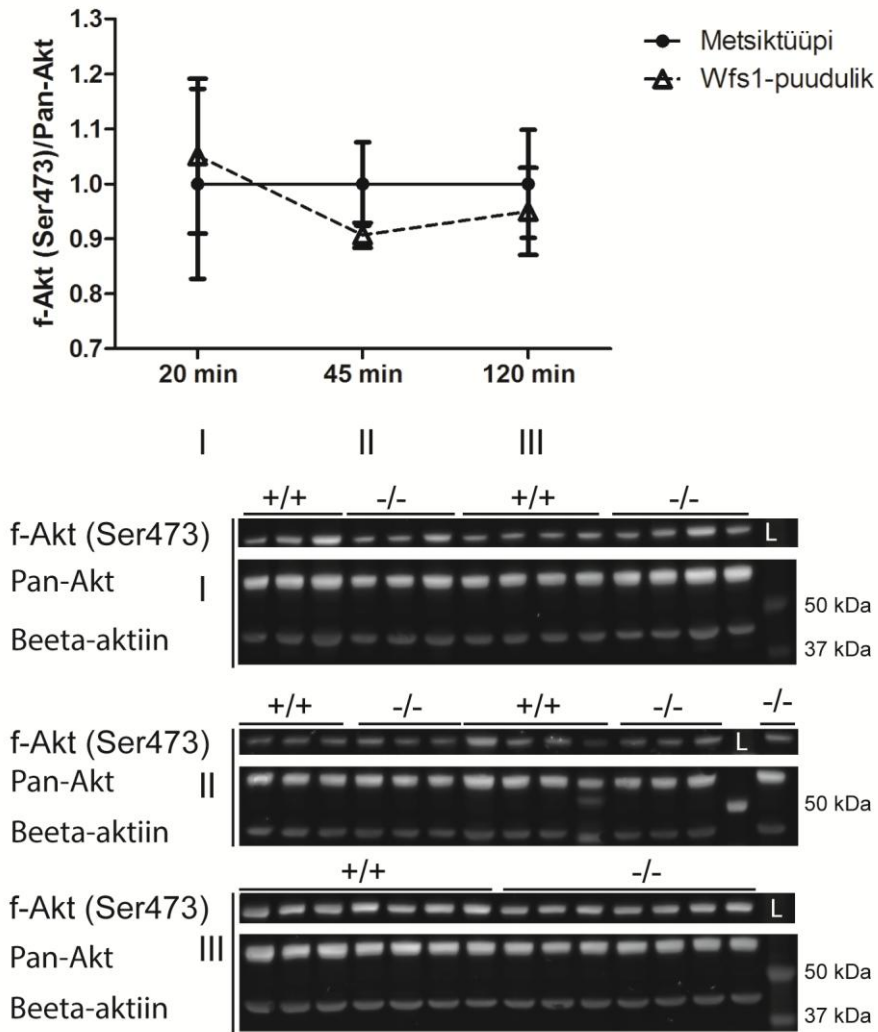
Joonis 6. Suhteline fosfo-Akt Thr308 valguekspressioon metsiktüüpi ja Wfs1-puudlike hiirte dorsaalses striatumis kolmes erinevas ajapunktis peale füsioloogilise lahuse manustamist. Joonisel on toodud suhtelise fosfo-Akt Thr308 valgu taseme kvantitatiivsed tulemused ja vastavad *immunoblot*'id (I-III). * - $p < 0.05$ võrreldes metsiktüüpi hiirte 20 min ajapunktiga (Tukey HSD). ** - $p < 0.01$ võrreldes metsiktüüpi hiirte 45 min ajapunktiga (Tukey HSD). Igas grupis oli 6-7 looma. -/- - Wfs1-puudulik, +/+ - metsiktüüpi, L - ladder.



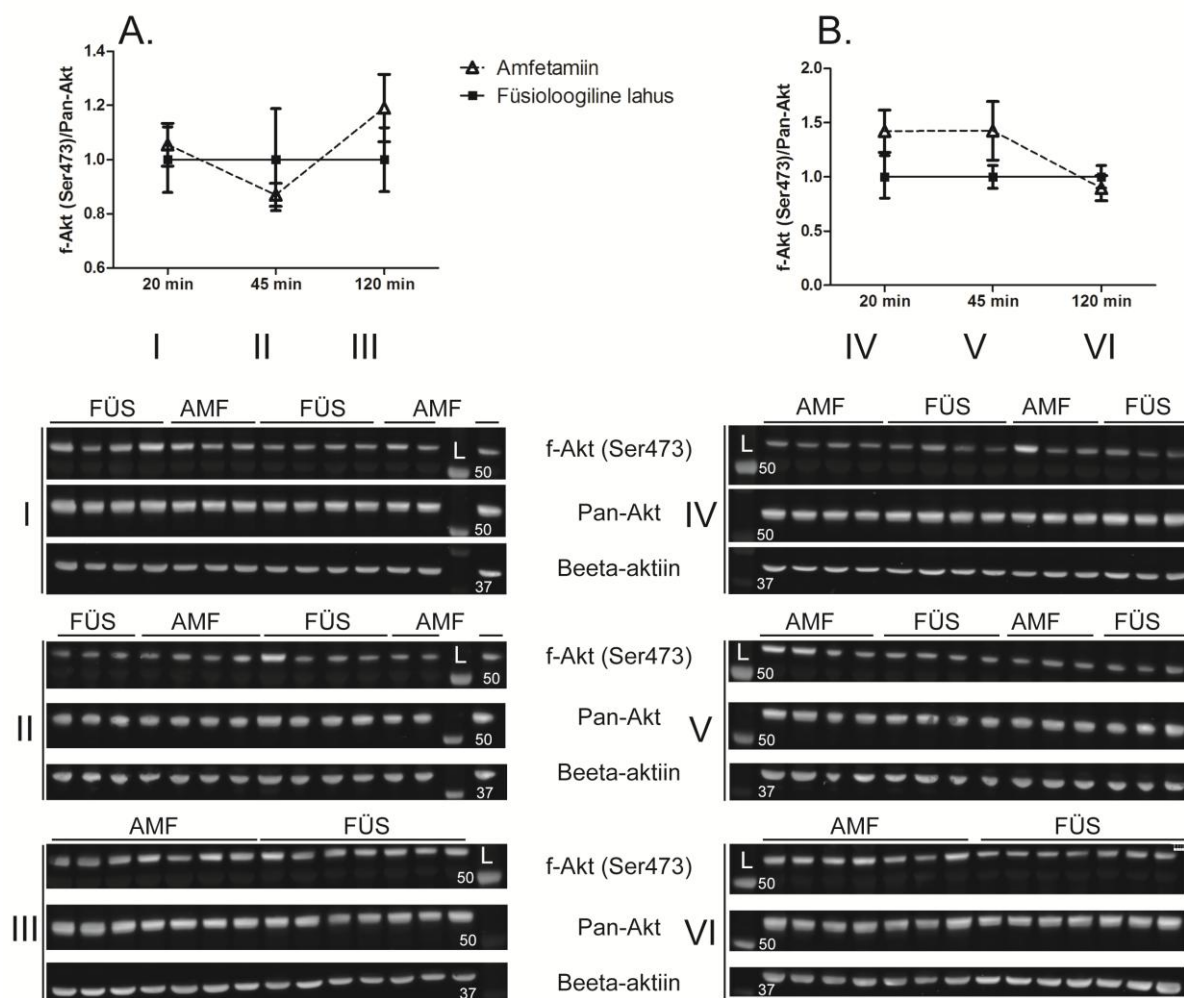
Joonis 7. Suhteline fosfo-Akt Thr308 valgukespressioon metsiktüüpi (A) ja Wfs1-puudlike hiirte (B) dorsaalses striatumis kolmes erinevas ajapunktis peale amfetamiini (5 mg/kg) või füsioloogilise lahuse manustamist. Joonisel on toodud suhtelise fosfo-Akt Thr308 valgu taseme kvantitatiivsed tulemused ja vastavad immunoblot'id (I-VI). * - $p < 0.05$ võrreldes füsioloogilist lahust saanud hiirte vastava ajapunktiga (Tukey HSD). Igas grupis oli 6-7 looma. AMF - amfetamiin, FÜS - füsioloogiline lahus, L - ladder.

