

## **$\alpha/\beta$ -Tubuliin-vask(I) kompleksi uurimine**

Bakalaureusetöö

Üliõpilane: Jelizaveta Kravtsova

Juhendajad: Julia Smirnova, teadur, Ph.D

Ekaterina Kabin, teadur, Ph.D

Keemia ja biotehnoloogia instituut

Õppekava: Rakenduskeemia ja geenitehnoloogia

## **Investigation of $\alpha/\beta$ -tubulin-copper(I) complex**

Bachelor`s thesis

Üliõpilane: Jelizaveta Kravtsova

Juhendaja: Julia Smirnova, researcher, Ph.D

Ekaterina Kabin, researcher, Ph.D

Department of Chemistry and Biotechnology

Study programm: Applied Chemistry and Gene Technology

## Autorideklaratsioon

Kinnitan, et olen koostanud antud lõputöö iseseisvalt ning seda ei ole kellegi teise poolt varem kaitsmisele esitatud. Kõik töö koostamisel kasutatud teiste autorite tööd, olulised seisukohad, kirjandusallikatest ja mujalt pärinevad andmed on töös viidatud.

Autor: Jelizaveta Kravtsova

allkiri ja kuupäev: 29.05.2024

Töö vastab bakalaureusetööle esitatavatele nõuetele.

Juhendajad: Julia Smirnova ja Ekaterina Kabin

allkiri ja kuupäev: 29.05.2024

Töö on lubatud kaitsmisele.

Kaitsmiskomisjoni esimees: Indrek Koppel

allkiri ja kuupäev: 29.05.2024

## Sisukord

Lühendite loetelu .....	6
Sissejuhatus.....	7
1 Kirjanduse ülevaade.....	8
1.1 Vase metabolism.....	8
1.1.1 Wilsoni tõbi.....	10
1.2 Vase mõju tsütoskeletile.....	10
1.3 Tsütoskelett .....	11
1.3.1 Tubuliin .....	11
1.3.2 Mikrotuubulid .....	12
2 Käesoleva töö eesmärgid.....	13
3 Materjalid ja meetodid .....	14
3.1 Teoreetiline kirjeldus .....	14
3.1.1 Eksklusioonkromatograafia .....	14
3.1.2 Massispektromeetria.....	15
3.1.3 ICP MS.....	15
3.1.4 Natiivne geelelektroforees .....	16
3.1.5 Transmissioonelektronmikroskoopia .....	16
3.2 Eksperimentaalse töö kirjeldus.....	17
3.2.1 Kasutatud reagentid.....	17
3.2.2 $\alpha/\beta$ -tubuliini varulahuse ettevalmistamine ja säilitamine.....	17
3.2.3 Cu(I) ja Zn(II) sidumise uurimine tubuliini dimeeri ja oligomeeridega kasutades LC-ICP MS meetodit .....	18
3.2.4 $\alpha/\beta$ -tubuliini oligomeeride struktuuri uurimine TEM abil.....	18
3.2.5 $\alpha/\beta$ -tubuliini oligomerisatsiooni uurimine uurimine Cu(I) juuresolekul kasutades LC-ICP MS meetodit .....	18
3.2.6 Cu(I)- $\alpha/\beta$ -tubuliini-oligomeeride ettevalmistamine ning demetalleerimise kineetika uurimine DTT juuresolekul .....	19
3.2.7 $\alpha/\beta$ -tubuliini oligomeeride dissotsiatsioonikonstandi määramine .....	19
4 Tulemused .....	20
4.1 Cu(I) ja Zn(II) seovad $\alpha/\beta$ -tubuliini oligomeeridega, kuid mitte dimeeriga .....	20
4.2 $\alpha/\beta$ -tubuliini oligomeeride visualiseerimine TEM abil.....	21

4.3	Cu(I) indutseerib $\alpha/\beta$ -tubuliini oligomeeride teket .....	21
4.4	Cu(I)- $\alpha/\beta$ -tubuliini oligomeeride demetalliseerimise kineetika uurimine kõrgemate DTT kontsentratsioonide juuresolekul .....	23
4.5	Cu(I)- $\alpha/\beta$ -tubuliini oligomeeride kompleksi dissotsiatsioonikonstandi määramine .....	24
	Arutelu .....	26
	Annotatsioon.....	27
	Abstract .....	28
	Tanüavaldused .....	29
	Kasutatud allikad .....	30

## Lühendite loetelu

ATOX1 - antioksidantne valk-1

CP - tseruloplasmiin

CTR1 - vase transporter valk-1

DTT - ditiotreitool

GSH - glutatioon

GSSG – glutatioondisulfiid

GDP - guanosiin-5'-difosfaiks

GTP - guanosiin-5'-trifosfaat

ICP MS - induktiivsidestatud plasma massispektromeetria

$K_D$  - dissotsiatsioonikonstand

LC - vedelikromatograafia

MNKT - Menkesi tõbi

MT - mikrotuubul

SEK - eksklusioonkromatograafia

TEM - transmissioonelektronmikroskoopia

WT - Wilsoni tõbi

## Sissejuhatus

Vask on hädavajalik organismi normaalseks talitluseks ja arenguks. Cu osaleb erinevates protsessides nagu raku hingamine, neurotransmitterite süntees, lipiidide ainevahetus ja raku signaliseerimine. Cu on oluline metall redoksreaktsioonide katalüüsis. Vase homöostaas inimkehas peab olema rangelt reguleeritud, kuna Cu metabolismi häired on seotud mitmete haigustega, nagu Menkesi tõbi (MNKT), Wilsoni tõbi (WT), vähk, rasvumine, Alzheimeri tõbi.

WT on autosoomne retsessiivne pärilik haigus, mille puhul toimub vase akumulatsioon kehas, eriti maksas, ajus ja sarvkestas. Kõige levinumateks WT sümptomiteks on maksapõletik, neurodegeneratsioon ja psüühikahäired. WT korral muutuvad mitmed rakusisesed protsessid, nagu rakusisene transport ja rakutsükkel. On näidatud, et Cu homöostaasi häirimine toob kaasa ka raku morfoloogilisi muutusi. WT korral muutub hepatotsüütide kuju ja suurenevad nende tuumad, mis viidab sellele, et liigne Cu takistab normaalset tsütoskeleti talitlust. Tsütoskelett on raku põhikomponent, mis säilitab raku kuju, vahendab rakusisest transporti ja reguleerib mehaanilisi ühendusi. Raku tsütoskelett koosneb peamiselt F-aktiinist, mikrotuubulitest (MT-d) ja vahepealsetest filamentidest. MT-d annavad rakule tuge ja stabiilsust. Lisaks sellele osalevad nad rakkude migratsioonis, signaalide ülekandmises, vesiikulite transpordis ja tsütoplasma moodustumisel.

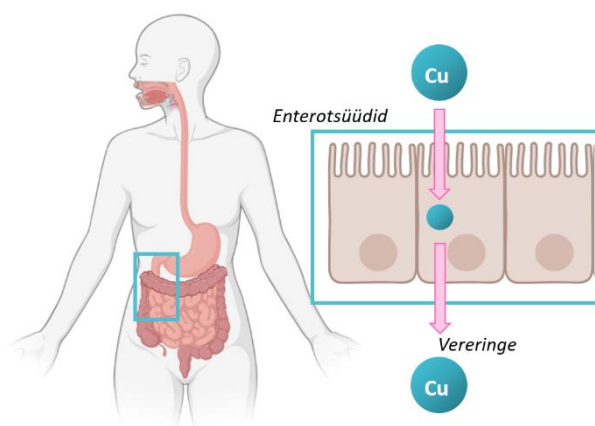
MT-te struktuur koosneb korduvatest polümeriseerunud  $\alpha/\beta$ -tubuliini heterodimeeridest. Tubuliinil on palju isovorme ja neid uuritakse intensiivselt *in vitro* ja *in vivo*. Tubuliini struktuur on samuti mõjutatud Cu poolt. On näidatud, et Cu pärsib  $\beta$ -tubuliini sünteesi hippokampuse neuronites. Vaatamata intensiivsetele uuringutele pole veel täpsemalt teada, kuidas vask mõjutab  $\alpha/\beta$ -tubuliini struktuuri. Üldise Cu metabolismi ja selle rolli mõistmiseks tervises ja haiguse tingimustes (kaasarvatud WT ja teised Cu kuhjumisest põhjustatud häired) on vaja uurida, kuidas  $\alpha/\beta$ -tubuliin seob vaskioone ja kui tugev on see interaktsioon, ehk kui suure sidumiskonstandi abil saab seda iseloomustada. Käesoleva töö raames kasutati LC-ICP MS meetodikat selleks, et uurida Cu(I) sidumist  $\alpha/\beta$ -tubuliini heterodimeeridega. Näidati, et Cu(I) ioonid ei seostu dimeeriga, vaid seostuvad peamiselt  $\alpha/\beta$ -tubuliini oligomeeridega. Samuti määrati, kui tugevasti  $\alpha/\beta$ -tubuliini oligomeerid seovad Cu(I) ioone kasutades konkureeriva ligandina ditiotreitooli (DTT-d).

# 1 Kirjanduse ülevaade

## 1.1 Vase metabolismism

Vask on hädavajalik mikroelement kõikide organismide jaoks (1). Cu on oluline redoksmetall ja ensüümide kofaktor, kuna ta asub ensüümide aktiivtsentris ja vahendab redoksreaktsioone (2,3). Cu-st sõltuvad ensüümid osalevad erinevates bioloogilistes protsessides, nagu näiteks raku signaliseerimine, mitokondriaalne hingamine, neuromediaatorite süntees ja lipiidide ainevahetus (3–5).

Organismis esinevad mõlemad vase ioonid - oksüdeeritud Cu(II) ja redutseeritud Cu(I), aga inimese raku sisse transporditakse vask enamasti Cu(I) kujul, kuna rakkude sees on taandav keskkond (1). Glutatioon/glutatioondisulfiid (GSH:GSSG), nikotiinamiidadeniindinukleotiid (NAD<sup>+</sup>/NADH), nikotiinamiidadeniindinukleotiidfosfaat (NADP<sup>+</sup>/NADPH) redokspaarid tagavad taandava keskkonna säilitamise (6,7). Raku redoskoleku muutustega on seotud mitmed häired sellistes olulistest protsessides, nagu rakkude diferentseerumine ja kasv (1,6).

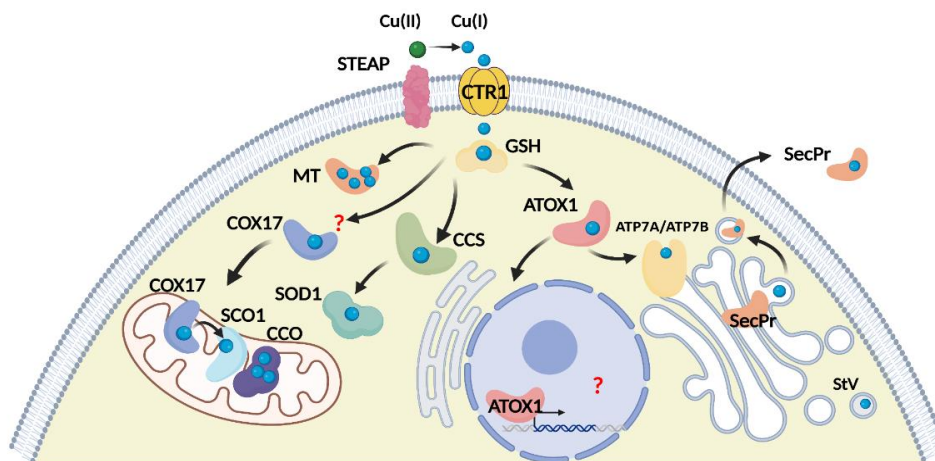


Joonis 1. Vase imendumine inimese organismis. Kohandatud (4) BioRender programmi abil.

Cu siseneb organismi toiduga peensoole kaudu ja imendub peamiselt kaksteistsõrmiksooles enterotsüütide kaudu. Vase imendumine toimub ka peensooles ja maos ((1,8), Joonis 1). Enne raku sisenemist redutseerivad STEAP perekonna metalloreduktaasid Cu(II) peamiselt Cu(I)-ks ((9,10), Joonis 2). Vask siseneb raku läbi kõrge afiinsusega vase transporteri (CTR1) ((8,11), Joonis 2). Vaskioonide sisenemine CTR1 abil on reguleeritud ka GSH:GSSG paari poolt (1). Peale sisenemist seondub Cu(I) tsütosoolsete vase šaperoonidega, mis toimetavad Cu erinevatele sihtmärk ensüümidele (4,11). Inimese rakus on seitse vase šaperooni, mis mängivad vase homöostaasis suurt rolli: vase šaperoon superoksiidi dismutaasi jaoks (CCS), vase šaperoonid (COX17, COX11, SCO1 ja SCO2) tsütokroom-c oksüdaasi (CcO) jaoks ning antioksidantne valk 1 (ATOX1) (Joonis 2). Vasest sõltuvad mitmed ensüümid, mille seas on CcO, mis osaleb energia metabolismis, ja Cu,Zn superoksiidi dismutaas (SOD1), mis tagab kaitse oksüdantide vastu (1). ATOX1 transpordib vaske trans-Golgi võrgustikus olevatele ATP7B ja ATP7A Cu ATP-aasidele ((1), Joonis 2). Lisaks esinevad rakus ka metallotioniinid - kõrge tsüsteiinisisaldusega valgud (Joonis 2). Metallotioniinid seovad Cu(I) ioone kõrge rakusisese vase kontsentratsioonide puhul, kuid madala vasesisalduse korral annavad Cu(I) ioone SOD1-le (12,13).



