

Apolipoproteiini E (apoE) isovormide interaktsioon Fe(II) ja Zn(II)ioonidega

Bakalaureusetöö

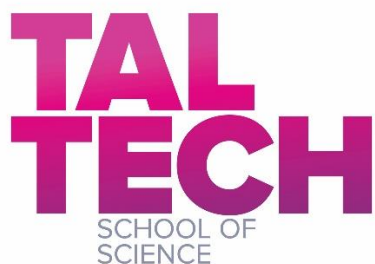
Üliõpilane: Jelizaveta Aleksandrova

Üliõpilaskood: 213047LAAB

Juhendaja: Andra Noormägi, TTÜ Keemia ja Biotehnoloogia Instituut, insener

Kaasjuhendaja: Peep Palumaa, TTÜ Keemia ja Biotehnoloogia Instituut, professor

Õppekava: Rakenduskeemia, toidu- ja geenitehnoloogia



Interaction of apolipoprotein E (apoE) isoforms with Fe(II) and Zn(II) ions

Bachelor thesis

Student: Jelizaveta Aleksandrova

Student code: 213047LAAB

Supervisor: Andra Noormägi, Department of Chemistry and Biotechnology, engineer

Co-supervisor: Peep Palumaa, Department of Chemistry and Biotechnology, professor

Study program: Applied chemistry, food- and gene technology

Tallinn 2024

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 Aleksandrova

[allkiri ja kuupäev]

Töö vastab bakalaureusetööle esitatavatele nõuetele.

Juhendaja: Andra Noormägi, Peep Palumaa

[allkiri ja kuupäev]

Töö on lubatud kaitsmisele.

Kaitsmiskomisjoni esimees: Indrek Koppel

[allkiri ja kuupäev]

Sisukord

Sissejuhatus	6
1. Kirjanduse ülevaade	7
1.1. Alzheimeri tõbi	7
1.2. Alzheimeri tõve geneetilised riskitegurid	8
1.2.1. Apolipoproteiin E	8
1.3. Alzheimeri tõve võimalikud omandatud riskitegurid	9
1.4. Biometallide roll Alzheimeri tõves	10
1.4.1. Vask	10
1.4.2. Raud	11
1.4.3. Tsink	11
1.5. Apolipoproteiini E interaktsioon tsingi, raua ja vase ioonidega	12
2. Töö eesmärk	14
3. Materjalid ja meetodid	15
3.1. Teoreetiline kirjeldus	15
3.1.1. MALDI TOF MS	15
3.1.2. Fluorestsentspektroskoopia	15
3.2. Eksperimentaalse töö kirjeldus	16
3.2.1. apoE proovide ettevalmistus	16
3.2.2. apoE massi kontrollimine MALDI TOF MS abil	16
3.2.3. Tsingi ja raua soolade lahjenduste ettevalmistamine tiitrimiseks	16
3.2.4. Trüptofaani fluorestsentsi intensiivsuse mõõtmine ja K_D leidmine	17
4. Tulemused	18
4.1. MALDI TOF MS tulemused	18
4.2. Fluorestsentspektroskoopia tiitrimise tulemused	18
4.2.1. Fluorestsentspektroskoopia tiitrimise tulemused Zn(II) ioonidega	19
4.2.2. Fluorestsentspektroskoopia tiitrimise tulemused Fe(II) ioonidega	22
5. Arutelu	25
Kokkuvõte	26
Abstract	27
Tänuavaldused	28
Kasutatud kirjandus	29

Lühendite loetelu

$A\beta$ – amüloid- β peptiid

AcN – atsetonitriili

AICD – APP rakusisene domeen

apoE – apolipoproteiin E

APP – amüloidi prekursorvalk

AT – Alzheimeri tõbi

HDL – kõrge tihedusega lipoproteiin

MES – 2-(N-morfolino)etaansulfoonhape

MT3 – metallotioneiin 3

PSEN1, PSEN2 – preseniliin 1,2

sAPP – lahustuv amüloidi prekursorvalk

TFA – trifluoroäädikhape

VLDL – väga madala tihedusega lipoproteiin

ZIP – tsingi- ja rauaga reguleeritud transportvalgud

ZnT3 – tsingi transporter 3

Sissejuhatus

Alzheimeri tõbi on kõige levinum dementsuse vorm, mis põhjustab kognitiivse funktsiooni pöördumatut ja progresseeruvat halvenemist. Haigus esineb peamiselt vanematel inimestel ning on ühiskonnale väga kulukas. Oodatava eluea pikenedes suureneb ka Alzheimeri tõve all kannatavate patsientide arv. Prognoositakse, et 2050. aastaks kogu maailmas patsientide arv kolmekordistub (GBD 2019 Dementia Forecasting Collaborators, 2022). Haiguse ravi ega täpne põhjus pole praegu aga teada. Alzheimeri tõvega patsientidel leitakse ajus suures koguses amüloidse peptiidi naastusid ja tau valgu neurofibrillarseid kämpusid, mille ladestumise mehhanismi võib mõjutada interaktsioon peamise geneetilise riskifaktori – apolipoproteiini (apoE) ja metalliioonide vahel.