2.3.2.4. Fosfo-Akt Ser473 valgu ekspressioon striatumis peale amfetamiini või füsioloogilise lahuse akuutset manustamist

20 min, 45 min ja 120 min ajapunktides puudusid fosfo-Akt Ser473 valgu baastasemetes genotüüpide vahelised erinevused (Joonis 8). Metsiktüüpi ja Wfs1-puudulikel hiirtel ei mõjutanud amfetamiini manustamine vaadeldud kolmes ajapunktis Akt Ser473 fosforülatsiooni (Joonis 9A ja 9B).



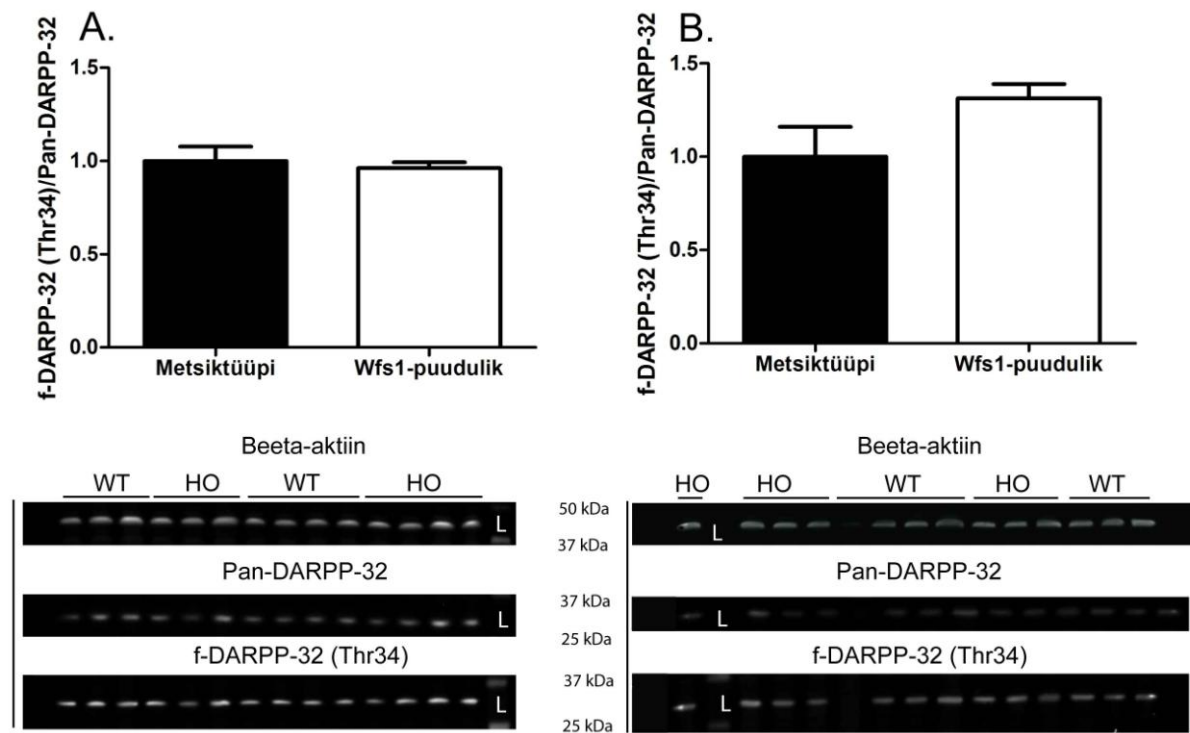
Joonis 8. Suhteline fosfo-Akt Ser473 valguekspressioon metsiktüüpi ja Wfs1-puudlike hiirte dorsaalses striatumis kolmes erinevas ajapunktis peale füsioloogilise lahuse manustamist. Joonisel on toodud suhtelise fosfo-Akt Ser473 valgu taseme kvantitatiivsed tulemused ja vastavad *immunoblot*'id (I-III). Igas grupis oli 6-7 looma. -/- - Wfs1-puudulik, +/+ - metsiktüüpi, L - ladder.