Liigse vase eemaldamine rakkudest toimub ATP7A ja ATP7B membraansete transporterite vahendusel. Samas, nad võimaldavad ka Cu ülekandmist sekretoorse raja Cu-sõltuvatele ensüümidele ((14), Joonis 2). Nii, metalleerib ATP7A trans-Golgi võrgustikus türosinaasi (15), peptidüüli- $\alpha$ -monooksügenaasi (PAM) (16), aminooksüdaas-3-e (AOC3) (5) ja lüsüülöksüdaasi (LOX) (17). ATP7A ekspresseeritakse keha enamikus organites. Omakorda, ATP7B valku ekspresseeritakse peamiselt maksas ja peaaigus (14), kus ta metalleerib vasega tseruloplasmiini (CP), mis mängib olulist rolli raua metabolismis ja vase eritumises organismist (14,18). ATP7B üheks põhiliseks funktsiooniks hepatotsüütides on Cu eksport sappi, mille tulemusena väljub vask kehast väljaheitega (14). Vase väike osa eritub koos sülje ja uriiniga (8).



**Joonis 2.** Vase metabolism raku. Cu(II) redutseeritakse raku pinnal asuvate STEAP perekonna metalloreduktaaside abil Cu(I) ioonideks, mis sisenevad raku CTR1 vase transporterite kaudu. Raku tsütosoolis seostub Cu(I) GSH, vase šaperoonide Cox17, CCS ja ATOX1-ga, mis suunavad Cu(I) ioone oma sihtmärk ensüümidele. Metallotioneiinid seovad Cu(I) ja mängivad vase varu rolli. Vase ekspordi eest vastutavad ATP7A ja ATP7B asuvad trans-Golgis, kus nad metalleerivad sekreteeritavaid valke (SecPr). Liigset vaske saab rakk hoida ka spetsiaalsetes vesiikulites. Kohandatud (19).

Cu metabolism on väga oluline inimese organismi funktsioneerimiseks ja arenguks (1). Vase soovitatav päevane tarbimine jääb vahemikku 0.9–1.5 mg, aga see varieerub sõltuvalt inimese dieedist. Keskmiselt sisaldab täiskasvanud inimese organism umbes 75–100 mg vaske (20,21). Suurimad Cu kontsentratsioonid leitakse peamiselt lihaskoes ja luudes, vaske on palju ka maksas, neerudes, südames, ajus ja veres (20).

Cu homöostaasi häired ja selle üleliigne või puudulik tarbimine dieediga viivad mitmete patoloogiliste seisundite tekkele (20). Kõige tähtsamateks Cu metabolismi häireteks peetakse Menkesi (MNKT) ja Wilsoni tõbe (WT) (14). MNKT on seotud kaasasündinud vase puudusega ning selle põhjuseks on mutatsioonid ATP7A valku kodeerivas geenis. MNKT puhul ei sattu piisavalt Cu verre ja kudedesse (22). Häiritud vase transport ajju ja teistesse organitesse põhjustab lastel tõsiseid neuroloogilisi ja sidekoe probleeme ning arenguhäired, mille tagajärjel enamik patsientidest sureb ühe kuni kolme aasta vanuses (14,23). Vase homöostaas on häiritud ka Alzheimeri tõve, ülekaalulisuse ja vähi korral (21,24,25).

Intensiivsete uuringute käigus leitakse, et vasel on üha rohkem uusi rolle organismis, mis stimuleerib vase tähtsust edasi uurima (1,19).

### 1.1.1 Wilsoni tõbi

WT on autosomaalne retsessiivne pärilik haigus, mis on põhjustatud mutatsioonidest ATP7B valku kodeerivas geenis, ning on iseloomustatud vase kuhjumisega mitmetes organites, eriti maksas, ajus ja sarvkestas (26). WT on üsna haruldane haigus, mille esinemissagedus on üks 29-40 tuhandest sünnist (27). Biopankade abil saab teostada genotüüp-fenotüüp uuringuid, mille tulemusena saab identifitseerida potentsiaalseid patsiente ning hinnata haiguse sagedust. Hiljutises uuringus Eestis analüüsiti 210'000 geenidoonori andmeid, mille hulgast genotüübi järgi tuvastati 17 inimest, kellel on kõrge risk WT tekkeks. Kõikidel nendel isikutel esinesid WT-le iseloomulikud sümptomid nagu madal CP ja Cu tase ning enamikul ka varajase või hilise faasi neurodegeneratsioon (28).

WT puhul ei eritu vask sapiga ning põhjustab organismis kuhjumise tõttu maksa- ja neuroloogilisi sümptomeid (14). Sappi eristumise eest vastutaval valgul ATP7B-I on kaheksa transmembraanet segmenti, kuus vaske siduvat domeeni N-terminaalses osas, transmembraanne kationikanal, kaks domeeni fosforüülimise piirkonnas: transduktsioonidomeen ja ATP-d siduv domeen (29,30) Häiritud funktsiooni tõttu ei ole ATP7B võimeline transportima Cu sekretorsesse rajasse ja seal metalleerima CP-d. Seega WT puhul on CP sisaldus veres vähenenud ning seda kasutatakse üheks WT diagnoosimise testiks (31).

WT kliinilised sümptomid sõltuvad mutatsiooni tüübist ATP7B transporteris ja ka valgu osast, kus see mutatsioon asub. Lisaks mõjutavad haiguse kulgu ja sümptomeid ka geneetiline taust ja keskkonna faktorid (31–33). Hilinenud WT avastamise puhul tekivad patsientidel maksas morfoloogilised muutused ja põletikud, mis viivad ägeda hepatiidi, tsirroosi ja lõpuks maksapuudulikkuseni (34). Kesknärvisüsteemis toimub liigse vase kuhjumise tagajärjel ajukoore, väikeaju ja taalamuse närvirakkude hävimine. WT kõige levinumad sümptomid on värinad, kõnehäired, depression, hüperaktiivsus, paranoiline psühhoos ja ka silma sarvkestas Kayser-Fleischeri (K–F) rõngaste esinemine, mis koosnevad vase kompleksidest (35).

WT-ga seotud kerge maksahaiguse algstaadiumis lisatakse toidule tsinki (atsetaadi või sulfaadi soolade kujul) ja kasutatakse madalat vaske sisaldavat dieeti. Edasiarenenud WT ravitakse kelaateraapia abil, mille eesmärgiks on viia liigne vask organismist välja (8). Kelaateerimisteraapias kasutatavate ainete hulka kuuluvad D-penitsillamiin (PA), dimerkaptopropanool (2,3-propaan-1-ool), trietüleentetramiin divesinikloriid (TR) ja ammooniumtetratiomolüüdaat (TTM) (8,35,36). Zn(II) soolade mõju seisneb nii metallotioneini indutseerimises, kui ka Cu soolestikust imendumise pärssimises (8,35). Maksa põletiku viimase staadiumi, ehk maksatsirroosi, korral siirdatakse patsiendile doonormaks (35,37).

## 1.2 Vase mõju tsütoskeletile

WT ja liigse vase rakulise kuhjumise puhul leiti, et rakud muudavad oma morfoloogiat ja ka metaboolset regulatsiooni (38,39). Liigne vask kutsub esile morfoloogilisi muutusi hematopoeetilistes tüvi- ja eellasrakkudes, mis viib muutustele nende proliferatsiooni tasemes ja rakutsükliks, näiteks väheneb rakkude arv G2/M faasis (40). Samu täheldakse morfoloogilisi muutusi hiire preadipotsüütide (3T3-L1) mudelis, mis muutuvad diferentseerumisel rasvkoerakkudeks, ehk adipotsüütideks. Kui nendes rakkudes puudub täielikult Cu ekskretsioonivõime ning Cu ladestub rakkudes, siis pikeneb nende proliferatsiooni aeg ning adipogenees on häiritud (41). WT korral

esineb hiirtel hepatotsüütide nekroos, rakkude tuumad on märgatavalt suurenenud ja kaotavad oma kuju. Samuti toimuvad hepatotsüütides muutused mitokondrite kujus, mis on tingitud Cu akumulatsioonist hiirte maksas (42). Cu lisamisel rikutakse rottide hipokampuse neuronites  $\beta$ -tubuliini ja F-aktiini struktuur, mis viitab sellele, et liigne vask hävitab dendriitide struktuuri. Samuti on näidatud, et Cu kelateerimine vähendab dendriitides F-aktiini sisaldust. Lisaks sellele on immunofluorestsentsmikroskoopia abil tõestatud, et Cu pärsib  $\beta$ -tubuliini fluorestsentsuse signaali, samal ajal kui Zn seda tõstab (43). Hiirtel on leitud, et WT korral aju postnataalse perioodi ajal põhjustab ATP7B inaktiveerimine tsütoskeleti struktuuri muutusi soonpõimikus, mõjutades seeläbi vase ATP7A transporterit. ATP7A ei suuda enam Cu liikvorisse transportida, mille tulemusena tekib vasepuudus ajus ja lipiidide ainevahetuse häired (38). Kõik need avastused viitavad liigse Cu ja tsütoskeleti elementide omavahelisele seosele, mis vajab edasist uurimist.

### 1.3 Tsütoskelett

Tsütoskelett asub rakkude tsütoplasmas ja kujutab endast omavahel ühendatud valgukiudude komplekset dünaamilist võrgustikku. Tsütoskelett vastutab rakkude liikumise, raku kuju muutumise, vormi kujundamise, järjepidevate mehaaniliste ühenduste reguleerimise ja rakusisese transpordi eest (44,45). Tsütoskeleti kolm põhikomponenti on F-aktiin, mikrotoruksed (MT-d) ja vahepealsed filamendid (IF). Need filamendid moodustavad võrgustikke, mis on kontrollitud reguleerivate valgude poolt, milleks on kattevalgud, polümeraasid, ristsidujad ja stabiliseerivad valgud. Kattevalgud peatavad filamendi kasvu, polümeraasid soodustavad filamentide kiiret kasvu, ristsidujad ja stabiliseerivad valgud tugevdavad võrgustikke ja struktuure (44).

Aktiin mängib olulist rolli tsütoskeleti moodustumises. Aktiinil on olemas kaks vormi: globulaarne G-aktiin ja filamentne F-aktiin. G-aktiin on monomeerne, F-aktiin moodustatakse G-aktiinist polümerisatsiooni käigus, mille jaoks on vaja ATP hüdrolyüsi energiat (46). F-aktiin teostab valgude komplekside transporti rakkudes ning ta osaleb ka endotsütoosis, raku jagunemises ja lihaste kokkutõmbumisel (46,47). F-aktiini struktuuriks on lindikujuline niit, mis koosneb kahest spiraalst läbimõõduga 100 Å ja massiga 1,5 kDa ühe pikkuse ühiku (Å) kohta (48). Ahelasisesed ja ahelatevahelised interaktsioonid aktiini subühikute vahel stabiliseerivad F-aktiini 11ilament (49).

MT-d on üheks tsütoskeleti põhikomponendiks ning selle struktuuri alaühikuks on  $\alpha/\beta$ -tubuliini heterodimeerid.

#### 1.3.1 Tubuliin

$\alpha/\beta$ -tubuliini heterodimeerid on MT struktuursed alaühikud, mis koosnevad ühest  $\alpha$  ja ühest  $\beta$  monomeerist (Joonis 3A).  $\alpha$ - ja  $\beta$ -tubuliini monomeerid on kodeeritud erinevate geenide poolt ja erinevad üksteisest aminohappelise järjestuse poolest (50). Inimestel on olemas 9  $\alpha$ -, kui ka  $\beta$ -tubuliini isovormi (51). Mõnedel tubuliini isovormidel on spetsiifiline ekspressioon, näiteks normaalselt ekspresseerub  $\beta$ III-tubuliini isovorm neuronites, aga seda leitakse ja kasvajat (52).  $\beta$ II-tubuliin on olemas neuriitides (53), samas asuvad teised isovormid spermatoosoidides ja trombotsüütides.  $\alpha$ 1A ja  $\beta$ I-tubuliinide isovormid ekspresseeritakse kõikjal (51,54,55). Tubuliinil on teada mitu posttranslatoorset modifikatsiooni, nagu glutamüülumine, glütsüülumine, atsetüleerimine, metüleerimine, fosforüülumine, türosineerimine ja amiinimine (56). Need modifikatsioonid mõjutavad tubuliini struktuuri ja funktsiooni.  $\alpha$ - ja  $\beta$ -tubuliini kodeerivate geenide

mutatsioonid on aju kognitiivsete funktsioonide kahjustuste põhjuseks (57). Samuti takistavad trombotsüütides  $\beta$ 1-tubuliini mutatsioonid vere hüübimist (58).

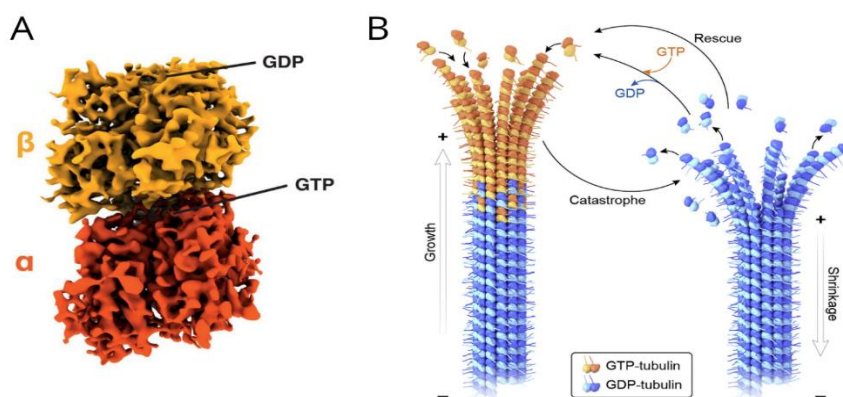
### 1.3.2 Mikrotuubulid

MT-d on tsütoskeleti komponendid, mis on olemas kõikides eukarüootsetes rakkudes. MT-d on tsütoskeleti õõnsad silinderpolümeerid, mis koosnevad 13-st protofilamendist (44). MT-d osalevad rakusiseses transpordis, rakkude migratsioonis ja jagunemises, ripsmete kujundamisel ning tsütoplasma ja kääviniidistiku moodustamisel. Kääviniidistik on oluline genoomse struktuuri jagunemisel (51,59). Samuti osalevad mikrotuubulid neuronite migratsioonis ja nende diferentseerumises (60).