Paljud uuringud on kinnitanud Alzheimeri tõve tihedat seost apolipoproteiin E-ga (apoE), mille põhiülesanne on reguleerida lipiidide metabolismi. On olemas 3 peamist apoE isovormi: apoE2, apoE3 ja apoE4. Hilise algusega Alzheimeri tõve tugevaim geneetiline riskifaktor on *apoE4* geeni olemasolu, mis soodustab kuidagi amüloidse peptiidi ladestumist. Geeni teisel isovormil *apoE2* on aga kõige tugevam geneetiline kaitsev toime. *apoE3* geeni roll jääb neutraalseks.

apoE4 geeni olemasolu ei põhjusta alati haigust ja *apoE2* olemasolu ei kaitse alati, mis tähendab, et on ka teisi tegureid, mis võivad haigusprotsessi käivitada, näiteks metalliioonid. Mõningate uuringute põhjal on teada, et apoE on võimeline siduma metalliioone ja isegi mõjutama nende homöostaasi. Metallid omakorda mängivad olulist rolli kesknärvisüsteemis ja Alzheimeri tõve puhul leidub neid suures koguses koos amüloidnaastudega, eriti tsinki, vaske ja rauda. apoE ja metallide vahelise seostumise uurimine võib anda ülevaate neurodegeneratsiooni mehhanismist, võimaldab mõista kuidas *apoE4* geen suurendab haiguse riski ning viia edasiste sammudeni sobivate ravimeetodite leidmisel.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli uurida, kas Zn(II), Fe(II) ionide ja kolme apoE isovormide vahel esineb interaktsioon ning määrata, kui tugev see on iga isovormi puhul pH 7,3 ja pH 5,0 juures. Lisaks püstitati 2 hüpoteesi: kõige tugevam seostumine Zn(II) ionidega on apoE2-l ning pH 5,0 juures on seostumine nõrgem, kui pH 7,3 juures.

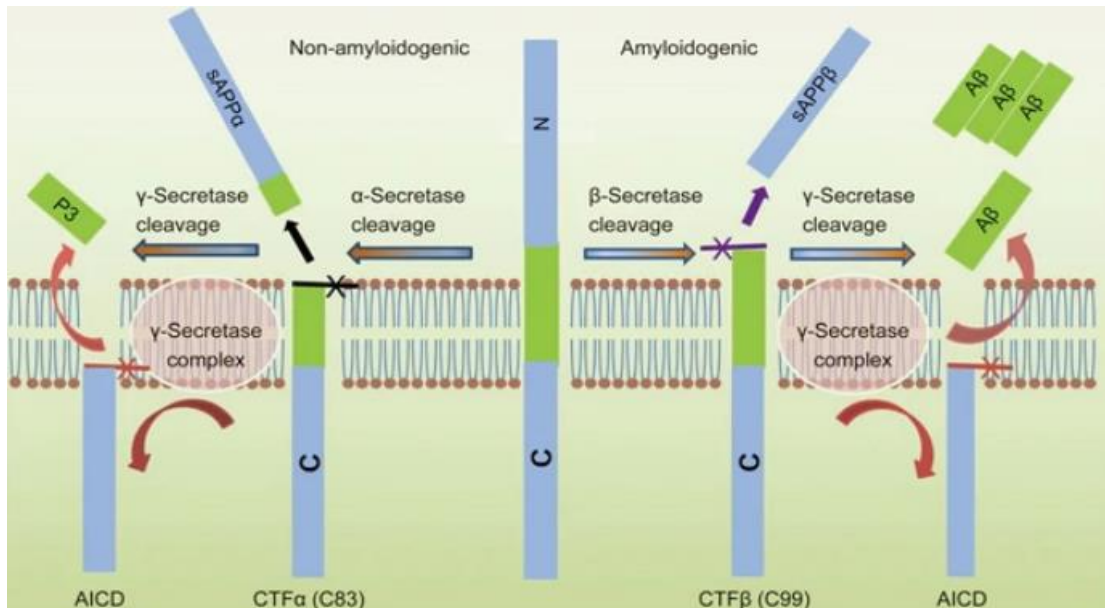
apoE ja metalliioonide interaktsiooni uurimiseks kasutati fluorestsentsstiitrimise meetodit, mille käigus mõõdeti apoE autofluorestsentsi kasvava metalliioonide kontsentratsiooni tingimustes. Teostati seostumisandmete analüüs ja leiti dissotsiatsioonikonstantide väärtused. Saadud tulemused aitavad mõista erinevate apoE isovormide interaktsiooni metalliioonidega ning täpsustada, kas histidiini- ja tsüsteiinijäägid osalevad metalliioonide seondumisel.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1. Alzheimeri tõbi