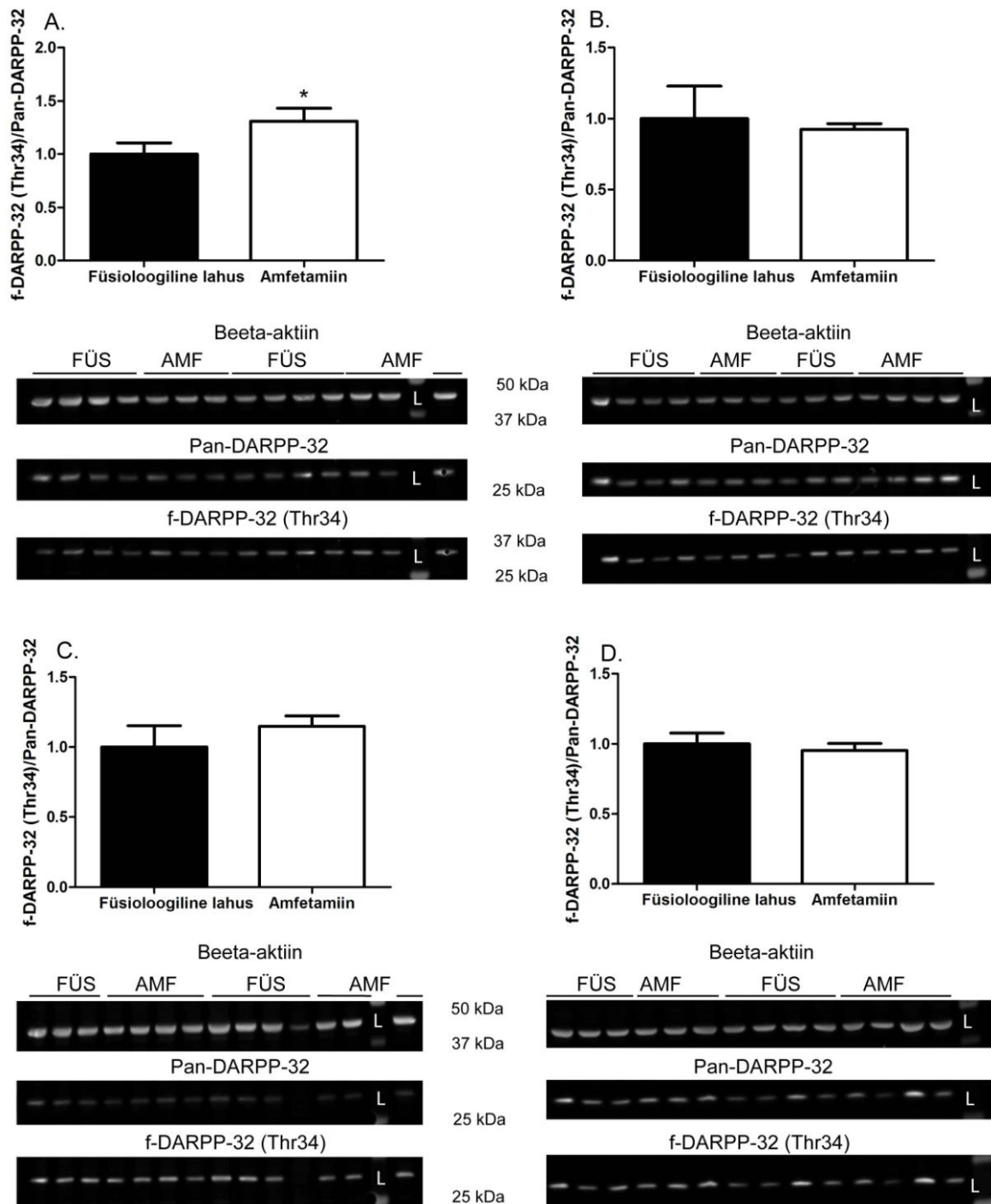
Joonis 9. Suhteline fosfo-Akt Ser473 valguekspressioon metsiktüüpi (A) ja Wfs1-puudlike hiirte (B) dorsaalses striaatumis kolmes erinevas ajapunktis peale amfetamiini (5 mg/kg) või füsioloogilise lahuse manustamist. Joonisel on toodud suhtelise fosfo-Akt Ser473 valgu taseme kvantitatiivsed tulemused ja vastavad immunoblot'id (I-VI). Igas grupis oli 6-7 looma. AMF - amfetamiin, FÜS - füsioloogiline lahus, L - ladder.

2.3.2.5. DARPP-32 Thr34 valgu ekspressioon striaatumis peale amfetamiini või füsioloogilise lahuse akuutset manustamist

20 min ja 45 min ajapunktides puudusid fosfo-DARPP-32 Thr34 baastasemetes genotüüpide vahelised erinevused (Joonis 10A ja 10B). 20 min peale amfetamiini manustamist oli metsiktüüpi hiirte DARPP-32 Thr34 fosforülatsioon oluliselt kõrgem kui vastava genotüübi füsioloogilist lahust saanud grupil $F(1, 12)=4.99$, $p<0.05$ (Joonis 11A). Wfs1-puudulikel hiirtel seevastu ei tõstnud amfetamiini toime DARPP-32 Thr34 fosforülatsiooni 20 min peale ravimi manustamist $F(1,12)=0.19$, $p=0.75$ (Joonis 11B). 45 min peale amfetamiini manustamist puudusid DARPP-32 Thr34 valgu ekspressioonis mõlemas genotüübis ravimigruppide vahel erinevused (Joonis 11C ja 11D).



Joonis 10. Suhteline fosfo-DARPP-32 Thr34 valguekspressioon metsiktüüpi ja Wfs1-puudlike hiirte dorsaalses striatumis kahes erinevas ajapunktis peale füsioloogilise lahuse manustamist. Joonisel on toodud suhtelise fosfo-DARPP-32 Thr34 valgu taseme kvantitatiivsed tulemused ja vastavad immunoblot'id. Igas grupis oli 6-7 looma. (A) 20 min, (B) 45 min.



Joonis 11. Suhteline fosfo-DARPP-32 Thr34 valguekspressioon metsiktüüpi ja Wfs1-puudlike hiirte dorsaalses striatumis kahes erinevas ajapunktis peale amfetamiini (5 mg/kg) või füsioloogilise lahuse manustamist. Joonisel on toodud suhtelise fosfo-DARPP-32 Thr34 valgu taseme kvantitatiivsed tulemused ja vastavad *immunoblots*'id. (A) metsiktüüpi hiired 20 min, * - $p < 0.05$ võrreldes füsioloogilist lahust saanud hiirtega (Tukey HSD); (B) Wfs1-puudulikud hiird 20 min; (C) metsiktüüpi hiired 45 min; (D) Wfs1-puudulikud hiird 45 min. Igas grupis oli 6-7 looma. AMF - amfetamiin, FÜS - füsioloogiline lahus, L - ladder.