MT-te moodustumine on keeruline protsess, mis toimub mitmeetaapiliselt (Joonis 3). Eialgu ühenduvad  $\alpha$ - ja  $\beta$ -tubuliini monomeerid guanosiin-5'-trifosfaadiga (GTP), moodustades  $\alpha/\beta$ -tubuliini heterodimeere (Joonis 3A), seejuures on  $\alpha$ -tubuliini monomeer seotud GTP-ga nukleotiidi sidumissaidis (N-saidis), ning see GTP ei hüdrolüüsu. Omakorda,  $\beta$ -tubuliini E-saidis seotud GTP hüdrolüüsub kiirelt guanosiin-5'-difosfaiks (GDP-ks) (60–62).  $\alpha/\beta$ -Tubuliini heterodimeerid polümeriseeruvad ja moodustavad lineaarseid protofilamente pea-saba interaktsioonide kaudu (50,60).  $\beta$ -tubuliin märgistab tuubuli (+)-otsa, ehk kasvavat otsa, kuhu lisatakse pärast järgmised subühikud ((60,63,64), Joonis 3B).

GDP-ga seotud  $\beta$ -tubuliin on ebastabiilne ja ilma stabiliseerimata võib ta põhjustada kiiret MT depolümeriseerimist, ehk katastroofi (60). Selleks et seda ei juhtuks, peab moodustuma GTP-cap, mis kujutab endast GTP-ga seotud  $\beta$ -tubuliini, kus hüdrolüüs on edasi lükatud määratatuks ajaks (65).

MT-te kasv toimub *in vitro* tingimustes aeglaselt, kuid rakus on see väga kiire protsess. *In vivo* MT-te kasv on hõlbustatud tänu organiseerimiskeskustele (MTOC-s) (66,67), kus mikrotuubulid koonduvad. Tavaliselt on see keskus tsentrosomaalne, kuid mitokondritesse või ka Golgi aparati hakkavad kogunema mittesentrosomaalselt mitteradiaalsed mikrotuubulid (68). MTOC-s leidub  $\gamma$ -tubuliini ja see on osa  $\gamma$ -tubuliini tsükli kompleksist ( $\gamma$ -TuRC), mis moodustab MT-te tuumad ja 13 protofilamendi struktuuri ja reguleerib MT-te kasvu (66,69).



**Joonis 3.** (A)  $\alpha/\beta$ -tubuliini dimeer on seotud GTP ja GDP struktuuritega (kohandatud (70)) ja (B) MT-te kasv ja kahanemine (kohandatud (51)).

## 2 Käesoleva töö eesmärgid

- 1) Uurida  $\alpha/\beta$ -tubuliini heterodimeeri interaktsiooni Cu(I)ioonidega kasutades LC-ICP MS-i ja natiivset geelelektroforeesi;
- 2) Uurida kuidas mõjutab Cu(I)ioonide sidumine  $\alpha/\beta$ -tubuliini oligomerisatsiooni;
- 3) Määrata  $\alpha/\beta$ -tubuliin – Cu(I) kompleksi sidumiskonstant DTT-ga konkureerimise tingimustes kasutades LC-ICP MS meetodit.

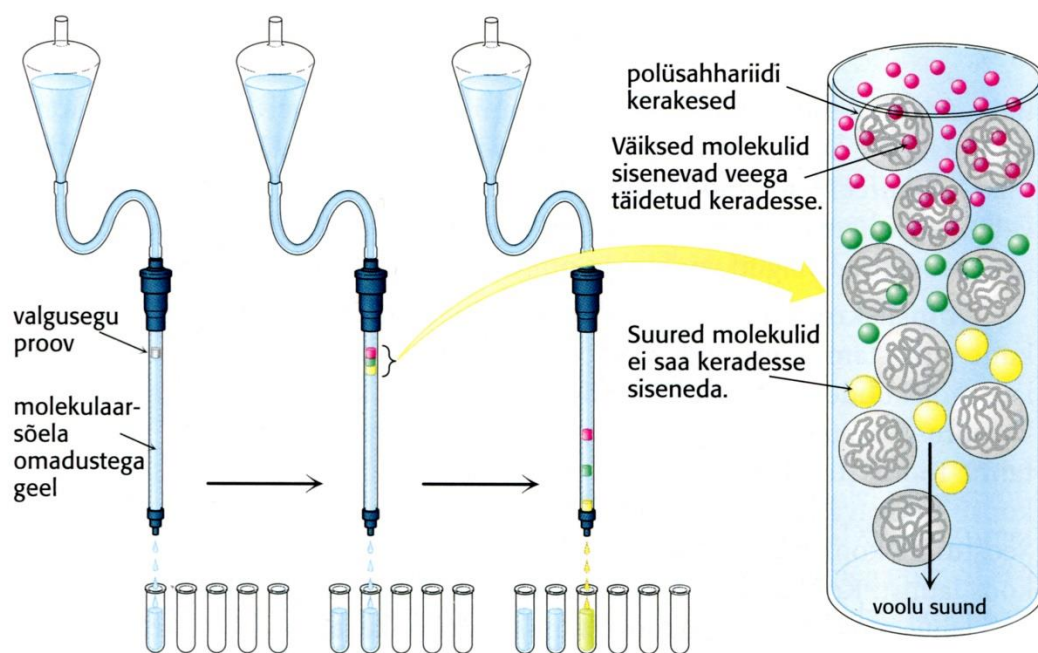
## 3 Materjalid ja meetodid

### 3.1 Teoreetiline kirjeldus

#### 3.1.1 Eksklusioonkromatograafia

Eksklusioonkromatograafia ehk suuruseralduskromatograafia (SEK) ehk geelfiltratsioon on vedelikromatograafia meetod, mis lahutab molekulid suuruse alusel. SEK peamine kasutuala on kompleksete makromolekulide segude lahutamine, sealhulgas valkude ja polümeeride analüüsimiseks (71). SEK-i molekulide lahutamiseks kasutatakse kindla suurusega pooridega statsionaarset faasi, näiteks Superdex või Sephadex. Suured molekulid, mis ei mahu statsionaarse faasi (kolonni maatriksi) pooridesse, väljuvad esimesena, samal ajal kui väiksemad molekulid mahuvad pooridesse erineval määral ning elueeruvad vastavalt nende suurusele ((72), Joonis 4). Valkude tuvastamiseks on kromatograafia süsteemi ühendatud UV-detektor või spektrofotomeeter, millega mõõdetakse valguse neeldumist aminohappe trüptofaani poolt lainepikkusel 280 nm (A280) (73). Iga eristatav piik kromatogrammis vastab ainulaadsele komponendile, mille kolonn lahutab, ja kõvera alune pindala vastab kolonnist elueeritud ühendi kogusele. Oluline on märkida, et üks piik võib sisaldada ka rohkem kui ühte valku; seetõttu võib olla vajalik elueeritud fraktsioonide edasine analüüs, näiteks geelelektroforeesi või massispektromeetria abil (74).

Liikuvaks faasiks SEK-is kasutatakse puhverlahuseid, mis aitavad vähendada interaktsioone statsionaarse faasi ja analüüdi vahel (75) ja mille valik sõltub eksperimendi ja analüüsitava aine tüübist.



Joonis 4. Eksklusioonkromatograafia meetod ja valgusegu lahutamine. Kohandatud (72).

### 3.1.2 Massispektromeetria

Massispektromeetria võimaldab määrata erinevate molekulide, sealhulgas valkude, täpset massi. Massispektromeeter koosneb tavaliselt kolmest põhiosast: ioonillikast, massianalüsaatorist ja detektorist. Ioonillikas muudab proovi molekulid gaasifaasi ioonideks, massianalüsaator eraldab need ioonid nende massi ja laengu suhte alusel. Detektor registreerib ioonide arvu iga  $m/z$  väärtuse juures (76).

Massispektromeetria võimaldab uurida raku täpset valgukoostist ja hinnata organellide valguvaru. See meetod areneb kiiresti ja annab palju parema ülevaadet proteoomist, võrreldes näiteks kahedimensionaalse geelelektroforeesiga (77).

Katse planeerimisel on oluline arvestada seadme tüüpi, analüüsi eesmärki, ionisatsiooni meetodit, mis konkreetse proovi jaoks kõige paremini sobivad (76).

### 3.1.3 ICP MS

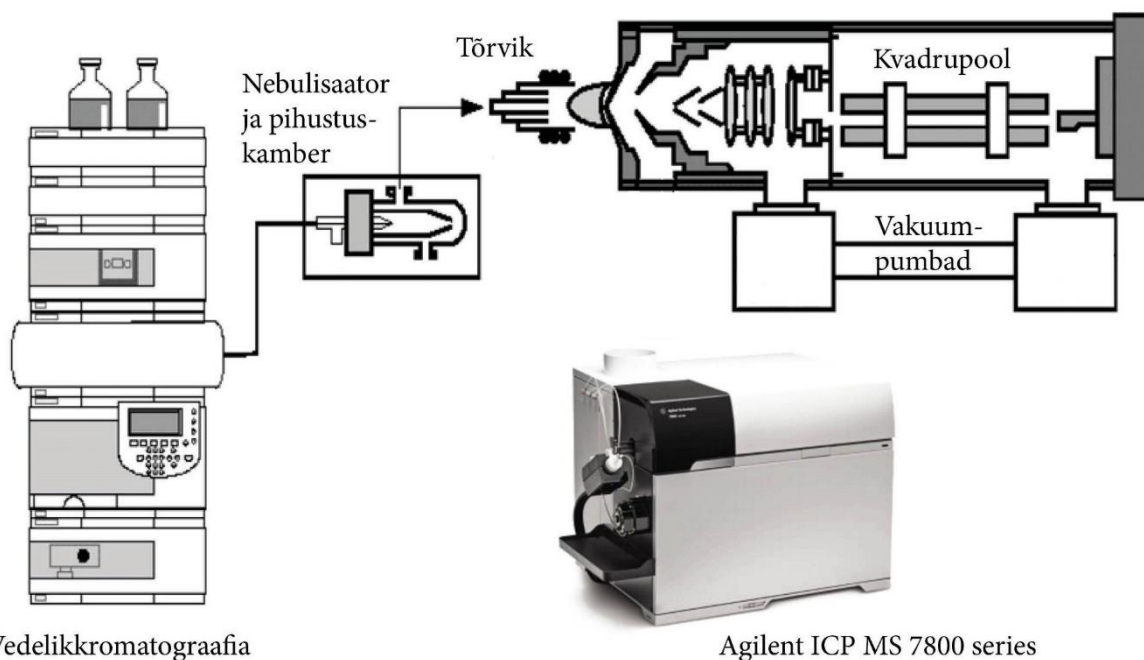
ICP MS ehk induktiivsidestatud plasma massispektromeetria on massispektromeetria eritüüp, mis kasutab proovi ioniseerimiseks induktiivselt sidestatud plasmast. Võrreldes aatomiabsorptsioonispektromeetriaga on see meetod palju tõhusam. Proovide ettevalmistamine ICP MS jaoks on vähenõudlik ja aegasäästev. ICP MS on üsna suure läbilaskevõimega. Kvadrupool ICP MS koosneb proovide süstimise osast, induktiivsidestatud plasmast (ICP), ioonoptikast, massianalüsaatorist ja detektorist (Joonis 4). ICP MS analüüs algab vedelate proovide sattumisest pihusti kaudu pihustuskabrisse, kus tekib peen aerosool. See aerosool suunatakse seejärel läbi tõrviku argooni plasmasse, kus proov atomiseeritakse ja ioniseeritakse. Tekkinud ioonid suunatakse ioonoptika kaudu analüsaatorisse. Massianalüsaatoris eraldatakse ioonid vastavalt nende massi ja laengu suhtele ( $m/z$ ), misjärel mõõdab detektor ioonide arvu (78).

Omas töös kasutasin ICP MS meetodikat erinevate valkudega või madalmolekulaarsete ligandidega seotud metallide määramiseks. Antud töös kasutati vedelikkromatograafia ja ICP MS kombinatsiooni sarnaselt varasemalt väljatöötatud meetodile (79).

#### 3.1.3.1 LC-ICP MS

Vedelikkromatograafia (LC) kombinatsioon ICP MS-iga (Joonis 5) pakub atraktiivseid võimalusi proovide analüüsiks ning sellel meetodil on mitmeid kasutamisevõimalusi proteoomikas. Lisaks metalloproteiinide lahutamisele ja identifitseerimisele kompleksetest bioloogilistest proovidest (80,81) on võimalik uurida ka valk-metall interaktsioone (79). Lahutamismeetodeid on erinevaid, kuid laialdaselt on kasutuses SEK (75). SEK-i kombinatsiooni ICP MS-ga kasutades võib määrata valkude vase sidumiskonstante tänu võimalusele lahutada kõrg- ja madalmolekulaarseid fraktsioone samaaegselt määrates metallide isotope eluaadist (82).

LC-ICP MS kasutamisel on aga ka puudusi, sest liikuvast faasis sisalduvad soolad või orgaanilised lahustid võivad põhjustada tundlikkuse muutumist (83).



Joonis 5. LC-ICP MS süsteemi skeemaatiline kirjeldus ja kasutatud apparaadi pilt. Kohandatud (84).

