

## Kokkuvõte

Alzheimer'i tõbi on neurodegeneratiivne haigus, millega põhjustajaks peetakse amüloidi eellasvalgu (APP) proteolüütilise jäägi amüloid-beeta ( $A\beta$ ) peptiidi liigset kogunemist rakuvälistesse amüloidsetesse naastudesse. Teada on, et Alzheimeri tõve puhul esinevate naastude moodustumisel mängivad rolli ka metalliioonid, nagu vask- ja tsinkioonid, kuid lisaks sellele on nähtud, et nimetatud ioonid võivad interakteeruda ka APP-ga. Vask- ja tsinkioonide mõju endogeense APP ekspressioonile neuroblastoomist saadud rakuliinidele, mille hulka kuuluvad ka SH-SY5Y ja Neuro2A, ei ole uuritud nii diferentseerimata ega ka diferentseeritud rakkudes.

Töö eesmärgiks oli uurida Zn(II) ja vase ionide mõju endogeense APP ekspresseerumistasemele nii diferentseerimata kui diferentseeritud rakuliinides SH-SY5Y ja Neuro2A. Selleks oli vaja kõigepealt optimeerida western ülekande meetod endogeense APP tuvastamiseks ning seejärel viidi läbi ülekanne mõlema rakuliini puhul nii diferentseeritud kui diferentseerimata kujul olles eelnevalt töödeldud rakke vask- või tsinkioonidega. Rakkude diferentseerumist kontrolliti immuno-tsütokeemiliselt ning metalliioonide kontsentratsioonid rakkude töötlemiseks valiti kirjanduse põhjal. Metallioonide mõju rakkudele kontrolliti WST-1 elulemuse katsega. Leiti, et diferentseeritud Neuro2A rakkude puhul langes elulemus tsinkioonide kontsentratsioonil 200  $\mu\text{M}$ , kuid diferentseerimata Neuro2A rakke sama tsinkioonide kontsentratsioon ei mõjutanud. Neuro2A rakkude vaskioonidega töötlemisel elulemuse tase ei muutunud madalatel metalliioonide kontsentratsioonidel nii diferentseeritud kui diferentseerimata rakkude puhul ning olulist elulemuse langust nähti alates vaskioonide kontsentratsioonist 25  $\mu\text{M}$ . Diferentseerimata SH-SY5Y rakkudel väheneb elulemus oluliselt nende töötlemisel vaskioonidega alates kontsentratsioonist 12,5  $\mu\text{M}$  ning diferentseeritud SH-SY5Y rakkude töötlemisel vaskioonidega elulemus ei muutu. SH-SY5Y rakkude töötlemisel Zn(II) ionidega ei nähtud olulist elulemuse langust diferentseerimata ega diferentseeritud rakkude puhul. Seega käitusid metalliioonidega töödeldes

diferentseeritud ja diferentseerimata rakuliinid erinevalt ja sellega tuleb arvestada mudelsüsteemi valikul, eriti kui uurimisobjektiks on endogeenne valk. Western ülekandel tuvastati kolm huvipakkuvat vööti 55, 65 ja 110 kDa juures. Vaskioonidega töödeldes nähti diferentseeritud SH-SY5Y rakkude puhul märkimisväärset 55 kDa fragmendi ekspressiooni suurenemist alates kontsentratsioonist 1  $\mu$ M. Ekspressiooni suurenemist oodati rakkude töötlemisel tsinkioonidega vastavalt kirjandusest leitud varasematele katsetele hiirtega ning seda nähti 55 kDa valgu puhul nii diferentseeritud SH-SY5Y rakkude kui ka Neuro2A rakkude puhul. Muutunud ekspressiooni ei tuvastatud diferentseerimata Neuro2A rakkude puhul ning diferentseerimata SH-SY5Y rakkude puhul nähti madalamatel kontsentratsioonidel suurenenud ekspressiooni ja kõrgematel tsinkioonide kontsentratsioonil langenud ekspressiooni.

Western ülekandel nähtud 55, 65 ja 110 kDa vöödid lõigati SDS-PAGE geelist välja ja valmistati ette LC-MS/MS analüüsiks. LC-MS/MS analüüsiks viidi läbi proovide trüpsinolüüs ja nad kontsentreeriti C<sub>18</sub>-kolonni abil StageTip meetodil. Saadud LC-MS/MS analüüsi tulemusi töödeldi MaxQuant 1.5.3.17 tarkvarapaketi abil. Analüüsi tulemusena tuvastati 55 kDa vöödis 11 ainulaadset APP peptiidi. Edasi toimus andmete töötlemine ja visualiseerimine Scaffold tarkvara abil, mis lähtudes tuvastatud peptiidide paiknemist viitab 100% tõenäosusega täispikkuses APP<sub>695</sub> valgu olemasolule. Scaffold programmi järgi katavad LC-MS/MS meetodil tuvastatud peptiidid 21% täispikast APP<sub>695</sub> valgust, kuid ei kata 126 aminohappejääki N-terminaalsest otsast ja 71 aminohappejääki C-terminaalsest otsast. Täispikk APP valk paikneks töös kasutatud SDS-PAGE tingimustel reeglina 110 kDa juures, mistõttu ei ole usutav täispika valgu leidumine 55 kDa fragmendis. Antud tulemust on võimalik seletada võimalusega, et tuvastati APP valk, mis on läbinud lõikamise  $\gamma$ -sekretaasi poolt, kuigi varasemas kirjanduses ei ole kirjeldatud, et  $\gamma$ -sekretaas lõikaks endogeenset APP valku enne APP lõikamist kas  $\alpha$ - või  $\beta$ -sekretaasi poolt. Teise hüpoteesi kohaselt vastaks nähtav fragment APP<sub>695</sub> lõikamisele asparagiini endopeptidaasi poolt 373 aminohappe juures, mille tagajärjel tekib 373 aminohappe pikkune N-terminaalne fragment massiga 42,0 kDa ja 322 aminohappe pikkune C-terminaalne fragment massiga 36,8 kDa, mis võiksid geelil antud kohas ilmned.