2.4. Arutelu

Wfs1-puudulikel hiirtel on amfetamiini käitumist stimuleeriv toime oluliselt nõrgem kui nende metsiktüüpi pesakonnakaaslastel (Luuk *et al*, 2009; Visnapuu *et al*, 2013). Samamoodi

viitavad biokeemilised uurimused, et Wfs1-puudulikel hiirtel võib DA vabanemine või tase ajukoes olla madalam (Visnapuu *et al*, 2013). Kõigepealt jälgisime loomade lokomotoorset aktiivsust mootorikapuurides. Wfs1-puudulikkusega hiired olid taaskord oluliselt väiksema käitumusliku aktiivsusega. Selleks, et paremini mõista Wfs1 valgu puudumise mõju dopamiinergilise süsteemi tööle mõõtsime esmalt metsiktüüpi ja Wfs1-puudulike hiirte dorsaalses striatumis DAT ja TH valgu ekspressiooni peale amfetamiini (5 mg/kg) või füsioloogilise lahuse akuutset manustamist.

Käesoleva töö tulemused osaliselt kinnitavad varem leitud (Visnapuu *et al*, 2013) - DAT valgu ekspressiooni baastasemetes puuduvad metsiktüüpi ja Wfs1-puudulike hiirte vahel erinevused. 120 min peale amfetamiini manustamist oli DAT valgu ekspressioon metsiktüüpi hiirtel oluliselt kõrgem võrreldes vastava kontrollgrupiga. Seevastu Wfs1-puudulikel hiirtel ei erinenud DAT valgu ekspressioon üheski ajapunktis ravimi- ja kontrollrühma vahel. Amfetamiinist tingitud DAT-i ekspressiooni muutus võib olla kompensatoorne mehhanism vastusena suurenenud DA sekretsioonile. See oletus tundub tõenäoline kuna me oleme varasemalt leidnud, et Wfs1-puudulikel hiirtel ei tõusnud DA tase dorsaalses striatumis peale amfetamiini manustamist (Visnapuu *et al*, 2013).

Järgnevalt vaatasime, kas Wfs1-puudulikes hiirtes esineb DA sünteesis olulise valgu, TH diferentsiaalset ekspressiooni. Sarnaselt DAT-le puudusid ka TH valgu ekspressiooni baastasemetes erinevused. See on kooskõlas varem leitudga, kus dorsaalses striatumis ei olnud DA baastasemetes erinevusi (Visnapuu *et al*, 2013). Metsiktüüpi ja Wfs1-puudulikel hiirtel oli TH valgu ekspressiooni muster peale amfetamiini manustamist ühesugune: 20 min ja 45 min ajapunktides ei tõusnud TH valgu ekspressioon, kuid 120 min ajapunktis oli ekspressioon oluliselt kõrgem kui sama genotüübi vastavatel kontrollgruppidel. Saadud tulemused viitavad, et Wfs1-puudulikel hiirtel on DA süntees korras.

Edasi otsustasime uurida, kas Wfs1-puudulikel hiirtel esineb diferentsiaalne ekspressioon DA retseptoritest allavoolu jäävate valkude – fosfo-Akt (Thr308 ja Ser473) ning fosfo-DARPP-32 (Thr34) – ekspressioonis peale amfetamiini või füsioloogilise lahuse akuutset manustamist. PI3K/Akt-i olulisust on näidatud insuliini rajas, mis reguleerivad ka DAT-i ekspressiooni neuroni pinnal (Carvelli *et al*, 2002; Williams *et al*, 2007; Lute *et al*, 2008). Varasemalt on leitud, et D2 retseptorite aktivatsiooni tulemusena moodustub Akt/ β -arrestin2/PP2A kompleks, millele järgneb Akt Thr308 defosforülatsioon (Beaulieu *et al*, 2004; Beaulieu *et al*, 2005). Üldjuhul tundub, et psühhostimulantidest tulenev suurem liikumisaktiivsus on seotud Akt Thr308 madalama fosforülatsiooniga (Beaulieu *et al*, 2004). Valguekspressiooni

tulemused näitasid, et metsiktüüpi hiirtel pidurdas amfetamiini toime Akt Thr308 fosforülatsiooni statistiliselt oluliselt igas ajapunktis (20 min, 45 min ja 120 min) võrreldes vastavate kontrollrühmadega, samas Wfs1-puudulikel hiirtel vähenes Akt Thr308 fosforülatsioon statistiliselt oluliselt alles 120 min peale amfetamiini manustamist võrreldes kontrollgrupiga. Lisaks ravimigruppide vahelisele erinevusele oli Wfs1-puudulike hiirte Akt Thr308 valgu ekspressioon baastasemelt oluliselt kõrgem kui metsiktüüpi hiirtel. Olemasolevate andmete põhjal võib hilinevad defosforüleerimise põhjuseks olla vähenenud DA hulk, mis jõuab seda rada aktiveerivate D2 retseptoriteni või D2 retseptorite allaregulatsioon. Nimelt oleme leidnud, et Wfs1-puudulikel hiirtel on D2 retseptorit kodeeriva geeni mRNA ekspressioon dorsaalses striatumis madalam kui nende metsiktüüpi pesakonnakaaslastel (Visnapuu *et al*, 2013). Beaulieu jt (2007) on näidanud, et D2 *knockout* hiirtel on Akt Thr308 fosforülatsioon kõrgem kui metsiktüüpi hiirtel. Akt-i pidurdatuse teke 120 min peale amfetamiini manustamist on ilmselt seotud asjaoluga, et kasutasime üsna kõrget amfetamiini doosi (5 mg/kg) (Siciliano *et al*, 2014).