### 3.1.4 Natiivne geelelektroforees

Natiivne geelelektroforees on tehnika valkude analüüsimiseks. Natiivne geelelektroforees eraldab valke või nukleiinhappeid natiivsetel tingimustel, kõrgemat järku molekulide struktuuri säilitades, mistõttu võib lahutada mitte ainult monomeerseid molekule, vaid ka dimeersed ja oligomeersed komplekse (85).

Elektroforees kujutab endast iooni liikumist elektriväljas. Elektroforees viiakse läbi geelis, näiteks polüakrüülamiidgeelis (PAGE). Elektroforeetilisel eraldatava valguga liikumiskiirus sõltub peamiselt tema suurusest, kuid samuti ka üldisest laengust, tema kujust ja ka elektrivälja tugevusest. Geeli pooridega võrreldes väiksemad molekulid läbivad geeli kiiresti, keskmise suurusega molekulide liikumine sõltub nende suurusest ja laengust, ning geeli pooridest tunduvalt suuremad valgud ei liigu peaaegu üldse. Kuna natiivse geelelektroforeesi puhul puudub naatriumdodetsüülsulfaat (SDS), mis annab valkudele ühtlase negatiivse laengu ning denatureerivad tingimused, siis valkude negatiivset laengut tagatakse elektroforeesilahuse pH abil, mille tõttu võivad valgud liikuda katodilt anodile (72).

### 3.1.5 Transmissioonelektronmikroskoopia

Transmissioonelektronmikroskoopia (TEM) on mikroskoopia tehnika, mis annab tahketest ainetest kõrge eraldusvõimega pilte. Seda meetodit kasutatakse organellide ultrastruktuuri ning valkude fibrillatsioonide ja aggregatsioonide uurimiseks (86,87). TEM-i negatiivse värvimise meetodit kasutatakse bioloogiliste struktuuride, polümeeriseerunud kolloidide, pehmete nanomaterjalide



uurimiseks ning bakterirakkude suuruse, struktuuri ja kuju suure eraldusvõimega visualiseerimiseks (88,89).

Sydney Brenner ja Bob Horne töötasid välja TEM-i negatiivse värvimise tehnikat 1959. aastal. Tehnika seisneb selles, et esialgu valmistatakse ette raskmetalle sisaldav amorfne või klaasjas kiht, millele järgneb selle töötlus ja kuivatamine ning uuritav materjal asetatakse ja fikseeritakse maatriksile. Elektronid läbivad väga õhukese objekti ja hajuvad kogu bioloogilise objekti ja kihi ulatuses, tekitades TEM-i väljavõtte (90).

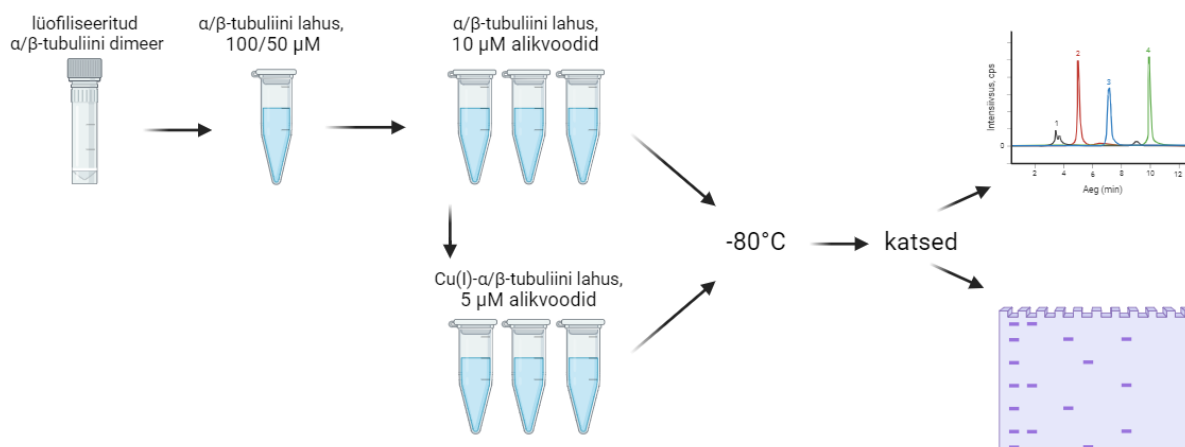
## 3.2 Eksperimentaalse töö kirjeldus

### 3.2.1 Kasutatud reagentid

Ammooniumpersulfaat (APS) (Sigma-Aldrich, 248614), N,N,N',N'-tetrametüül-etüleendiamiin (TEMED) (Sigma, T-8133), N,N'-metüleenebis(akrülamiid) (Sigma-Aldrich, 146072), akrülamiid (Sigma, A8887), veise seerumi albumin (Sigma, A2153), ovalbumiin (Sigma, A5503), ammooniumatsetaat (Fluka, 09690), Chelex 100 (BioRad, 1422822), ammooniumhüdrokksiid (Honeywell, UN2672).

### 3.2.2 $\alpha/\beta$ -tubuliini varulahuse ettevalmistamine ja säilitamine

Lüofiliseeritud sea aju  $\alpha/\beta$ -tubuliini heterodimeeri pulber telliti firmast Cytoskeleton (Cytoskeleton, Inc., Denver, USA; T240). Pulber lahustati puhvris (50 mM ammooniumatsetaat, pH 7.5), et saada 100  $\mu\text{M}$  kontsentratsiooniga varulahus. Hilisemates katsetes kasutati 50  $\mu\text{M}$  tubuliini kontsentratsiooniga varulahust selleks et vähendada valgu agregeerumist (tõestatud natiivse geelelektroforeesi abil, andmed pole näidatud käesolevas töös). Sama puhvrit kasutati kõikides katsetes, kui ei ole märgitud teisiti. Varulahusest tehti alikvoote, mida säilitati  $-80^\circ\text{C}$  juures.



**Joonis 6.**  $\text{Cu(I)-}\alpha/\beta$ -tubuliini oligomeeride ja  $\alpha/\beta$ -tubuliini dimeeri lahuste ettevalmistamise skeem. Loodud BioRender programmi abil.

$\text{Cu(I)-}\alpha/\beta$ -tubuliini agregaatide 5  $\mu\text{M}$  töölahuse valmistati nagu kirjeldatud peatükis 4.6. Seejärel tehti alikvoote (10-20  $\mu\text{L}$ ) ja säilitati need  $-80^\circ\text{C}$  juures. Lahuste valmistamise skeem on näidatud joonisel 6. Katsetes kasutatud alikvoodeid sulatati jää peal.

### 3.2.3 Cu(I) ja Zn(II) sidumise uurimine tubuliini dimeeri ja oligomeeridega kasutades LC-ICP MS meetodit

LC-ICP MS analüüsi jaoks ühendati Agilent Technologies (Santa Clara, USA) Infinity HPLC süsteem Agilent ICP-7800 (Agilent, USA) aparaadiga. Agilent HPLC süsteem koosnes 1260 seeria  $\mu$ -degasaatorist, 1200 seeria kapillaarpumbast, Micro WPS autosamplerist ja 1200 seeria MWD VL detektorist. Valkude detekteerimiseks kasutati lainepikkust 280 nm. ICP MS tingimused olid järgmised: RF võimsus 1550 W, nebulisaatori gaasivool 1,03 l/min, lisagaasi vool 0,90 l/min, plasmagaasi vool 15 l/min, pihusti tüüp: MicroMist, jälgitud isotoobid:  $^{63}\text{Cu}$ ,  $^{66}\text{Zn}$ ,  $^{56}\text{Fe}$ . Puhvri demetalleerimiseks kasutati Chelex 100 eelkolonni. LC opereerimiseks kasutati Agilent Chemstation tarkvara ning ICP MS puhul kasutati ICP-MS MassHunter 4.4 C.01.04 tarkvara. Andmete töötlemiseks ja visualiseerimiseks kasutati programmi OriginPro 8.5 (OriginLab).

Selleks, et uurida kuidas tubuliin seob metallioone, lisati 2  $\mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -tubuliini dimeerile 1 ekvivalent Cu(II) ja Zn(II) ioone 1 mM DTT juuresolekul ning inkubeeriti lahust 15 minutit 25°C juures. Tubuliini dimeeri ja oligomeeride lahutamiseks kasutati Superdex 200 10/300 GL kolonni (pikkus 30 cm, sisemine diameeter 10 mm, osakese suurus 8.6  $\mu\text{M}$ , lahutuspiirkond 10-600 kDa), elueerimispuhvriks kasutati 150 mM ammoniumatsetaati, pH 7.4 voolukiirusel 0.4 ml/min. Proovi süstimisruumala oli 40  $\mu\text{l}$ .

### 3.2.4 $\alpha/\beta$ -tubuliini oligomeeride struktuuri uurimine TEM abil

$\alpha/\beta$ -tubuliini oligomeeride struktuuri uurimiseks saadeti proovid Tartu Molekulaar- ja rakubioloogia instituudi TEM-i laboratooriumisse (Riia 23, Tartu). Oligomeeride tekitamiseks lisati 10  $\mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -tubuliinile 20 ekvivalent Cu(II) ioone 1 mM DTT juuresolekul ning inkubeeriti proovi 30 min 25°C juures. Võrdluseks kasutati  $\alpha/\beta$ -tubuliini ilma metallide lisamiseta (10  $\mu\text{M}$  apo- $\alpha/\beta$ -tubuliini dimeer). Proovid transporditi 0°C juures.

### 3.2.5 $\alpha/\beta$ -tubuliini oligomerisatsiooni uurimine uurimine Cu(I) juuresolekul kasutades LC-ICP MS meetodit

Selleks et uurida Cu(I) indutseeritud  $\alpha/\beta$ -tubuliini oligomerisatsiooni, lisati 2  $\mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -tubuliini dimeerile 1 ekvivalent Cu(II) ioone 1 mM DTT juuresolekul ning inkubeeriti segu 2 min, 15 min ja 30 min jooksul 25°C juures. Tubuliini dimeeri ja agregaatide lahutamiseks kasutati Superdex 200 10/300 GL kolonni ning elueerimispuhvriks kasutati 150 mM ammoniumatsetaati, pH 7.4, kuhu lisati 0.5 mM DTT. Voolukiirus oli 0.4 ml/min ning proovi süstimisruumala oli 40  $\mu\text{l}$ .

Selleks et jälgida pikemalt Cu(I)-indutseeritud  $\alpha/\beta$ -tubuliini oligomeeride teket, kasutati väikest isepakitud Sephadex G-25 kolonni (1 ml). 2  $\mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -tubuliini dimeerile lisati 1 ekvivalent Cu(II) 1 mM DTT juuresolekul ning inkubeeriti 3.5 tundi toatemperatuuril. Ajapunktid võeti 15 min ja seejärel iga 30 min tagant. Kromatograafias kasutatud puhver ja tingimused olid samad välja arvatud proovi süstimisruumala, mis oli 10  $\mu\text{l}$ .

Mõlemas katses kasutatud ICP tingimused olid samad nagu kirjeldatud eelpool. Jälgiti  $^{63}\text{Cu}$  isotoopi.

### **3.2.6 Cu(I)- $\alpha/\beta$ -tubuliini-oligomeeride ettevalmistamine ning demetalleerimise kineetika uurimine DTT juuresolekul**

Cu(I)- $\alpha/\beta$ -tubuliini oligomeeride valmistamiseks inkubeeriti 5  $\mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -tubuliini dimeeri Cu(II) ioonidega 1 mM DTT juuresolekul 24 tunni jooksul 25°C juures ning alikvooditi nagu kirjeldatud peatükis 4.2. Iga katse jaoks kasutati uut alikvooti. Cu(I)- $\alpha/\beta$ -tubuliini oligomeeride olemasolu kontrolliti kasutades Superdex 200 10/300 GL kolonni eelpool kirjeldatud tingimustega ning natiivset geelektroforeesi (8% AA/bisAA geel, proovid segati 1:1 2x natiivse foreesi laadimispuhvriga ilma kuumutamiseta, kasutati elektrivoolu 150 mA, ning katse teostati BioRad aparatuuriga. Valgud visualiseeriti kasutades Coomassie Brilliant blue värvi).

Cu(I)- $\alpha/\beta$ -tubuliini oligomeeride demetalleerimise kineetika uurimiseks lisati 2  $\mu\text{M}$  Cu(I)- $\alpha/\beta$ -tubuliini oligomeeridele DTT-d 50 mM ja 100 mM kontsentratsioonides ning inkubeeriti segu 25°C juures kuni 3 tundi. Kineetika jälgimiseks kasutati Sephadex G-25 (1 ml) kolonni eelpoolmainitud tingimustes. Piikide analüüsiks kasutati Peak Analyzer funktsiooni OriginPro 8.5 programmis. Tulemused visualiseeriti kasutades OriginPro 8.5 programmi.