Alzheimeri tõbi (AT) on kõige levinum aeglaselt progresseeruv neurodegeneratiivne haigus, mis põhjustab mälu eest vastutavate rakkude surma ja selle tulemusena dementsust. See toob kaasa vaimsete võimete languse, ruumis orienteerumisprobleemid, aeglasemad reaktsioonid ja igapäevaste tegevustega toimetuleku võime vähenemise (Breijyeh & Karaman, 2020). Haigus esineb peamiselt üle 65-aastastel inimestel ja nimetatakse AT hiliseks vormiks. Umbes 4-6% juhtudest esineb haigust aga alla 65-aastastel inimestel ja seda vormi nimetatakse varajase algusega AT-ks (Mendez, 2017). Seda haigust kirjeldas esmakordselt Saksa psühhiaater Alois Alzheimer, kes märkas oma dementsuse all kannataval patsiendil amüloidsete naastude ja neurofibrillaarsete kämpude olemasolu ning suurt neuronite kadu ajus (Breijyeh & Karaman, 2020). Amüloidsed naastud koosnevad amüloidi- β peptiidist ($A\beta$), mis esinevad neuronite vahel ja neurofibrillaarsed kämbud koosnevad tau-valgust, mis esinevad neuronite tsütoplasmas (Song et al., 2015).

Väike $A\beta$ peptiid koosneb 36-43 aminohappejäägist, mis moodustub suuremast transmembraanses amüloidi prekursorvalgust (APP) (Querfurth & LaFerla, 2010). APP mängib olulist rolli signaaliülekanedes, neuronite aktiivsuses ja muudes aju homöostaasi aspektides. APP lõhustamiseks sekretaaside toimel on 2 peamist rada: amüloidogeenne (koos β -sekretaasi osalusega) ja mitteamüloidogeenne (koos α -sekretaasi osalusega). APP lõhustamine α -sekretaasi poolt põhjustab lahustuva sAPP α molekuli moodustumist ja jätab APP C-otsa fragmendi, mis koosneb 83 aminohappejäägist (C83). Lõhustamine β -sekretaasi poolt tekitab ka lahustuva sAPP β molekuli ja C-terminaalse fragmendi, mis koosneb 99 aminohappejäägist (C99). Edasisel töötlemisel toimub membraanisene lõhustamine γ -sekretaasi toimel. C83 töötlemise tulemusena moodustub mittepatoogeenne peptiid P3 ja APP rakusisene domeen (AICD). C99 töötlemise tulemusena moodustuvad patogeensed peptiidid $A\beta$ ja AICD (Joonis 1) (Chen et al., 2017). Peamised $A\beta$ vormid koosnevad 40 ($A\beta$ 40) ja 42 aminohappejäägist ($A\beta$ 42). $A\beta$ 42 sisaldab C lõpus veel kahte hüdrofoobset jääki, mis muudab peptiidi toksilisemaks ja agregatsioonivõimelisemaks (Silva et al., 2019). Amüloidse kaskaadi hüpoteesi kohaselt on $A\beta$ võimeline ladestuma suurtes kogustes aju, moodustades toksilisi oligomeere, mis seejärel moodustavad lahustumatuid amüloidseid naastusid (Hardy & Selkoe, 2002; Silva et al., 2019).



Joonis 1. APP lagundamise amüloidogeenne ja mitteamüloidodeenne rada (Chen et al., 2017).

Tau valk kuulub valkude rühma, mis seonduvad mikrotoubulitega. Ta asub peamiselt kesknärvisüsteemi neuronites ja on neurofibrillaarsete kämpude põhikomponent. On oletatud, et Aβ peptiidi ladestumine soodustab neurofibrillaarsete kämpude ladestumist, kuid täpne mehhanism pole aga teada. Tau on tavaliselt lahustuv valk, kuid tema hüperfosforüülimisel tekivad lahustumatud neurofibrillaarsed kämbud, mis võivad kahjustada närvirakke ning häirida nende funktsiooni (Ballard et al., 2011).