Wfs1-puudulikel hiirtel oli 20 min ja 45 min peale amfetamiini manustamist Akt Ser473 fosforülatsioon tõusnud, aga see erinevus ei olnud statistiliselt oluline. Tegu on vastupidise olukorraga kirjanduses näidatule, kuivõrd psühhostimulantidest tulenev Akt-i deaktivatsioon eeldab pigem defosforüleeritust Ser473 positsioonil (Wei *et al*, 2007). Erinevalt Wfs1-puudulikkusega hiirtest, metsiktüüpi hiirtel ei tekkinud muutust Ser473 fosforülatsioonis. Seegi on vastavuses kirjandusega, nimelt amfetamiin pidurdab Akt Thr308 fosforülatsiooni, samas Ser473 fosforülatsioon ei pruugi muutuda (Beaulieu *et al*, 2004).

Järgnevalt otsustasime kontrollida, kas D2 rajad nähtud postsünaptiliste valkude vähenenud aktiivsus Wfs1-puudulikel hiirtel avaldub ka D1/cAMP/PKA rajal. Selleks mõõtsime DARPP-32 valgu ekspressiooni, mis on amfetamiini toimes laialt uuritud valk (Nishi *et al*, 2000; Svenningsson *et al*, 2003; Beaulieu *et al*, 2005). DARPP-32 Thr34 baastasemetes puudusid genotüüpide vahelised erinevused, mis näitab, et vähemalt nende tulemuste valguses on D1 retseptoritest lähtuv signaalirada basaalselt toimiv. Kooskõlas kirjanduses toodud andmetega (Svenningsson *et al*, 2003) on DARPP-32 Thr34 fosforülatsioon metsiktüüpi hiirtel 20 min peale amfetamiini manustamist oluliselt kõrgem kui kontrollgrupil. Wfs1-puudulikel hiirtel seevastu ei leitud amfetamiini manustamise järgselt erinevusi DARPP-32 Thr34 fosforüleerumises. Amfetamiini võimetus suurendada Wfs1-puudulikel hiirtel DARPP-32 Thr34 fosforülatsiooni peale ravimi manustamist läheb kokku eespool tehtud järeldusega DA vähenenud väljutamisest.

Kokkuvõtlikult näitavad need tulemused, et DA signaalrajas olulise Akt-i baasfosforüleeritus Thr308 positsioonil on oluliselt kõrgem Wfs1-puudulikel hiirtel. Samuti on Wfs1-puudulikel hiirtel Akt-i fosforülatsioon Thr308 positsioonil ja DARPP-32 fosforülatsioon Thr34 positsioonil peale amfetamiini manustamist erinev metsiktüüpi hiirtest. Selge on asjaolu, et DA väljutamine amfetamiini mõjul on häiritud, mistõttu jõuab vähem DA-d retseptoritele. Vähemalt käesoleva töö raames avaldub see muutus dorsaalses striatumis ning ühtib Wfs1 valgu ekspressioonimustriga: Wfs1 valku ekspresseeritakse *caudate putamen*'is (Luuk *et al*, 2008), mis on *substantia nigra* dopamiinergiliste neuronite sihtmärk. Ühtlasi on dorsaalses striatumis kõrge DAT valgu ekspressioon (Ciliax *et al*, 1995). Andmed näitavad, et *substantia nigra*'sse jõuavad ainult Wfs1-ergilised närvikiud, kuid keskaju DA neuronites puudub Wfs1 ekspressioon (Luuk *et al*, 2008). Antud magistr töö tulemused kaardistavad kõrvalekalded neurokeemilistes mehhanismides, mis kaasnevad Wfs1 geeni inaktivatsiooniga.

KOKKUVÕTE

Käesoleva magistritöö eesmärk oli uurida, kas dopamiinergilises närviülekanDES oluliste pre-(TH, DAT) ja postsünaptiliste valkude (Akt, DARPP-32) ekspressioon erineb Wfs1-puudulike ja metsiktüüpi hiirte striatumis peale amfetamiini või füsioloogilise lahuse akuutset manustamist.

Saadud tulemused viitavad, et Wfs1-puudulike hiirte dopamiinergilise süsteemi häiritus võib tuleneda DA vähenenud vabanemisest peale amfetamiini manustamist. Kuna TH valgu ekspressioonis ei tuvastatud Wfs1-puudulike ja metsiktüüpi hiirte vahel erinevusi, on Wfs1-puudulikel hiirtel DA süntees tõenäoliselt korras. Postsünaptilistest valkudest mõõdeti fosfo-Akt-i (Thr308 ja Ser473) ja fosfo-DARPP-32 (Thr34) ekspressiooni. Akt on oluline D2 retseptoritest lähtuvas signaalirajas, samas kui DARPP-32 on seotud pigem D1 retseptoritest lähtuva rajaga. PI3K/Akt-i tähtsus on näidatud insuliini rajas. Hiljutised andmed viitavad, et Akt mõjutab ka dopamiinergilise süsteemi tööd läbi Akt/ β -arrestin2/PP2A kompleksi. Wfs1-puudulikel hiirtel defosforüleeritakse Akt Thr308 peale amfetamiini manustamist hiljem kui metsiktüüpi hiirtel võrreldes vastavate genotüüpide kontrollgruppidega. Akt-i hilisema deaktivatsiooni põhjuseks võib olla asjaolu, et vähem DA-d jõuab seda rada aktiveerivate D2 retseptoriteni ning Akt Thr308 baastase on kõrgem. Wfs1-puudulikel hiirtel võivad D2 retseptorid olla allareguleeritud, mistõttu on ka Akt Thr308 fosforülatsioon basaalselt kõrgem. Seevastu ei leitud fosfo-DARPP-32 Thr34 baastasemetes genotüüpide vahelisi erinevusi, mis lubab oletada, et basaalselt on D1 retseptoritest lähtuv signaalirada funktsioneeriv. Metsiktüüpi hiirtel suurendas amfetamiini manustamine DARPP-32 Thr34 fosforülatsiooni, kuid sellist erinevust ei täheldatud Wfs1-puudulikel hiirtel võrreldes vastavate genotüüpide kontrollgruppidega. Seega on suure tõenäosusega Wfs1-puudulikel hiirtel amfetamiinist tingitud DA väljutamine vähenenud.

TÄNUAVALDUSED

Eeskätt tänan oma juhendajat Tanel Visnapuud, kelle suurepärase abi, head nõuanded ning igakülgne toetus muutsid magistritöö kirjutamise meeldivaks ja õpetlikuks kogemuseks. Samuti tänan oma teist juhendajat Kersti Lillevälja. Eriti suured tänusõnad Tartu Ülikooli bio- ja siirdemeditiini instituudi füsioloogia osakonna töötajatele, kes olid antud töö valmimisel väärtuslike soovitude ja ideedega abiks.