### **3.2.7 $\alpha/\beta$ -tubuliini oligomeeride dissotsiatsioonikonstandi määramine**

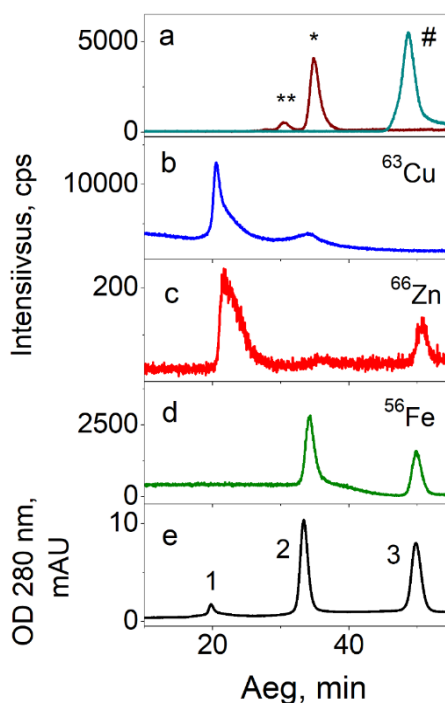
Cu(I)- $\alpha/\beta$ -tubuliini oligomeeride dissotsiatsioonikonstandi ( $K_D$ ) määramiseks inkubeeriti 2  $\mu\text{M}$  Cu(I)- $\alpha/\beta$ -tubuliini oligomeere 3 tundi 25°C juures erinevate DTT kontsentratsioonidega (1-200 mM). Kõrgmolekulaarsete ja madalamolekulaarsete fraktsioonide lahutamiseks kasutati Sephadex G-25 (1 ml) kolonni eelpoolmainitud tingimustes. Piikide analüüsiks kasutati Peak Analyzer funktsiooni OriginPro 8.5 programmis.

Cu(I)- $\alpha/\beta$ -Tubuliini oligomeeride  $K_D$  määramiseks tehti graafik, kus on näidatud Cu(I)- $\alpha/\beta$ -tubuliini oligomeeride protsendiline koostis sõltuvuses DTT kontsentratsioonist. Andmete analüüsiks ja visualiseerimiseks kasutati OriginPro 8.5 programmi.

## 4 Tulemused

### 4.1 Cu(I) ja Zn(II) seovad $\alpha/\beta$ -tubuliini oligomeeridega, kuid mitte dimeeriga

Selleks, et vaadata kuidas vask ja tsink seostuvad tubuliiniga, lisati nimetatud metallioone tubuliinile 1 ekvivalendi koguses DTT juuresolekul ning proov lahutati Superdex 200 10/300 GL (10–600 kDa) kolonnis. Kolonni kalibreerimiseks kasutati CuHSA ja CuEDTA proove. HSA on esindatud kahe piigiga - monomeeri ja dimeerina (66 kDa ja 132 kDa vastavalt) (Joonis 7, a). CuEDTA kompleksi molekulmass on 397.74 kDa. Valgu absorptsiooni detekteeriti 280 nm juures ja metallide isotoope  $^{63}\text{Cu}$ ,  $^{66}\text{Zn}$  ja  $^{56}\text{Fe}$  jälgiti ICP-MS-i abil. Katse tulemusena selgus, et mõlemad  $^{63}\text{Cu}$  ja  $^{66}\text{Zn}$  seostuvad  $\alpha/\beta$ -tubuliini oligomeeridega (Joonis 7, b, c), kuid Zn(II) sidumine tubuliini oligomeeridega toimub palju madalamal tasemel võrreldes Cu(I) ioonidega. Seevastu, ainult väga väike osa nendest metallidest on seotud dimeeriga, ning monomeerne  $\alpha/\beta$ -tubuliin kromatogrammis ei esine. 280 nm juures on peamine tubuliini vorm  $\alpha/\beta$ -tubuliini heterodimer.  $^{56}\text{Fe}$  leidub kromatograafia süsteemis kuna meie süsteem pole metallivaba, ning võib seostuda valkudega millel on sellele afiinsus.  $^{56}\text{Fe}$  oli samuti jälgimise all ning leiti et see on seotud  $\alpha/\beta$ -tubuliini dimeeriga (Joonis 7, d). 280 nm kromatogrammis (Joonis 7, e) ning raua ja tsingi ICP kromatogrammides (Joonis 7, c, d) esineb madalamolekulaarne piik, mis elueerub sarnaselt EDTA retensioonijale.

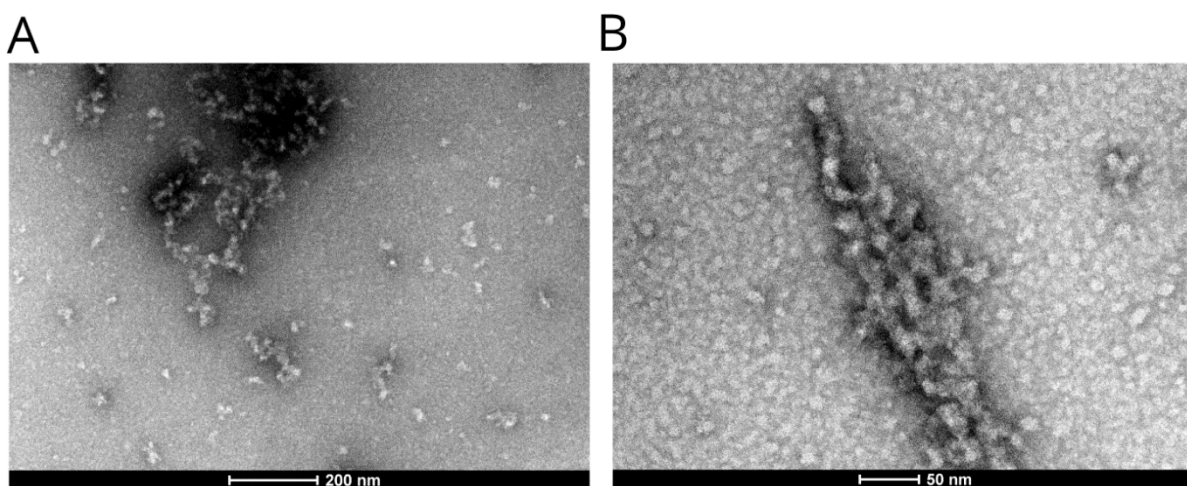


**Joonis 7.** Metallioonide sidumine  $\alpha/\beta$ -tubuliini dimeeri ja oligomeeridega. Katse tingimused: 5  $\mu\text{M}$  Cu(I)- $\alpha/\beta$ -tubuliin, 1 ekvivalent metallioone, 1 mM DTT, inkubatsiooniaeg 15 min 25°C juures. (a) - kolonni kalibreerimine kasutades CuHSA ja CuEDTA, (b) -  $^{63}\text{Cu}$  isotoobi intensiivsus; (c) -  $^{66}\text{Zn}$  isotoobi intensiivsus; (d) -  $^{56}\text{Fe}$  isotoobi intensiivsus; (e) - neelduvus 280 nm juures. Piigid: 1 -  $\alpha/\beta$ -tubuliini agregaadid; 2 -  $\alpha/\beta$ -tubuliini dimeer; \* - HSA monomeer; \*\* - HSA dimeer. Superdex 200 10/300 GL kolonn, elueerimispuhver 150 mM ammooniumatsetaat, pH 7.4; voolukiirus 0.4 ml/min; süstimisruumala 10  $\mu\text{l}$ .

## 4.2 $\alpha/\beta$ -tubuliini oligomeeride visualiseerimine TEM abil

$\alpha/\beta$ -tubuliini oligomeeride visualiseerimiseks, valmistati kaks proovi: 10  $\mu\text{M}$  apo- $\alpha/\beta$ -tubuliin ja  $\alpha/\beta$ -tubuliin inkubeeritud 25°C 30 min 20 ekvivalendi Cu(II)-ga 1 mM DTT juuresolekul selleks, et indutseerida oligomeeride teket. Proovid analüüsiti Tartu Molekulaar- ja rakubioloogia instituudis, kus need töödeldi kasutades uranüül sooladega negatiivse värvimise protokoll (Joonis 8).

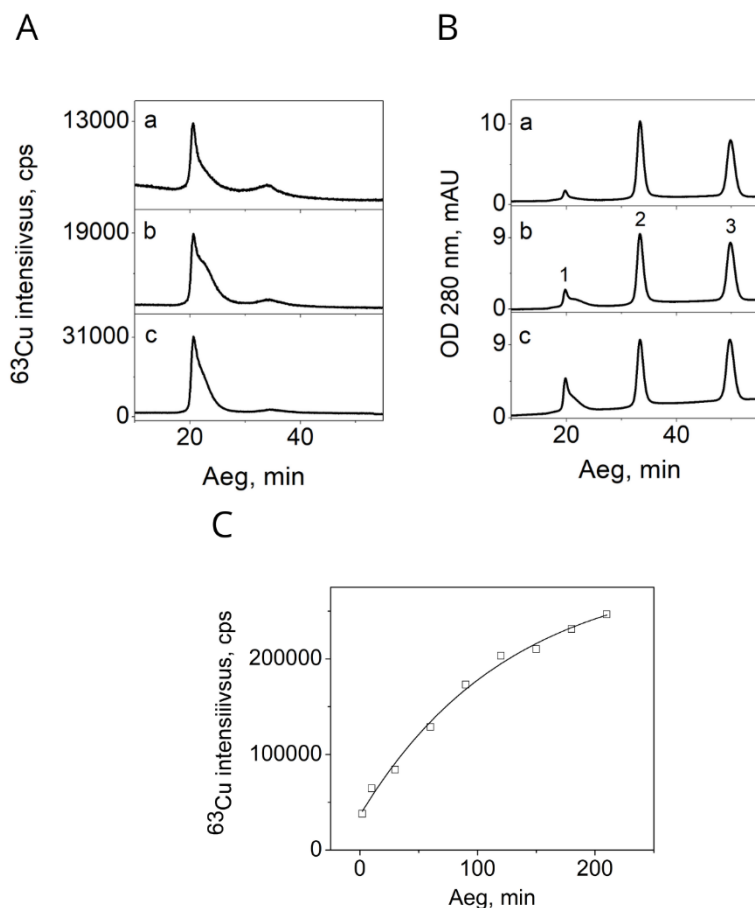
Saadud piltide analüüsidest järeldati, et vase olemasolu DTT juuresolekul soodustab ebakorrapäraste oligomeeride teket.



**Joonis 8.** TEM  $\alpha/\beta$ -tubuliini dimeeri ja oligomeeridest. (A) Negatiivselt värvitud 10  $\mu\text{M}$  apo- $\alpha/\beta$ -tubuliini dimeer, inkubeeritud 25°C juures 30 minutit. (B) Negatiivselt värvitud 10  $\mu\text{M}$  apo- $\alpha/\beta$ -tubuliin inkubeeritud 25°C juures 30 minutit 20 Cu(II) ekvivalendiga 1 mM DTT juuresolekul. Tingimused: 50 mM ammooniumatsetaat, pH 7.4.

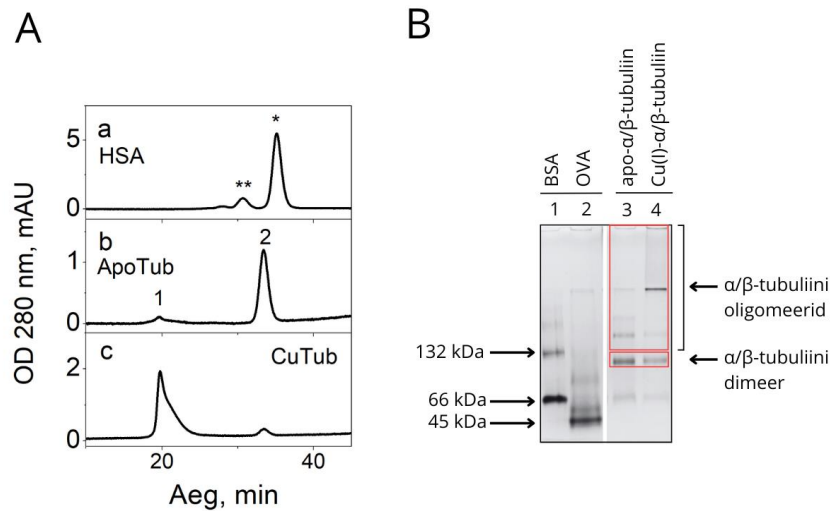
## 4.3 Cu(I) indutseerib $\alpha/\beta$ -tubuliini oligomeeride teket

Selleks et vaadata Cu(I) ionide mõju tubuliini oligomeeride tekkimisele kasutati Superdex 200 10/300 GL kolonni. Esialguses katses selgus et  $\alpha/\beta$ -tubuliini inkubeerimisel 1 ekvivalendi Cu(I)-ga suureneb Cu(I)- $\alpha/\beta$ -tubuliini oligomeeride piigi pindala ajas (Joonis 9, panel A) ning samuti ka vastava piigi pindala 280 nm juures (Joonis 9, panel B). 30 minuti pärast suurenes Cu(I)- $\alpha/\beta$ -tubuliini oligomeeride piigi pindala umbes 3,6 korda. Selleks, et jälgida Cu(I)- $\alpha/\beta$ -tubuliini oligomeeride teket pikemalt kasutati isepakitud 1 ml Sephadex G-25 kolonni, mis võimaldab lahutada kõrgmolekulaarse ja madalamolekulaarse fraktsiooni. Selle kolonniga on ühe analüüsi kestuseks 10 minutit, mis võimaldab mõõta rohkem vahepealseid ajapunkte. Cu(I)- $\alpha/\beta$ -tubuliini oligomeeride tekkimise kineetikat jälgiti 3.5 tundi jooksul (Joonis 9, C). Katse tulemusena leiti, et oligomeeri tekkimine aeglustub kolme tundi möödudes ning Cu(I)- $\alpha/\beta$ -tubuliini oligomeeride piigi pindala suureneb 3.5 tunni jooksul 6.5 korda.



**Joonis 9.** Cu(I) ionide mõju Cu(I)- $\alpha/\beta$ -tubuliini oligomeeride moodustumisele Superdex 200 10/300 GL kolonnil (A ja B) ja Sephadex G-25 kolonnil (C). (A):  $^{63}\text{Cu}$  isotoopi intensiivsus; (B): neelduvus 280 nm juures; (C): Cu(I)- $\alpha/\beta$ -tubuliini oligomeeride piigi pindala kasv ajas. Inkubeerimisaeg: (a) - 2 min, (b) - 15 min, (c) - 30 min. Tingimused: proovipuhver 50 mM ammooniumatsetaat, pH 7.5, elueerimispuhver 150 mM ammooniumatsetaat, pH 7.4; voolukiirus 0.4 ml/min.