1.2. Alzheimeri tõve geneetilised riskitegurid

AT pärilikud tegurid on seotud peamiselt mutatsioonidega kolmes geenis: APP, preseniliin 1 (PSEN1) ja preseniliin 2 (PSEN2). Mutatsioonide esinemine APP, PSEN1 ja PSEN2 geenides põhjustab varajase AT alguse (Khanahmadi et al., 2015). Preseniliinid on γ-sekretaasi kompleksi katalüütilised komponendid ja osalevad APP lõhustamises (Oikawa & Walter, 2019). PSEN1 ja PSEN2 on homologsed, kuid mutatsioonid PSEN1 geenis on levinumad (Cai et al., 2015). Mõlema PSEN mutatsioonid võivad mõjutada γ-sekretaasi aktiivsust, suurendades seeläbi Aβ tootmist APP-st ning avaldades mõju Aβ42/Aβ40 suhte suurendamisele (Breijyeh & Karaman, 2020).

1.2.1. Apolipoproteiin E

95% juhtudest algab AT pärast 65. eluaastat ja peamine hilise algusega AT tekkega seotud geen on *apoE*, mis asub 19. kromosoomis. See geen kodeerib apolipoproteiin E (*apoE*) valku, mis osaleb lipiidide metabolismis keha rakkude ja kudede vahel (Silva et al., 2019). *apoE* on oluline kolesterooli ülekandmisel kesknärvisüsteemi ning lipoproteiinide metabolismis. *apoE* ekspresseerub maksa ja aju astrotsüütides, samuti mikrogliaas (Breijyeh & Karaman, 2020). See on 299 aminohappejäägist koosnev glükoproteiin molekulmassiga 34 kDa. N-terminaalne domeen sisaldab retseptori sidumissaiti, aga C-terminaalne domeen sisaldab lipiidide sidumissaiti. Inimestel on kolm peamist *apoE* alleeli: ε2 (*apoE2*), ε3 (*apoE3*) ja ε4 (*apoE4*), mis annavad erineva haigusrisi taseme. Isovormid erinevad aminohappe jääkide poolest

positsioonides 112 ja 158. Nende aminohappe jääkide keemiline koostis mõjutab ka valgu lokalisatsiooni: apoE4 leidub peamiselt triglütseriidide rikastes väga madala tihedusega lipoproteiinide (VLDL) osakestes, samas kui apoE2 ja apoE3 eelistavad kõrge tihedusega lipoproteiini (HDL) (Raulin et al., 2022).

apoE2 puhul on tsüsteiin positsioonides 112 ja 158. apoE2 on kõigist esitatud alleelidest kõige vähem levinud, kuid sellel on AT korral kaitsev toime. Soodustab A β väljutamist, vähendades seeläbi selle ladestumist ajus (Raulin et al., 2022). Kaitsva apoE ϵ 2 alleeli kandjatel on hinnanguliselt 2 korda väiksem risk haigestuda AT-sse elu jooksul võrreldes mittekanadjatega (Genin et al., 2011).

apoE3-l on tsüsteiin positsioonis 112 ja arginiin positsioonis 158. See on kolmest isovormist kõige levinum. apoE3-l on Alzheimeri tõve puhul neutraalne roll (Raulin et al., 2022).

apoE4 puhul on arginiin positsioonides 112 ja 158. apoE4 on võimeline seonduma A β -ga, aidates sellel moodustada fibrille ja ladestuda ajju. Selle tulemusena on apoE4 Alzheimeri tõve tugevaim geneetiline riskitegur. *apoE4* genotüübiga patsientidel esineb teiste alleelidega võrreldes märgatavalt ulatuslikum kognitiivsete võimete halvenemine (Raulin et al., 2022). Veelgi enam, *apoE2/4* genotüübiga inimesed on endiselt suur haiguse riski, kuna apoE4 mõju on domineerivam kui apoE2 kaitse. Kaitse on aga veidi parem kui *apoE3/4* puhul (Goldberg et al., 2020; Raulin et al., 2022).

1.3. Alzheimeri tõve võimalikud omandatud riskitegurid

Kuid AT esineb ka inimestel, kellel puudub geneetiline eelsoodumus. Kõige peamine riskitegur on vanus. Haiguse võimalikud põhjused võivad olla põhjustatud ka muudest teguritest, nagu näiteks ebatervislik eluviis, keskkonna reostus, metallid, mitmesugused infektsioonid ja haigused nagu diabeet, mis kõik võivad põhjustada oksüdatiivset stressi ja põletikku, suurendades seeläbi AT tekke tõenäosust (Breijyeh & Karaman, 2020).