Wfs1-deficient mice display altered expression of dopamine signaling proteins in the striatum

Kattri-Liis Eskla

Abstract

Mutations in the coding region of the WFS1 gene cause a rare autosomal recessive disorder called Wolfram syndrome (WS), characterised by diabetes mellitus, diabetes insipidus, optic atrophy and deafness. More importantly, both homozygous and heterozygous wolframin mutations severely predispose to psychiatric symptoms. Many neurologic and psychiatric diseases are associated with a dysfunctioning dopaminergic system. Recently, it has been shown that dopaminergic system of Wfs1-deficient mice is impaired. For example, the effect of amphetamine on locomotor activity was weaker in Wfs1-deficient homozygous mice (also referred to as Wfs1-deficient in the text) than in wild-type animals. In addition, we found that acute administration of amphetamine failed to increase the levels of dopamine in the dorsal striatum of Wfs1-deficient mice compared to mice in the respective control group. Surprisingly, the levels of dopamine transporter (DAT) protein did not differ in the dorsal striatum comparing Wfs1-deficient mice and wild-type littermates. DAT is a key regulator of dopamine homeostasis in the brain and a major target of psychostimulants such as amphetamine.

Moreover, Wfs1-deficient mice display altered glucose tolerance, hypoinsulinemia and insulin resistance. Insulin signaling, through PI3K/Akt regulates DAT cell surface expression. Hypoinsulinemia is known to attenuate amphetamine-induced dopamine release and impair DAT function. At the same time Akt mediates dopaminergic neurotransmission, being involved in the formation of signaling complex containing beta-arrestin 2, PP2A and Akt. It is important to note that D2 receptor activation leads to decreased phosphorylation of Akt at Thr308, while activation of D1 receptors, via stimulation of PKA, results in phosphorylation of DARPP-32 at Thr34. DARPP-32 has been shown to be a key mediator of the biochemical and behavioral effects of dopamine.

Here we first wanted to see if there is differential expression of proteins involved in dopamine release and synthesis between Wfs1-deficient mice and wild-type animals. For this, we sought to measure DAT and tyrosine hydroxylase (TH) protein levels after acute administration of amphetamine (5 mg/kg) or saline. Additionally, we measured phospho-Akt (Thr308 and Ser473) and phospho-DARPP-32 (Thr34) expressions after treatment with amphetamine or

saline to study expression of proteins downstream of dopamine receptors. All proteins were measured (by using western blot method) in the dorsal striatum, which is a major site for dopaminergic projections from the ventral midbrain, taken at three different timepoints (20 min, 45 min, 120 min). The dorsal striatum also has a high expression of DAT and insulin receptors. Moreover, Wfs1 protein is located to the caudal part of the mouse dorsal striatum.

These data demonstrate that disturbance of dopaminergic system of Wfs1-deficient mice might be caused by lower expression of DAT protein in dorsal striatum after treatment with amphetamine. In contrast, TH protein, the rate-limiting enzyme in dopamine synthesis, levels did not differ among Wfs1-deficient mice and wild-type littermates, suggesting that dopamine synthesis is intact in Wfs1-deficient mice, but the problem is in the dopamine release mechanism.

Reports indicate that amphetamine inhibits Akt phosphorylation at Thr308 in wild-type mice. On the other hand, dephosphorylation of Akt at Thr308 was delayed in Wfs1-deficient animals. Since the basal levels of phospho-Akt308 are also higher in Wfs1-deficient mice compared to wild-type animals, it can be hypothesized that in mutant mice less dopamine reaches postsynaptic dopamine receptors. D2 receptors are crucial for the deactivation of Akt by dopamine and D2 knockout mice are known to have increased phosphorylation of Akt Thr308. In Wfs1-deficient mice the dopamine D2 receptors are probably downregulated, which causes increased phosphorylation of Akt Thr308. Studies have shown that acute treatment of amphetamine increases the phosphorylation of Thr34 of DARPP-32. By contrast to wild-type mice, administration of amphetamine was not able to increase phosphorylation of DARPP-32 at Thr34 in Wfs1-deficient mice. In light of these results it is likely that less dopamine reaches postsynaptic dopamine receptors, after treatment with amphetamine.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Anden, N.E., Carlsson, A., Dahlstroem, A., Fuxe, K., Hillarp, N.A., and Larsson, K. (1964). Demonstration and mapping out of nigro-neostriatal dopamine neurons. *Life Sciences*. 3:523–530.
- Barrett, T.G., Bunday, S.E., Macleod, A.F. (1995). Neurodegeneration and diabetes: UK nationwide study of Wolfram (DIDMOAD) syndrome. *Lancet*. 346(8988):1458-63.
- Banks, W.A., Kastin, A.J. (1998). Differential permeability of the blood-brain barrier to two pancreatic peptides: insulin and amylin. *Peptides*. 19(5):883-9.
- Beaulieu, J.M. (2012). A role for Akt and glycogen synthase kinase-3 as integrators of dopamine and serotonin neurotransmission in mental health. *Journal of Psychiatry & Neuroscience*. 37(1):7-16.
- Beaulieu, J.M., Sotnikova, T.D., Marion, S., Lefkowitz, R.J., Gainetdinov, R.R., Caron, M.G. (2005). An Akt/beta-arrestin 2/PP2A signaling complex mediates dopaminergic neurotransmission and behavior. *Cell*. 122(2):261-73.
- Beaulieu, J.M., Sotnikova, T.D., Yao, W.D., Kockeritz, L., Woodgett, J.R., Gainetdinov, R.R., Caron, M.G. (2004). Lithium antagonizes dopamine-dependent behaviors mediated by an AKT/glycogen synthase kinase 3 signaling cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101, 5099–5104.
- Beaulieu, J.M., Tirota, E., Sotnikova, T.D., Masri, B., Salahpour, A., Gainetdinov, R.R., Borrelli, E., Caron, M.G. (2007). Regulation of Akt signaling by D2 and D3 dopamine receptors in vivo. *The Journal of Neuroscience*. 27(4):881-5.
- Bibb, J.A., Snyder, G.L., Nishi, A., Yan, Z., Meijer, L., Fienberg, A.A., Tsai, L.H., Kwon, Y.T., Girault, J.A., Czernik, A.J., Haganir, R.L., Hemmings, H.C. Jr, Nairn, A.C., Greengard, P. (1999). Phosphorylation of DARPP-32 by Cdk5 modulates dopamine signalling in neurons. *Nature*. 402(6762):669-71.
- Carlsson, A. (2001). A paradigm shift in brain research. *Science*. 294:1021–1024.
- Carvelli, L., Moro'n, J.A., Kahlig, K.M., Ferrer, J.V., Sen, N., Lechleiter, J.D., Leeb-Lundberg, L.M., Merrill, G., Lafer, E.M., Ballou, L.M., Shippenberg, T.S., Javitch, J.A., Lin, R.Z., Galli, A. (2002). PI 3-kinase regulation of dopamine uptake. *Journal of Neurochemistry*. 81:859–869.
- Ciliax, B.J., Heilman, C., Demchyshyn, L.L., Pristupa, Z.B., Ince, E., Hersch, S.M., Niznik,