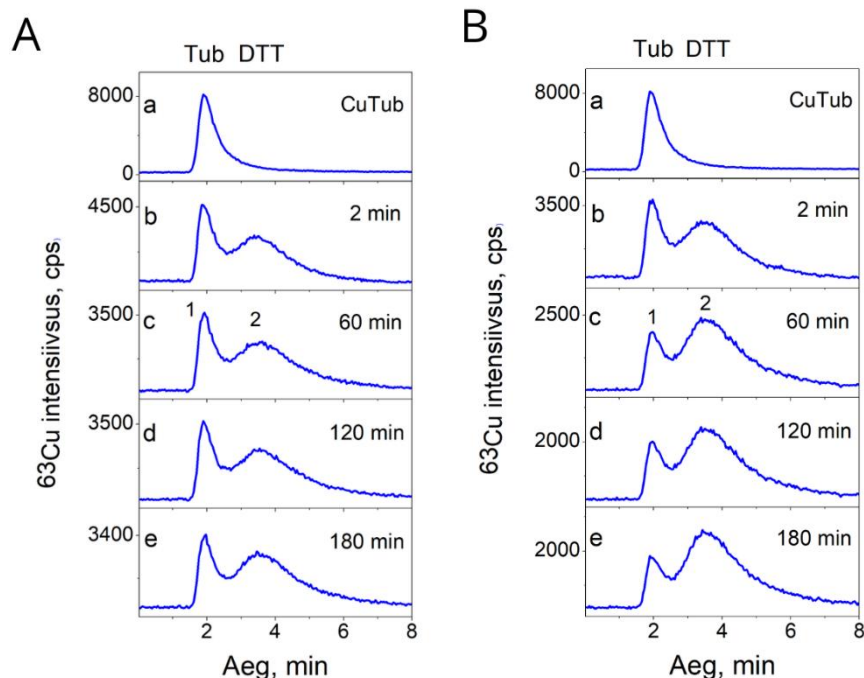
Saadud tulemuse alusel töötati välja Cu(I)- $\alpha/\beta$ -tubuliini oligomeeride tekitamise protokoll, mille järgi inkubeeriti  $\alpha/\beta$ -tubuliini 1 ekvivalendi Cu(II)-ga 1 mM DTT juuresolekul 25°C 24 tundi. Cu(I)- $\alpha/\beta$ -tubuliini oligomeeride teket kinnitati vedelikkromatograafia (Joonis 10, A) ja natiivse geelelektroforeesi (Joonis 10, B) abil. Pikaajalise inkubeerimisega  $\alpha/\beta$ -tubuliini dimeeri hulk märkimisväärselt väheneb ning peamiselt esineb piik, mis vastab Cu(I)- $\alpha/\beta$ -tubuliini oligomeeridele (Joonis 10, A, (c)). Sarnaselt vedelikkromatograafiaga väheneb ka elektroforeesil  $\alpha/\beta$ -tubuliini dimeeri hulk ning kasvab kõrgmolekulaarsete oligomeeride hulk 24 tundi inkubeeritud proovis võrreldes apo- $\alpha/\beta$ -tubuliiniga (Joonis 10, B, rajad: 3 ja 4).



**Joonis 10.** Cu(I)- $\alpha/\beta$ -tubuliini oligomeeride moodustumine. SEK 280 nm juures (A) ja natiivne PAGE (B). Paneel (A): (a) 5  $\mu$ M HSA; (b) 2  $\mu$ M apo- $\alpha/\beta$ -tubuliini dimeer; (c) 2  $\mu$ M Cu(I)- $\alpha/\beta$ -tubuliini oligomeerid pärast 24 tundi inkubeerimist. Piigid: 1 -  $\alpha/\beta$ -tubuliini oligomeerid; 2 -  $\alpha/\beta$ -tubuliini dimeer; \* - HSA monomeer; \*\* - HSA dimeer. Tingimused: proovipuhver 50 mM ammooniumatsetaat, pH 7.5, elueerimispuhver 150 mM ammooniumatsetaat, pH 7.4; kolonn Superdex 200 10/300 GL, voolukiirus 0.4 ml/min, süstimisruumala 40  $\mu$ l.

#### 4.4 Cu(I)- $\alpha/\beta$ -tubuliini oligomeeride demetalliseerimise kineetika uurimine kõrgemate DTT kontsentratsioonide juuresolekul

Cu(I)- $\alpha/\beta$ -tubuliini oligomeeride demetallatsiooni kineetikat jälgiti 50 mM (Joonis 11, A) ja 100 mM DTT (Joonis 11, B) juuresolekul 3 tunni jooksul kasutades 1 ml-st Sephadex G25 Superfine kolonni. Kõrgmolekulaarne fraktsioon, mis sisaldab Cu(I)- $\alpha/\beta$ -tubuliini oligomeere, ning madalmolekulaarne fraktsioon, mis sisaldab Cu(I)-DTT kompleksi, on üksteisest hästi lahutatud. Katse tulemusena võib järjeldada, et vahetusreaktsioon toimub kiiresti, peaaegu 2 minutiga (b), kuid aeglane Cu(I) jaotumine toimub veel mõne aja jooksul. Cu(I)- $\alpha/\beta$ -tubuliini oligomeeride kompleksi Cu(I)  $K_D$  määramise jaoks otsustati kasutada inkubatsiooni aega 3 tundi.

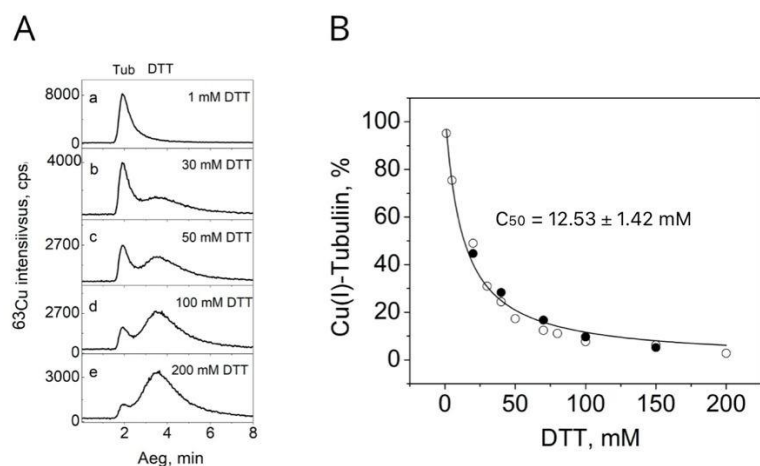


**Joonis 11.** Cu(I)- $\alpha/\beta$ -tubuliini oligomeeride demetallatsiooni kineetika 50 ja 100 mM DTT juuresolekul, mida jälgiti LC-ICP MS abil. Tingimused: 2  $\mu$ M  $\alpha/\beta$ -tubuliin, 50 (A) ja 100 (B) mM DTT; (C) inkubatsiooni puhver 50 mM ammooniumatsetaat, pH 7.5; inkubatsiooni ajad: (a) - Cu(I)- $\alpha/\beta$ -tubulini oligomeerid ilma DTT lisamata, (b) - 2 min, (c) - 60 min, (d) - 120 min, (e) - 180 min. Kolonn – 1 ml Sephadex G25 Superfine; elueerimispuhver 150 mM ammooniumatsetaat, pH 7.4; voolukiirus 0.4 ml/min; süstimisruumala 10  $\mu$ l. Jälgitud isotoop  $^{63}\text{Cu}$ .

#### 4.5 Cu(I)- $\alpha/\beta$ -tubuliini oligomeeride kompleksi dissoatsioonikonstandi määramine

Cu(I)- $\alpha/\beta$ -tubuliini oligomeeride Cu(I) afiinsuse määramiseks inkubeeriti Cu(I)- $\alpha/\beta$ -tubuliini oligomeere erinevate DTT kontsentratsioonidega (Joonis 12, A). DTT-sõltuvast demetallatsiooni tulemusest koostati graafik, kus on näidatud Cu(I)- $\alpha/\beta$ -tubuliini oligomeeride protsedilise osakaalu sõltuvus DTT kontsentratsioonist (Joonis 12, B). Kasutades hüperbooli valemit ( $y = P1 \cdot (1 - [x / (P2 + x)]) + P3$ ), leiti OriginPro 8.5 programmis  $C_{50}$  väärtuse ( $P2$ ), ehk DTT kontsentratsioon, mille juures 50% tubuliini agregate on demetalleeritud.  $C_{50}[\text{DTT}]$  võrdub  $12.53 \pm 1.42$  mM.





**Joonis 12.** Cu(I)- $\alpha/\beta$ -tubuliini oligomeeride demetalleerimine erinevate DTT kontsentratsioonide juuresolekul ja Cu(I)- $\alpha/\beta$ -tubuliini agregaatide kompleksi dissotsiatsioonikonstandi määramine. Cu(I)- $\alpha/\beta$ -tubuliini oligomeere inkubeeriti 3 tundi toatemperatuuril kasvavate DTT kontsentratsioonide juures (A);  $^{63}\text{Cu}$  suhteline sisaldus tubuliini oligomeerides erinevate DTT kontsentratsioonide puhul (B). Mustade ja valgete ringidega on kahe sõltumatu katse tulemused. Tingimused: 2  $\mu\text{M}$  Cu(I)-  $\alpha/\beta$ -tubuliin, 1-200 mM DTT; inkubatsiooni puhver 50 mM ammooniumatsetaat, pH 7.5; LC-ICP MS: kolonn - 1 ml Sephadex G25 Superfine; elueerimispuhver 150 mM ammooniumatsetaat, pH 7.4; voolukiirus 0.4 ml/min; süstimisruumala 10  $\mu\text{l}$ , jälgitud isotoop  $^{63}\text{Cu}$ .

Dissotsiatsioonikonstandi arvutamise aluseks võeti varem kasutatud meetodit (91). On teada, et  $K_D$  (DTT) =  $5.01 \times 10^{-16}$  M (92) ja  $\alpha/\beta$ -tubuliini jaoks  $C_{50}[\text{DTT}] = 12.53$  mM. Arvutades vaba vase ( $[\text{Cu(I)}]$ ) kontsentratsiooni 12.53 mM DTT juures saame Cu(I)- $\alpha/\beta$ -tubuliini oligomeeride  $K_D$  väärtuseks  $4.0 \times 10^{-20}$  M. Arvutuskäik oli järgmine:

$$[\text{Cu(I)}]_{\text{vaba}} = K_D(\text{DTT}) \times \frac{[\text{Cu(I)} - \text{DTT}]}{[\text{DTT}]_{\text{vaba}}}$$

$$[\text{DTT}]_{\text{vaba}} = C_{50}[\text{DTT}] - [\text{Cu(I)} - \text{DTT}]$$

$$[\text{DTT}]_{\text{vaba}} = 12.53 \text{ mM} - 0.001 \text{ mM} = 12.53 \text{ mM}$$

$$K_D(\text{DTT}) = 5.01 \times 10^{-16} \text{ M}$$

$$[\text{Cu(I)}]_{\text{vaba (C50)}} = 5.01 \times 10^{-16} \text{ M} \times 0.001 \text{ mM} / 12.53 \text{ mM} = 4.0 \times 10^{-20} \text{ M},$$

mis vastab  $K_D$  ([Cu(I)- $\alpha/\beta$ -tubuliini oligomeerid])

## Arutelu

Cu metabolism on inimorganismi arenguks ja toimimiseks hädavajalik (1). Cu kogus peab rakus olema rangelt reguleeritud, sest ülemäärases koguses võib vask olla organismile toksiline. WT puhul, mis on tingitud *ATP7B* geeni mutatsioonidest, koguneb Cu erinevates elundites, sealhulgas maksas ja ajus (26). WT põhiline ravi varajastes staadiumites hõlmab kelateerimisteraapiat ja Zn(II) soolade manustamist, kuid hilisemates staadiumites tsirroosi korral maksasiirdamist (8,35–37).

On näidatud, et liigne Cu toob kaasa rakkude morfoloogia ja struktuuri muutuseid. Näiteks suurenevad maksarakkude tuumad (42), muutub hematopoeetiliste tüvirakkude (93) ja preadipotsüütide morfoloogia (41), mille tulemusena nende proliferatsiooni ja diferentseerimise protsess modifitseerub. Vase kogunemine neuronites mõjutab negatiivselt F-aktiini,  $\beta$ -tubuliini ja dendriitide struktuure (43).

Tsütoskelett on raku komponent, mis säilitab raku kuju ja täidab rakus ka teisi funktsioone. Tsütoskeleti üheks komponendiks on mikrotuubilid, mis koosnevad polümeriseerunud  $\alpha/\beta$ -tubuliini heterodimeeritest (44). Oli näidatud, et Cu mõjutab tubuliini struktuuri (43), kuid pole veel üksikasjalikult uuritud kas see toimub otsese sidumise tulemusena. Seega, käesoleva töö eesmärgiks oli uurida Cu(I) ionide seondumist  $\alpha/\beta$ -tubuliini heterodimeeriga ning teha kindlaks kui tugevasti on vask seotud Cu(I)- $\alpha/\beta$ -tubuliini oligomeeridega kasutades LC-ICP MS metoodikat.