Oksüdatiivne stress tekib redoks-tasakaalu häirimist, mis on põhjustatud vabadest radikaalidest (Birla et al., 2020). Vabad radikaalid tekivad ainevahetuse käigus ja satuvad organismi ka keskkonnast. Vabadel radikaalidel on paardumata elektron(id), mis on võimelised reageerima erinevate molekulidega, häirides nende funktsioone (Phaniendra et al., 2015). Antioksidandid suudavad toime tulla radikaalidega, vähendades seeläbi vabade radikaalide hulka ja selle tulemusena kaitstes meie organismi. Kuid kui need on tasakaalustamata, muudavad vabad radikaalid teiste molekulide struktuuri (Barnham et al., 2004). Mõnedel andmetel on aju võrreldes teiste organitega kõige rohkem kalduv oksüdatiivsele stressile AT progresseerumise ajal (Allan Butterfield & Boyd-Kimball, 2018). Oksüdatiivne stress põhjustab mitokondriaalse funktsiooni häireid, metallide ja A β akumulierumist, mis põhjustab AT (Birla et al., 2020).

2. tüüpi diabeedi ja AT suurenenud riski vahel on sammuti teatav seos. Insuliini puudulikkus või resistentsus võib vallandada amüloidogeense raja, vähendades A β väljutamist, mis viib selle akumulierumiseni ajukoes. Insuliiniresistentsus ja defitsiit võivad põhjustada kinaaside aktiveerimist (näiteks glükogeeni süntaasi kinaas-3 β) ja põhjustada tau valgu hüperfosforüülimist, mis viib neurofibrillaarsete kämpude moodustumiseni (Kimura, 2016).

Stress ja depressioon põhjustavad kortisooli taseme tõusu, mis omakorda mõjutab inimese kongestiivseid funktsioone ja põhjustab hipokampuse atroofiat ning mõjutab A β ladestumist. Sellesse kategooriasse kuuluvad ka unetusega inimesed (Wu et al., 2018; Zvěřová et al., 2013).

Võimalikke AT mõjutavaid tegureid on palju, kuid stressi vältimine, tervislikud eluviisid ning pidev füüsiline ja vaimne aktiivsus võivad parandada elukvaliteeti ja ennetada haiguse teket (Silva et al., 2019).

1.4. Biometallide roll Alzheimeri tõves

Inimesed saavad metalle nii toidu kui ka keskkonna kaudu. Meie igapäevaelus leidub palju metalle ravimites, kosmeetikas ja muudes majapidamistarvetes (Breijyeh & Karaman, 2020). Biometalle esineb elusorganismides tavaliselt väikestes, kuid vajalikes kogustes ja nad täidavad füsioloogilisi funktsioone. Näiteks tsingi, raua ja vaseioonid mängivad olulist rolli aju arengus ja ainevahetuses. Metallioonid seostuvad valkudega ja vastutavad nende toimimise eest organismis. Veelgi enam, metalli puudus või liig on seotud paljude haigustega, sealhulgas AT-ga. Metallioonid võivad olla seotud mitmesuguste AT arenguga seotud mehhanismidega, nagu oksüdatiivne stress, A β ladestumine ning tau valgust lahustumatute agregaatide moodustumine (F. Liu et al., 2022). Seega võib metallide tähtsuse ja vastastikmõju mõistmine olla kasulik nii ravi tõhususe kui ka haiguse põhjuse mõistmise seisukohast.

Meie organismi peamised mikroelemendid, mida AT-ga inimese ajus leidub suurtes kogustes, on tsink, raud ja vask. Raud ja vask on võimelised osalema redoksreaktsioonides, põhjustades oksüdatiivset stressi ja A β valesti kokkupakkimist ning agregatsiooni. Tsingi homöostaasi häirimine mängib samuti AT patogeneesis olulist rolli (Birla et al., 2020).

1.4.1. Vask

Vask on paljudes olulistest bioloogilistes protsessides osalev mikroelement, mida leidub peamiselt ajus, maksas ja neerudes. Veres on suurem osa vasest seotud tseruloplasmiiniga — valguga, mis transpordib vaske veres, on antioksidant ning osaleb raua metabolismis (Patel & Aschner, 2021). Ülejäänud vask on seotud seerumi albumiiniga (Linder, 2016), vabas vormis vaske on väga vähe (Collins & Klevay, 2011). Vask on ka erinevate raku hingamises, vabade radikaalide neutraliseerimises ja ainevahetusprotsessides osalevate ensüümide kofaktor (F. Liu et al., 2022). Superoksiidi dismutaas on antioksidantse kaitse ensüüm, mille kofaktoriks on vask, ja see on üks peamisi kaitsemehhanisme oksüdatiivse stressi vastu (Younus, 2018).