- H.B., Levey, A.I. (1995). The dopamine transporter: immunochemical characterization and localization in brain. *The Journal of Neuroscience*. 15, 1714–1723.
- Creese, I., Burt, D.R., Snyder, S.H. (1976). Dopamine receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antischizophrenic drugs. *Science*. 192: 481–483.
- Fallon, J.H., Moore, R.Y. (1978). Catecholamine innervation of the basal forebrain. IV. Topography of the dopamine projection to the basal forebrain and neostriatum. *Journal of Comparative Neurology*. 1:545–580.
- Figlewicz, D.P., Evans, S.B., Murphy, J., Hoen, M., Baskin, D.G. (2003). Expression of receptors for insulin and leptin in the ventral tegmental area/ substantia nigra (VTA/SN) of the rat. *Brain Research*. 964, 107–115.
- Floor, E., Leventhal, P.S., Wang, Y., Meng, L., Chen, W. (1995). Dynamic storage of dopamine in rat brain synaptic vesicles in vitro. *Journal of Neurochemistry*. 64:689–699.
- Floor, E., Meng, L. (1996). Amphetamine releases dopamine from synaptic vesicles by dual mechanisms. *Neuroscience Letters*. 215:53–56.
- Gainetdinov, R.R., Caron, M.G. (2003). Monoamine transporters: from genes to behavior. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 43:261-84.
- Gainetdinov, R.R., Wetsel, W.C., Jones, S.R., Levin, E.D., Jaber, M., Caron, M.G. (1999). Role of serotonin in the paradoxical calming effect of psychostimulants on hyperactivity. *Science*. 283(5400):397-401.
- Giros, B. (1996). Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature*. 379, 606–612.
- Grimes, C.A., Jope, R.S. (2001). CREB DNA binding activity is inhibited by glycogen synthase kinase-3 beta and facilitated by lithium. *Journal of Neurochemistry*. 78(6):1219-32.
- Hemmings, H.C. Jr, Greengard, P., Tung, H.Y., Cohen, P. (1984). DARPP-32, a dopamine-regulated neuronal phosphoprotein, is a potent inhibitor of protein phosphatase-1. *Nature*. 310(5977):503-5.
- Hofmann, S., Philbrook, C., Gerbitz, K.D., Bauer, M.F. (2003). Wolfram syndrome: structural and functional analyses of mutant and wild-type wolframin, the WFS1 gene product. *Human Molecular Genetics*. 12(16), 2003–12.
- 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, 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):143-8.
- Iversen, S.D., Iversen, L.L. (2007). Dopamine: 50 years in perspective. *Trends in Neurosciences*. 30:188–193.
- Jakel, R.J., Maragos, W.F. (2000). Neuronal cell death in Huntington's disease: a potential role for dopamine. *Trends in Neurosciences*. 23:239–245.
- Kantor, L., Hewlett, G.H., Gnegy, M.E. (1999). Enhanced amphetamine- and K⁺-mediated dopamine release in rat striatum after repeated amphetamine: differential requirements for Ca²⁺ and calmodulin-dependent phosphorylation and synaptic vesicles. *The Journal of Neuroscience*. 19(10):3801-8.
- Karasik, A., O'Hara, C., Srikanta, S., Swift, M., Soeldner, J.S., Kahn, C.R., Herskowitz, R.D. (1989). Genetically programmed selective islet b-cell loss in diabetic subjects with Wolfram's syndrome. *Diabetes Care*. 12, 135–138.
- Kinsley, B.T., Swift, M., Dumont, R.H., Swift, R.G. (1995). Morbidity and mortality in the Wolfram syndrome. *Diabetes Care*. 18:1566–1570.
- Koob, G.R., Bloom, F.E. (1988). Cellular and molecular mechanisms of drug dependence. *Science*. 242:715–723.
- Lindskog, M. (2011). DARPP-32 in the striatum. Multiple regulation and physiological role.
- Lute, B.J., Khoshbouei, H., Saunders, C., Sen, N., Lin, R.Z., Javitch, J.A., Galli, A. (2008). PI3K signalling supports amphetamine-induced dopamine efflux. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 372:656–661.
- Luuk, H., Kõks, S., Plaas, M., Hannibal, J., Rehfeld, J.F., Vasar, E. (2008). Distribution of Wfs1 protein in the central nervous system of the mouse and its relation to clinical symptoms of the Wolfram syndrome. *The Journal of Comparative Neurology*. 509(6):642-60.
- Luuk, H., Plaas, M., Raud, S., Innos, J., Sütt, S., Lasner, H., Abramov, U., Kurrikoff, K., Kõks, S., Vasar, E. (2009). Wfs1-deficient mice display impaired behavioural adaptation in stressful environment. *Behavioural Brain Research*. 198(2):334-345.
- Matto, V., Terasmaa, A., Vasar, E., Kõks, S. (2011). Impaired striatal dopamine output of homozygous Wfs1 mutant mice in response to [K⁺] challenge. *Journal of Physiology and Biochemistry*. 67(1):53-60.