Käesolevas töös kasutati  $\alpha/\beta$ -tubuliini heterodimeeri. Esialgu uuriti  $\alpha/\beta$ -tubuliini metalleerimist Cu(I) ja Zn(II) ionidega. Katse tulemusena selgus, et nii  $^{63}\text{Cu}$  kui ka  $^{66}\text{Zn}$  seovad  $\alpha/\beta$ -tubuliini oligomeeridega, mitte dimeeriga ning Cu(I) ionidel on märkimisväärselt tugevam sidumine võrreldes Zn(II) ionidega. Nii LC-ICP MS kui ka natiivse geelelektroforeesi abil leiti, et Cu(I) ionide juuresolekul tekivad reaktsioonisegus Cu(I)- $\alpha/\beta$ -tubuliini oligomeerid. Samuti näidati, et nende oligomeeride osakaal proovis suureneb pikaajalise inkubatsiooni jooksul ning oligomeerid jäävad peamiseks stabiilseks valgumiks peale 24 tundi inkubatsiooni.

$\alpha/\beta$ -tubuliini oligomeeride struktuuri visualiseeriti ka TEM abil, mille tulemusena näidati, et Cu(I) mõjul tekivad agregaatidele sarnased ebakorrapärsed struktuurid.

Järgmisena uuriti DTT võimet demetalleerida Cu(I)- $\alpha/\beta$ -tubuliini oligomeere. Leiti, et see protsess sõltub nii DTT kontsentratsioonist, kui ka inkubatsiooni ajast. Katsete tulemusena arvutati Cu(I)-tubuliini oligomeeride kompleksi  $K_D$  väärtus, milleks saadi  $4.0 \times 10^{-20}$  M. See tulemus näitab tugevat Cu(I) sidumist, mis on sarnane Cu(I) jaotusahela lõppensüümide ja metallotioniini vase komplekside dissotsiatsioonikonstantidega. Kuna raku sees tubulin osaleb MT-de ülesehitamises, siis on tähtis teha kindlaks, millise afiinsusega vask seostub MT-ga. Kui selgub et MT-d seovad vaske samuti kõrge afiinsusega, siis võib oletada, et rakulise Cu(I) ionide jaotusahelas võivad MT-d olla vase lõppaktseptoriteks, sarnaselt Cu-sõltuvate ensüümide ja metallotioniinidega. Samuti võivad MT-d aidata rakkudel mingil määral vähendada liigse vase tingimustes tsütosooli Cu koormust. MT-de interaktsioon Cu-ga on üheks edasiseks uuringute suunaks, mis võimaldab paremini mõista vase homöostaasi ning edasi arendada ka WT teraapiat.

## Annotatsioon

Cu on oluline mikroelement organismi normaalse toimimise jaoks, täites erinevaid funktsioone alates raku hingamisest kuni lipiidide ainevahetuseni. Cu homöostaas on rakus ja organismis rangelt reguleeritud. WT on autosomaalne retsessiivne pärilik haigus, mis on tingitud *ATP7B* geeni mutatsioonidest. WT-le on iseloomulik Cu süsteemne kuhjumine organismis. WT põhiline ravi varajastes staadiumides hõlmab kelateerimisteraapiat, Zn(II) soolade manustamist ja hilisemates staadiumides maksasiirdamist tsirroosi korral.

Vase kogunemise erinevatesse elunditesse, sealhulgas maksa ja aju, põhjustab rakkude morfoloogia ja struktuuri muutusi. Näiteks suurenevad maksarakud ja nende tuumad.

Tsütoskelett on raku komponent, mis säilitab raku kuju ja täidab raku erinevaid funktsioone. Tsütoskeleti üheks komponendiks on mikrotuubulid, mis koosnevad polümeriseeritud  $\alpha/\beta$ -tubuliini heterodimeeridest. Vask mõjutab tubuliini struktuuri, kuid seda pole veel üksikasjalikult uuritud. Seetõttu oli töö eesmärgiks uurida  $\alpha/\beta$ -tubuliini dimeeri seondumist Cu(I) ioonidega, uurida kui tugevasti konkureerib DTT  $\alpha/\beta$ -tubuliini oligomeeridega Cu(I) ioonide sidumisel LC-ICP MS meetoodika abil.

Katse tulemusena selgus, et Cu(I) ja Zn(II) seostuvad  $\alpha/\beta$ -tubuliini oligomeeridega, mitte dimeeridega. Samuti leiti, et Cu(I) põhjustab  $\alpha/\beta$ -tubuliini oligomeeride teket. Kasutades LC-ICP MS meetoodikat ja konkurentsi DTT-ga saadi Cu(I)- $\alpha/\beta$ -tubuliini oligomeeride kompleksi  $K_D$  väärtuseks  $4.0 \times 10^{-20}$  M, mis on väga tugeva seondumise tunnuseks.

Antud töö viidab sellele, et Cu homöostaas on keerukam, kui arvatud ning aitab kaasa selle peenregulatsiooni mehhanismide mõistmisele.

## Abstract

Copper is an essential micronutrient for the proper functioning of the organism, performing a variety of functions from cellular respiration to lipid metabolism. The amount of copper in the cell should be tightly regulated. Wilson's disease is an autosomal recessive disorder, caused by mutations in the *ATP7B* gene, which prevents copper from being properly removed from the body into the bile. The main treatments for Wilson's disease include chelation therapy, consumption of Zn(II) salts in the early stages, and liver transplantation in the later stages of disease.

The imbalance of copper in the body, like the accumulation of copper in various organs including the liver and brain, contributes to the disruption of cell morphology and structure. For example, nuclei of liver cells become enlarged.

The cytoskeleton is a component of the cell that maintains the shape of the cell and performs various other cellular functions. Network of microtubules is one of the major components of the cytoskeleton. Microtubules are composed of polymerised  $\alpha/\beta$ -tubulin heterodimers. It is known that copper affects the structure of tubulin, but this has not been studied in details. Therefore, the aim of current work was to investigate the interaction of the  $\alpha/\beta$ -tubulin dimers with Cu(I) ions and to determine how strongly DTT competes with  $\alpha/\beta$ -tubulin oligomers for Cu(I) ion binding using LC-ICP MS methodology.

As a result of the experiments, Cu(I) and Zn(II) were found to bind to  $\alpha/\beta$ -tubulin oligomers but not to dimers. By using the LC-ICP MS method and competition with DTT it was found that the  $K_D$  of Cu(I)<sub>1</sub>-tubulin complex is  $4.0 \times 10^{-20}$  M, which is an evidence of a very strong interaction.

The current research suggests that Cu homeostasis is even more complex, and contributes to the understanding of its fine regulatory mechanisms.

## Tanüavaldused

Avaldan tänu professor Peep Palumaale, tänu kellele mul oli võimalus teostada oma tööd metalloproteoomika laboris. Samuti tänan südamest oma juhendajaid, Julia Smirnovat ja Ekaterina Kabinin, nende panuse eest katsete läbiviimise õpetamisel ning toetuse eest bakalaureusetöö kirjutamisel. Erilised tänud kuuluvad ka Vello Tõugule tema väärtuslike nõuannete eest. Olen väga tänulik kõigile laboriliikmetele, kellega mul oli rõõm koos töötada.

Soovin tänada oma perekonnat nende püsiva toetuse, kasulike nõuannete ja minusse uskumise eest. Suur tänu ka minu sõpradele, kes aitasid mul säilitada motivatsiooni ja olid alati valmis minu muresid kuulama.

## Kasutatud allikad

1. Lutsenko S. Dynamic and cell-specific transport networks for intracellular copper ions. *J Cell Sci.* 2021 Nov 1;134(21):jcs240523.
2. Petsko GA, Ringe D. Protein structure and function. London[u.a]: New Science Press[u.a.]; 2004. 195 p. (Primers in biology).
3. Scheiber IF, Mercer JFB, Dringen R. Metabolism and functions of copper in brain. *Prog Neurobiol.* 2014 May;116:33–57.
4. Kaplan JH, Lutsenko S. Copper Transport in Mammalian Cells: Special Care for a Metal with Special Needs. *J Biol Chem.* 2009 Sep;284(38):25461–5.
5. Yang H, Ralle M, Wolfgang MJ, Dhawan N, Burkhead JL, Rodriguez S, et al. Copper-dependent amino oxidase 3 governs selection of metabolic fuels in adipocytes. Locasale J, editor. *PLOS Biol.* 2018 Sep 10;16(9):e2006519.
6. Go YM, Jones DP. The Redox Proteome. *J Biol Chem.* 2013 Sep;288(37):26512–20.
7. Bilan DS, Shokhina AG, Lukyanov SA, Belousov VV. Main cellular redox couples. *Russ J Bioorganic Chem.* 2015 Jul;41(4):341–56.
8. Hordyjewska A, Popiołek Ł, Kocot J. The many “faces” of copper in medicine and treatment. *BioMetals.* 2014 Aug;27(4):611–21.
9. Ohgami RS, Campagna DR, McDonald A, Fleming MD. The Steap proteins are metalloreductases. *Blood.* 2006 Aug 15;108(4):1388–94.
10. Tsang T, Davis CI, Brady DC. Copper biology. *Curr Biol.* 2021 May;31(9):R421–7.
11. Palumaa P. Copper chaperones. The concept of conformational control in the metabolism of copper. *FEBS Lett.* 2013 Jun 27;587(13):1902–10.
12. Liu SX, Fabisiak JP, Tyurin VA, Borisenko GG, Pitt BR, Lazo JS, et al. Reconstitution of Apo-Superoxide Dismutase by Nitric Oxide-Induced Copper Transfer from Metallothioneins. *Chem Res Toxicol.* 2000 Sep 1;13(9):922–31.
13. Coyle P, Philcox JC, Carey LC, Rofe AM. Metallothionein: the multipurpose protein. *Cell Mol Life Sci CMLS.* 2002 Apr 1;59(4):627–47.
14. Lutsenko S, Barnes NL, Bartee MY, Dmitriev OY. Function and Regulation of Human Copper-Transporting ATPases. *Physiol Rev.* 2007 Jul;87(3):1011–46.
15. Petris MJ. The Menkes copper transporter is required for the activation of tyrosinase. *Hum Mol Genet.* 2000 Nov 1;9(19):2845–51.
16. El Meskini R, Culotta VC, Mains RE, Eipper BA. Supplying Copper to the Cuproenzyme Peptidylglycine  $\alpha$ -Amidating Monooxygenase. *J Biol Chem.* 2003 Apr;278(14):12278–84.
17. Shanbhag V, Jasmer-McDonald K, Zhu S, Martin AL, Gudekar N, Khan A, et al. ATP7A delivers copper to the lysyl oxidase family of enzymes and promotes tumorigenesis and metastasis. *Proc Natl Acad Sci.* 2019 Apr 2;116(14):6836–41.
18. Hellman NE, Kono S, Mancini GM, Hoogeboom AJ, De Jong GJ, Gitlin JD. Mechanisms of Copper Incorporation into Human Ceruloplasmin. *J Biol Chem.* 2002 Nov;277(48):46632–8.
19. Kabin E. Copper Metabolism in Health and Disease: Focus on Copper in Adipogenesis and  $\alpha$ -Lipoic Acid in Wilson Disease [Internet]. [object Object]; 2023 [cited 2024 May 17]. Available from: <https://digikogu.taltech.ee/et/Item/6b47422f-75fd-4e9a-b16c-8edd3c3e201a>
20. Burkhead JL, Collins JF. Nutrition Information Brief—Copper. *Adv Nutr.* 2022 Mar;13(2):681–3.
21. Chen J, Song W, Zhang W. The emerging role of copper in depression. *Front Neurosci.* 2023 Aug 7;17:1230404.
22. Monty JF, Llanos RM, Mercer JFB, Kramer DR. Copper Exposure Induces Trafficking of the Menkes Protein in Intestinal Epithelium of ATP7A Transgenic Mice. *J Nutr.* 2005 Dec;135(12):2762–6.
23. Fujisawa C, Kodama H, Sato Y, Mimaki M, Yagi M, Awano H, et al. Early clinical signs and treatment of Menkes disease. *Mol Genet Metab Rep.* 2022 Jun;31:100849.