Vask võib vabas või valesti komplekseerunud vormis toimida ka prooksidandina, kuna vaseioonidel on kõrge afiinsus A β -ga, sellega seondumisel A β muutub redoksaktiivseks ning tekib vesinikperoksiid (H₂O₂). Suurenenud H₂O₂ kogused põhjustavad Fentoni reaktsiooni kaudu vabade radikaalide teket ja oksüdatiivset stressi (Birla et al., 2020; F. Liu et al., 2022). Veelgi enam, vask-A β kompleks soodustab A β oligomeeride moodustumist ja viib A β agregatsioonini (Wang et al., 2020).

APP-I on kaks vase-sidumissaiti, esimene A β -piirkonnas ja teine N-terminuses. Seetõttu võib redoksreaktsioone katalüüsiva ensüümi (vase reduktaasi) juuresolekul vase redutseerimise kaudu tekkida radikaale (Botchway et al., 2023; Hung et al., 2010). AT korral leidub vaske

peamiselt amüloidsetes naastudes, samas esineb aga rakusisene vasepuudus (Botchway et al., 2023).

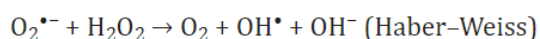
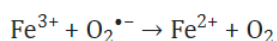
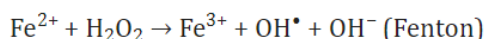
Vase seondumist tau-valguga on vähe uuritud. On teada, et vask koos tau-valguga avaldab redoksaktiivsust ja soodustab neurofibrillaarsete kämpude moodustumist (F. Liu et al., 2022).

1.4.2. Raud

Raud on kõige levinum ja hädavajalik mikroelement (Zhang et al., 2022), mis osaleb olulistes protsessides organismis, nagu hemoglobiini süntees, hapniku transport rakkudesse, energia metabolism, neurotransmitterite süntees ning teistes ensümaatilistes oksüdatiivsetes reaktsioonides (Birla et al., 2020). Peamine osa rauast on seotud valkudega, nagu hemoglobiin, müoglobiin ja erinevad ensüümid. Raua mittefunktsioneeriv osa ladestub organismis ferritiini ja hemosideriini koostises. Peamiseteks raua transporteriteks on valk transferrin, mis transpordib rauda rakkudesse, ja ferroportiin, mis ekspordib rakkudest rauda (Abbaspour et al., 2014).

Kui raua homöostaas ajus on häiritud, võib see suurtes kogustes ladestuda (Peng et al., 2021). AT korral täheldatakse amüloidsete naastude koostises kõrget raua ioonide sisaldust (Van Bergen et al., 2016), mis muudab neid veelgi toksilisemaks (B. Liu et al., 2011). Samuti on AT korral ferritiini tase kõrge, samas kui ferroportiini tase on vähenenud (Raha et al., 2022). Selle põhjuseks võib olla hepsidiini suurenenud tootmine. Hepsidiin on raua regulaator, mis ferroportiiniga seondudes põhjustab selle lagundamiste, takistades seeläbi raua ekspordi rakkudest (Abbaspour et al., 2014).

Raua homöostaasi häirimine mõjutab negatiivselt ka APP geeni ekspressiooni (Zhang et al., 2022). Fe(III) ioonide kõrge tase võib mõjutada APP tootmist, aktiveerides β -sekretaasi, suurendades seeläbi A β tootmist (Wang et al., 2020). Fe(II) ioonid seonduvad A β -ga ja soodustavad selle agregatsiooni (Cheignon et al., 2018). Seejärel võib A β kompleks Fentoni reaktsiooni kaudu põhjustada oksüdatiivset stressi vabade radikaalide tekkega, mis võivad neuroneid hävitada. Fe(III) ioonid on võimelised seonduda superoksiidi aniooniga ja redutseeruma Fe(II) iooniks. Kahe reaktsiooni summaarset reaktsiooni iseloomustab — Haber-Weissi reaktsioon (Joonis 2) (Cheignon et al., 2018; Peng et al., 2021).



Joonis 2. Raua ioonide osalemine elektronide doonori ja aktseptorina aktiivsete vabade radikaalide tootmisel Fentoni ja Haber-Weissi reaktsioonide kaudu (Peng et al., 2021).