- Missale, C., Nash, S.R., Robinson, S.W., Jaber, M., Caron, M.G. (1998). Dopamine receptors: from structure to function. *Physiological Reviews*. 78:189–225.
- Nagatsu, T., Levitt, M., Udenfriend, S. (1964). Tyrosine hydroxylase. The initial step in norepinephrine biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry*. 239:2910-7.
- Nishi, A., Bibb, J.A., Snyder, G.L., Higashi, H., Nairn, A.C., Greengard, P. (2000). Amplification of dopaminergic signaling by a positive feedback loop. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97(23):12840-5.
- Noormets, K., Kõks, S., Muldmaa, M., Muring, L., Vasar, E., Tillmann, V. (2011). Sex differences in the development of diabetes in mice with deleted wolframin (Wfs1) gene. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*. 119(5):271-5.
- Polymeropoulos, M.H., Swift, R.G., Swift, M. (1994). Linkage of the Wolfram syndrome disease gene with markers on the short arm of chromosome 4. *Nature Genetics*. 8(1):95–7.
- Schulingkamp, R.J., Pagano, T.C., Hung, D., Raffa, R.B. (2000). Insulin receptors and insulin action in the brain: review and clinical implications. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 24, 855–872.
- Seiden, L.S., Sabol, K.E., Ricaurte, G.A. (1993). Amphetamine: effects on catecholamine systems and behavior. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 32:639–677.
- Siciliano, C.A., Calipari, E.S., Ferris, M.J., Jones, S.R. (2014). Biphasic mechanisms of amphetamine action at the dopamine terminal. *The Journal of Neuroscience*. 34(16):5575-82.
- Strom, T.M., Hortnagel, K., Hofmann, S., Gekeler, F., Scharfe, C., Rabl, W., Gerbitz, K.D., Meitinger, T. (1998). Diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy and deafness (DIDMOAD) caused by mutations in a novel gene (wolframin) coding for a predicted transmembrane protein. *Human Molecular Genetics*. 7(13): 2021–28.
- Sulzer, D., Rayport, S. (1990). Amphetamine and other psychostimulants reduce pH gradients in midbrain dopaminergic neurons and chromaffin granules: a mechanism of action. *Neuron*. 5:797– 808.
- Sulzer, D., Sonders, M.S., Poulsen, N.W., Galli, A. (2005). Mechanisms of neurotransmitter release by amphetamines: A review. *Progress in Neurobiology*. 75(6):406–433.
- Swanson, J.M., Kinsbourne, M., Nigg, J., Lanphear, B., Stefanatos, G.A., Volkow, N., Taylor, E., Casey, B.J., Castellanos, F.X., Wadhwa, P.D. (2007). Etiologic subtypes of attention- deficit/hyperactivity disorder: brain imaging, molecular genetic and environmental

factors and the dopamine hypothesis. *Neuropsychology Review*. 17:39–59.

Svenningsson, P., Tzavara, E.T., Carruthers, R., Rachleff, I., Wattler, S., Nehls, M., McKinzie, D.L., Fienberg, A.A., Nomikos, G.G., Greengard, P. (2003). Diverse psychotomimetics act through a common signaling pathway. *Science*. 302, 1412–1415.

Swift, R.G., Perkins, D.O., Chase, C.L., Sadler, D.B., Swift, M. (1991). Psychiatric disorders in 36 families with Wolfram syndrome. *American Journal of Psychiatry*. 148(6):775-9.

Swift, R.G., Polymeropoulos, M.H., Torres, R., Swift, M. (1998). Predisposition of Wolfram syndrome heterozygotes to psychiatric illness. *Molecular Psychiatry*. 3(1): 86–91.

Swift, R.G., Sadler, D.B., Swift, M. (1990). Psychiatric findings in Wolfram syndrome homozygotes. *Lancet*. 336(8716):667-9.

Zhuang, X., Oosting, R.S., Jones, S.R., Gainetdinov, R.R., Miller, G.W., Caron, M.G., Hen, R. (2001). Hyperactivity and impaired response habituation in hyperdopaminergic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98(4):1982-7.

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. *Human Molecular Genetics*. 10(5), 477–84.

Terasmaa, A., Soomets, U., Oflijan, J., Punapart, M., Hansen, M., Matto, V., Ehrlich, K., Must, A., Kõks, S., Vasar, E. (2011). Wfs1 mutation makes mice sensitive to insulin-like effect of acute valproic acid and resistant to streptozocin. *Journal of Physiology and Biochemistry*. 67(3):381-90.

Torres, G.E., Gainetdinov, R.R., Caron, M.G. (2003). Plasma membrane monoamine transporters: structure, regulation and function. *Nature Reviews Neuroscience*. 4:13-25.

Wei, Y., Williams, J.M., Dipace, C., Sung, U., Javitch, J.A., Galli, A., Saunders, C. (2007). Dopamine transporter activity mediates amphetamine-induced inhibition of Akt through a Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II-dependent mechanism. *Molecular Pharmacology*. 71(3):835-42.

Williams, J.M., Owens, W.A., Turner, G.H., Saunders, C., Dipace, C., Blakely, R.D., France, C.P., Gore, J.C., Daws, L.C., Avison, M.J., Galli, A. (2007). Hypoinsulinemia regulates amphetamine-induced reverse transport of dopamine. *PLOS Biology*. 5(10):e274.

Wise, R.A. (1996). Addictive drugs and brain stimulation reward. *Annual Review of Neuroscience*. 19:319–340.

Visnapuu, T., Plaas, M., Reimets, R., Raud, S., Terasmaa, A., Kõks, S., Sütt, S., Luuk, H., Hundahl, C.A., Eskla, K.L., Altpere, A., Altkoa, A., Harro, J., Vasar, E (2013). Evidence for impaired function of dopaminergic system in *Wfs1*-deficient mice. *Behavioural Brain Research*. 244:90-99.

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

Yin H.H., Ostlund, S.B., Knowlton, B.J., Balleine, B.W. (2005). The role of the dorsomedial striatum in instrumental conditioning. *European Journal of Neuroscience*. 22:513–523.

KASUTATUD VEEBIAADDRESSID

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK4144/>

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Kattri-Liis Eskla (sünnikuupäev: 26.06.1990)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose
Dopamiinergilise süsteemi valkude diferentsiaalne ekspressioon Wfs1-puudulike hiirte dorsaalses striatumis, mille juhendajad on Tanel Visnapuu ja Kersti Lilleväli,
 - 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.14