24. Hung YH, Bush AI, Cherny RA. Copper in the brain and Alzheimer's disease. *JBIC J Biol Inorg Chem.* 2010 Jan;15(1):61–76.
25. Tisato F, Marzano C, Porchia M, Pellei M, Santini C. Copper in diseases and treatments, and copper-based anticancer strategies. *Med Res Rev.* 2010 Jul;30(4):708–49.
26. Schroeder SM, Matsukuma KE, Medici V. Wilson disease and the differential diagnosis of its hepatic manifestations: a narrative review of clinical, laboratory, and liver histological features. *Ann Transl Med.* 2021 Sep;9(17):1394–1394.
27. Sandahl TD, Laursen TL, Munk DE, Vilstrup H, Weiss KH, Ott P. The Prevalence of Wilson's Disease: An Update. *Hepatology.* 2020 Feb;71(2):722–32.
28. Nurm M, Reigo A, Annilo T, Toomsoo T, Nõukas M, Nikopensius T, et al. Use of Estonian Biobank Data and Participant Recall to Improve Wilson's Disease Management [Internet]. 2024 [cited 2024 May 8]. Available from: <https://www.researchsquare.com/article/rs-4136207/v1>
29. Gupta A, Lutsenko S. Human Copper Transporters: Mechanism, Role in Human Diseases and Therapeutic Potential. *Future Med Chem.* 2009 Sep;1(6):1125–42.
30. Roy S, McCann CJ, Ralle M, Ray K, Ray J, Lutsenko S, et al. Analysis of Wilson disease mutations revealed that interactions between different ATP7B mutants modify their properties. *Sci Rep.* 2020 Aug 10;10(1):13487.
31. Lutsenko S, LeShane ES, Shinde U. Biochemical basis of regulation of human copper-transporting ATPases. *Arch Biochem Biophys.* 2007 Jul;463(2):134–48.
32. Muchenditsi A, Talbot CC, Gottlieb A, Yang H, Kang B, Boronina T, et al. Systemic deletion of *Atp7b* modifies the hepatocytes' response to copper overload in the mouse models of Wilson disease. *Sci Rep.* 2021 Mar 11;11(1):5659.
33. Gottlieb A, Dev S, DeVine L, Gabrielson KL, Cole RN, Hamilton JP, et al. Hepatic Steatosis in the Mouse Model of Wilson Disease Coincides with a Muted Inflammatory Response. *Am J Pathol.* 2022 Jan;192(1):146–59.
34. Lorincz MT. Neurologic Wilson's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2010 Jan;1184(1):173–87.
35. Das SK, Ray K. Wilson's disease: an update. *Nat Clin Pract Neurol.* 2006 Sep;2(9):482–93.
36. Uriu-Adams JY, Keen CL. Copper, oxidative stress, and human health. *Mol Aspects Med.* 2005 Aug;26(4–5):268–98.
37. Catana AM. Liver transplantation for Wilson disease. *World J Hepatol.* 2012;4(1):5.
38. Washington-Hughes CL, Roy S, Seneviratne HK, Karuppagounder SS, Morel Y, Jones JW, et al. *Atp7b*-dependent choroid plexus dysfunction causes transient copper deficit and metabolic changes in the developing mouse brain. Gropman A, editor. *PLOS Genet.* 2023 Jan 10;19(1):e1010558.
39. Kabin E, Dong Y, Roy S, Smirnova J, Smith JW, Ralle M, et al.  $\alpha$ -lipoic acid ameliorates consequences of copper overload by up-regulating selenoproteins and decreasing redox imbalance. *Proc Natl Acad Sci.* 2023 Oct 3;120(40):e2305961120.
40. Li L, Tai Z, Liu W, Luo Y, Wu Y, Lin S, et al. Copper overload impairs hematopoietic stem and progenitor cell proliferation via prompting HSF1/SP1 aggregation and the subsequently downregulating FOXM1-Cytoskeleton axis. *iScience.* 2023 Apr;26(4):106406.
41. Yang H, Kabin E, Dong Y, Zhang X, Ralle M, Lutsenko S. ATP7A-dependent copper sequestration contributes to termination of  $\beta$ -CATENIN signaling during early adipogenesis. *Mol Metab.* 2024 Feb;80:101872.
42. Huster D, Finegold MJ, Morgan CT, Burkhead JL, Nixon R, Vanderwerf SM, et al. Consequences of Copper Accumulation in the Livers of the *Atp7b*<sup>-/-</sup> (Wilson Disease Gene) Knockout Mice. *Am J Pathol.* 2006 Feb;168(2):423–34.
43. Perrin L, Roudeau S, Carmona A, Domart F, Petersen JD, Bohic S, et al. Zinc and Copper Effects on Stability of Tubulin and Actin Networks in Dendrites and Spines of Hippocampal Neurons. *ACS Chem Neurosci.* 2017 Jul 19;8(7):1490–9.
44. Fletcher DA, Mullins RD. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature.* 2010 Jan;463(7280):485–92.

45. Janmey PA. The Cytoskeleton and Cell Signaling: Component Localization and Mechanical Coupling. *Physiol Rev.* 1998 Jan 7;78(3):763–81.
46. Oda T, Iwasa M, Aihara T, Maéda Y, Narita A. The nature of the globular- to fibrous-actin transition. *Nature.* 2009 Jan 22;457(7228):441–5.
47. Merino F, Pospich S, Raunser S. Towards a structural understanding of the remodeling of the actin cytoskeleton. *Semin Cell Dev Biol.* 2020 Jun;102:51–64.
48. Fujii T, Iwane AH, Yanagida T, Namba K. Direct visualization of secondary structures of F-actin by electron cryomicroscopy. *Nature.* 2010 Oct;467(7316):724–8.
49. Von Der Ecken J, Müller M, Lehman W, Manstein DJ, Penczek PA, Raunser S. Structure of the F-actin–tropomyosin complex. *Nature.* 2015 Mar 5;519(7541):114–7.
50. Binarová P, Tuszynski J. Tubulin: Structure, Functions and Roles in Disease. *Cells.* 2019 Oct 22;8(10):1294.
51. Roll-Mecak A. The Tubulin Code in Microtubule Dynamics and Information Encoding. *Dev Cell.* 2020 Jul;54(1):7–20.
52. Vemu A, Atherton J, Spector JO, Moores CA, Roll-Mecak A. Tubulin isoform composition tunes microtubule dynamics. Blanchoin L, editor. *Mol Biol Cell.* 2017 Dec;28(25):3564–72.
53. Guo J, Qiang M, Ludueña RF. The distribution of  $\beta$ -tubulin isotypes in cultured neurons from embryonic, newborn, and adult mouse brains. *Brain Res.* 2011 Oct;1420:8–18.
54. Breuss M, Morandell J, Nimpf S, Gstrein T, Lauwers M, Hochstoeger T, et al. The expression of *tubb2b* undergoes a developmental transition in murine cortical neurons. *J Comp Neurol.* 2015 Oct 15;523(15):2161–86.
55. Breuss MW, Leca I, Gstrein T, Hansen AH, Keays DA. Tubulins and brain development – The origins of functional specification. *Mol Cell Neurosci.* 2017 Oct;84:58–67.
56. Yu I, Garnham CP, Roll-Mecak A. Writing and Reading the Tubulin Code. *J Biol Chem.* 2015 Jul;290(28):17163–72.
57. Keays DA, Tian G, Poirier K, Huang GJ, Siebold C, Cleak J, et al. Mutations in  $\alpha$ -Tubulin Cause Abnormal Neuronal Migration in Mice and Lissencephaly in Humans. *Cell.* 2007 Jan;128(1):45–57.
58. Kunishima S, Nishimura S, Suzuki H, Imaizumi M, Saito H. *TUBB 1* mutation disrupting microtubule assembly impairs proplatelet formation and results in congenital macrothrombocytopenia. *Eur J Haematol.* 2014 Apr;92(4):276–82.
59. McKenna ED, Sarbanes SL, Cummings SW, Roll-Mecak A. The Tubulin Code, from Molecules to Health and Disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2023 Oct 16;39(1):331–61.
60. Kapitein LC, Hoogenraad CC. Building the Neuronal Microtubule Cytoskeleton. *Neuron.* 2015 Aug;87(3):492–506.
61. Nogales E. An electron microscopy journey in the study of microtubule structure and dynamics. *Protein Sci.* 2015 Dec;24(12):1912–9.
62. Brouhard GJ, Rice LM. Microtubule dynamics: an interplay of biochemistry and mechanics. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018 Jul;19(7):451–63.
63. Carlier MF, Hill TL, Chen Y. Interference of GTP hydrolysis in the mechanism of microtubule assembly: an experimental study. *Proc Natl Acad Sci.* 1984 Feb;81(3):771–5.
64. Carlier MF, Pantaloni D. Kinetic analysis of guanosine 5'-triphosphate hydrolysis associated with tubulin polymerization. *Biochemistry.* 1981 Mar 31;20(7):1918–24.
65. Roostalu J, Thomas C, Cade NI, Kunzelmann S, Taylor IA, Surrey T. The speed of GTP hydrolysis determines GTP cap size and controls microtubule stability. *eLife.* 2020 Feb 13;9:e51992.
66. Kollman JM, Merdes A, Mourey L, Agard DA. Microtubule nucleation by  $\gamma$ -tubulin complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011 Nov;12(11):709–21.
67. Ohi R, Zanic M. Ahead of the Curve: New Insights into Microtubule Dynamics. *F1000Research.* 2016 Mar 10;5:314.
68. Sanchez AD, Feldman JL. Microtubule-organizing centers: from the centrosome to non-centrosomal sites. *Curr Opin Cell Biol.* 2017 Feb;44:93–101.



69. Kollman JM, Polka JK, Zelter A, Davis TN, Agard DA. Microtubule nucleating  $\gamma$ -TuSC assembles structures with 13-fold microtubule-like symmetry. *Nature*. 2010 Aug;466(7308):879–82.
70. Wagstaff JM, Planelles-Herrero VJ, Sharov G, Alnami A, Kozielski F, Derivery E, et al. Diverse cytomotive actins and tubulins share a polymerization switch mechanism conferring robust dynamics. *Sci Adv*. 2023 Mar 31;9(13):eadf3021.
71. Kastenholtz B. Phytochemical Approach and Bioanalytical Strategy to Develop Chaperone-Based Medications. *Open Biochem J*. 2008 Apr 29;2:44–8.
72. Tymoczko JL, Berg JM, Stryer L. Biokeemia Lühikursus. TTÜ kirjastus; 2016.
73. Lakowicz JR. Principles of fluorescence spectroscopy. 3rd ed. New York: Springer; 2006. 954 p.
74. Striegel AM. Size-Exclusion Chromatography: A Twenty-First Century Perspective. *Chromatographia*. 2022 Apr;85(4):307–13.
75. Montes-Bayón M, DeNicola K, Caruso JA. Liquid chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2003 Jun;1000(1–2):457–76.
76. Han X, Aslanian A, Yates JR. Mass spectrometry for proteomics. *Curr Opin Chem Biol*. 2008 Oct;12(5):483–90.
77. Walther TC, Mann M. Mass spectrometry–based proteomics in cell biology. *J Cell Biol*. 2010 Aug 23;190(4):491–500.
78. Wilschefski S, Baxter M. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Introduction to Analytical Aspects. *Clin Biochem Rev*. 2019 Aug 29;40(3):115–33.
79. Smirnova J, Gavrilova J, Noormägi A, Valmsen K, Pupart H, Luo J, et al. Evaluation of Zn<sup>2+</sup>- and Cu<sup>2+</sup>-Binding Affinities of Native Cu,Zn-SOD1 and Its G93A Mutant by LC-ICP MS. *Molecules*. 2022 May 15;27(10):3160.
80. Quarles CD, Macke M, Michalke B, Zischka H, Karst U, Sullivan P, et al. LC-ICP-MS method for the determination of “extractable copper” in serum. *Metallomics*. 2020 Sep 1;12(9):1348–55.
81. Michalke B. Review about Powerful Combinations of Advanced and Hyphenated Sample Introduction Techniques with Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (ICP-MS) for Elucidating Trace Element Species in Pathologic Conditions on a Molecular Level. *Int J Mol Sci*. 2022 May 29;23(11):6109.
82. Kirsipuu T, Zadorožnaja A, Smirnova J, Friedemann M, Plitz T, Tõugu V, et al. Copper(II)-binding equilibria in human blood. *Sci Rep*. 2020 Mar 30;10(1):5686.
83. Acon BW, McLean JA, Montaser A. A direct injection high efficiency nebulizer interface for microbore high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *J Anal At Spectrom*. 2001;16(8):852–7.
84. Wrobel K, Kannamkumarath S, Wrobel K, Caruso JA. Environmentally friendly sample treatment for speciation analysis by hyphenated techniques. *Green Chem*. 2003 Apr 8;5(2):250–9.
85. Li C, Arakawa T. Agarose native gel electrophoresis of proteins. *Int J Biol Macromol*. 2019 Nov;140:668–71.
86. Franken LE, Grünwald K, Boekema EJ, Stuart MCA. A Technical Introduction to Transmission Electron Microscopy for Soft-Matter: Imaging, Possibilities, Choices, and Technical Developments. *Small*. 2020 Apr;16(14):1906198.
87. Krishtal J, Bragina O, Metsla K, Palumaa P, Tõugu V. In situ fibrillizing amyloid-beta 1-42 induces neurite degeneration and apoptosis of differentiated SH-SY5Y cells. Ginsberg SD, editor. *PLOS ONE*. 2017 Oct 24;12(10):e0186636.
88. Tkachenko V, Vidal L, Josien L, Schmutz M, Poly J, Chemtob A. Characterizing the Core-Shell Architecture of Block Copolymer Nanoparticles with Electron Microscopy: A Multi-Technique Approach. *Polymers*. 2020 Jul 25;12(8):1656.
89. Mörgelin M. Negative Staining and Transmission Electron Microscopy of Bacterial Surface Structures. In: Nordenfelt P, Collin M, editors. *Bacterial Pathogenesis* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2017 [cited 2024 May 18]. p. 211–7. (Methods in Molecular Biology; vol. 1535). Available from: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-6673-8\\_13](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-6673-8_13)
90. De Carlo S, Harris JR. Negative staining and cryo-negative staining of macromolecules and viruses for TEM. *Micron*. 2011 Feb;42(2):117–31.

91. Palumaa P, Kangur L, Voronova A, Sillard R. Metal-binding mechanism of Cox17, a copper chaperone for cytochrome c oxidase. *Biochem J*. 2004 Aug 15;382(1):307–14.
92. Xiao Z, Brose J, Schimo S, Ackland SM, La Fontaine S, Wedd AG. Unification of the Copper(I) Binding Affinities of the Metallo-chaperones Atx1, Atox1, and Related Proteins. *J Biol Chem*. 2011 Apr;286(13):11047–55.
93. Li L, Tai Z, Liu W, Luo Y, Wu Y, Lin S, et al. Copper overload impairs hematopoietic stem and progenitor cell proliferation via prompting HSF1/SP1 aggregation and the subsequently downregulating FOXM1-Cytoskeleton axis. *iScience*. 2023 Apr;26(4):106406.

**Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina Jelizaveta Kravtsova

1. Annan Tallinna Tehnikaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose  $\alpha/\beta$ -Tubuliin-vask(I) kompleksi uurimine,

mille juhendajad on Julia Smirnova ja Ekaterina Kabin,

1.1 reprodutseerimiseks lõputöö säilitamise ja elektroonse avaldamise eesmärgil, sh Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogusse lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2 üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tallinna Tehnikaülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogu kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. Olen teadlik, et käesoleva lihtlitsentsi punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest ning muudest õigusaktidest tulenevaid õigusi.

29.05.2024