1.4.3. Tsink

Tsink on meie organismis asendamatu mikroelement ja ta on oma sisalduselt raua järel teisel kohal (F. Liu et al., 2022). Tsink mängib olulist rolli paljude ensüümide funktsioneerimises, osaleb ainevahetuses, toetab immuunsüsteemi toimimist ja omab antioksidatiivseid omadusi

(Kiouri et al., 2023). Suurem osa tsinki leidub valgukompleksides, sealhulgas A β kompleksides. Mõningane osa tsinki leidub vabas vormis glutamatergiliste neuronite sünaptilistes vesiikulites (Zhang et al., 2022). Tsingi transporterid (ZnT) transpordivad tsinki rakust rakuvälisesse ruumi. Tsingi- ja rauaga reguleeritud transpordivalgud (ZiP) transpordivad tsinki rakuvälisest ruumist rakku. Tsink transporter 3 (ZnT3) vastutab sünaptilise vesikulaarse tsingi transpordi eest (Watt et al., 2011). Selle valgu taseme langus tingib tsingi homöostaasi regulatsiooni hälbe, mis mängib AT patogeneesis olulist rolli (Adlard et al., 2010). Tsingi homöostaasis osalevad ka metallotioneiinid (MT) (Botchway et al., 2023). Need on valgud, mis võivad siduda metallioone ja selle tulemusena täita organismis antioksidantset funktsiooni. MT3 on võimeline siduma ja transportima vase ja tsingi ioone, vähendades seeläbi toksiliste A β -metalli komplekside teket (Meloni et al., 2008).

Kõrge tsingi tase võib põhjustada tau valgu akumulereerumist ja lahustumatute agregaatide moodustumist, mis hiljem moodustavad neurofibrillaarseid kämpusid (Moreira et al., 2019).

1.5. Apolipoproteiini E interaktsioon tsingi, raua ja vase ioonidega

Tänapäeval on teada, et AT patogeneesis osalevad nii apoE kui ka teatud metallid (eriti tsink, vask ja raud), kuid täpne mehhanism pole veel teada (Xu et al., 2014). Näiteks *apoE4* geeni olemasolu ei taga haiguse kindlat esinemist, mis tähendab, et on ka teisi riskitegureid, mis apoE4-ga interakteeruvad ja patoloogilise mehhanismi käivitavad (Zhang et al., 2022). Paljud uuringud toetavad seost apoE erinevate isovormide ja metallioonide interaktsioonide ning AT vahel, teised aga lükkavad selle ümber. Kuid küsimus nende kahe teguri koostoimest AT arengus jääb endiselt aktuaalseks, kuna see võib aidata meil mõista mehhanismi, kuidas *apoE4* geen on seotud AT-ga, ja selle tulemusena leida sobiv ravistrateegia (Xu et al., 2014).

Mõned uuringud on näidanud, et apoE2-l on kõrgem afiinsus tsingi ioonide suhtes tsüsteiinijääkide tõttu positsioonides 112 ja 158, millel on kõrge afiinsus Zn(II) suhtes. apoE4-l on nendes positsioonides arginiin, mille seondumise afiinsus tsingi suhtes on madal. Seda kinnitavad uuringud, milles apoE2 kaitseb tsingi poolt põhjustatud A β ladestumise vastu, mis tõestab taaskord apoE2 kaitsvat toimet (Karlin & Zhu, 1997; Moir et al., 1999; Xu et al., 2014). Veelgi enam, apoE võib teatud määral ajus tsingi homöostaasi mõjutada. apoE taseme langus ajus mõjutab ZnT3 tootmise vähenemist, mis, nagu varem mainitud, mängib rolli AT patogeneesis, suurendades A β ladestumist (Lee et al., 2010; Zhang et al., 2022).

Vase puhul toimub vastupidine protsess — A β agregatsioon apoE juuresolekul suureneb ja põhjustab vase ladestumist A β -ga (Moir et al., 1999). Sarnaselt tsingiga, oletatakse, et tsüsteiinijäägid võivad vase sidumisel mängida olulist rolli ja vask võib seostuda apoE2-ga tugevamini kui apoE3 ja apoE4-ga (Hung et al., 2013; Xu et al., 2014). Seda oletust kinnitab ka fakt, et vasest põhjustatud A β agregatsioon on apoE4 puhul rohkem väljendunud kui teiste isovormide puhul (Moir et al., 1999). Selle põhjal, oletatakse, et apoE antioksidatiivne aktiivsus kahaneb üle minnes apoE2-lt apoE3-le ja apoE4-le, mis võib olla seotud vaseioonide ja apoE interaktsioonidega (Hung et al., 2013; Miyata & Smith, 1996).

apoE mõjutab sõltuvalt isovormidest ka raua homöostaasi. Näiteks on apoE4 võimeline kiirendama raua akumulatsiooni (Zhang et al., 2022). Kuid üks uuring näitas, et apoE

puudumine võib samuti põhjustada raua akumulereerumist, mis võib viia omakorda AT tekkeni (Ma et al., 2021). apoE2 ja apoE3 on võimelised kaitsma rakke apoptoosi eest, mida tekitab vesinikperoksiid (Gao et al., 2021; Zhang et al., 2022). Järeldatakse, et ferroptoosi ja apoE vahel võib ka esineda seos, kuid selle selgitamiseks on vaja rohkem uuringuid. Ferroptoosi tekitab raua homöostaasi häire, mis põhjustab suurenenud lipiidide oksüdatsiooni ja sellele järgnevat rakusurma (Zhang et al., 2022).

Kokkuvõtteks mainime, et tänaseks on mitmed uuringud kinnitanud, apoE võimet interakteeruda AT ajal tsink-, vask- ja raudioonidega, mis omakorda mõjutab A β homöostaasi, apoptoosi ja teisi AT-s olulist rolli mängivaid protsesse. Siiski on veel palju vastamata küsimusi, mis aitaksid mõista apoE ja metallide vahelise interaktsiooni täpset mehhanismi, mis võib mängida AT-s olulist rolli (Zhang et al., 2022).

2. Töö eesmärk

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks on uurida, kas Zn(II) ja Fe(II) ioonid seostuvad isovormidega apoE2, apoE3 ja apoE4 ning seostumise olemasolul ka uurida, kui tugev see interaktsioon on iga isovormi puhul pH 7,3 (organismi füsioloogiline pH) ja pH 5,0 juures.

Töös püstitati 2 hüpoteesi: 1. apoE2 isovormi seostumine tsinkioonidega on võrreldes teiste isovormidega tugevam tänu tsüsteiinijääkide olemasolule, millel on tugev afiinsus tsinkioonide suhtes; 2. pH 5,0 juures on apoE isovormide vahel metalliioonide vaheline seostumine nõrgem, kui pH 7,3 juures, kuna histidiinijäägid protoneeritakse.

Püstitatud eesmärkideni jõudmiseks viidi läbi järgmised katsed:

- valmistati proovid apoE isovormidega, mille massi kontrolliti MALDI-TOF MS abil
- mõõdeti apoE autofluorestsentsi fluorestsentsstiitrimise meetodiga kasvava metalliioonide kontsentratsiooni tingimustes
- teostati seostumisandmete analüüs ja leiti dissotsiatsioonikonstantide (K_D) väärtused iga interaktsiooni puhul

3. Materjalid ja meetodid

3.1. Teoreetiline kirjeldus

3.1.1. MALDI TOF MS

MALDI tähendab maatriksassisteeritud laser desorptsiooni/ionisatsiooni. MALDI on massispektromeetria (MS) ionisatsioonimeetod, mille käigus toimub proovide pehme ionisatsioon ehk laengu omandamine ja seejärel saab mõõta osakeste massi/laengu suhet. Pehmeks ionisatsiooniks kasutatakse lühiimpulsi lämmastiklaserit, mis võimaldab säilitada ioniseeritud molekulide struktuuri. Sobib peamiselt biomolekulidele (valgud, nukleiinhapped, suhkrud) (Gandhi et al., 2013; Saraswathy & Ramalingam, 2011).

Tööks kasutati MALDI TOF MS instrumenti Microflex (Bruker). Laser mõjub uuritavat ainet sisaldavale maatriksile. Maatriksi molekulid neelavad laseri energiat ja desorbeeruvad koos analüüdiga pinnalt. Maatriks ioniseerib analüüdi ja suunab laetud osakesed gaasifaasi vaakumisse. Vaakum on vajalik ionide laengu säilitamiseks. TOF – lennuaja massi analüsaator, mille töö põhineb ionide eraldamisel lennuaja järgi, mis on proportsionaalne osakeste massi/laengu suhtega. Detektor fikseerib kõiki eraldatud ioone ja muundab signaali elektriliseks. Arvutis genereeritakse graafik, kus x-teljel on massi-laengu suhe ja y-teljel on osakese arv või signaali intensiivsus.

Maatriks on tavaliselt orgaaniline hape, mis on võimeline prootoneid analüüdile üle kandma. Maatriksi põhiomaduste hulka kuuluvad: võime neelata kiirgust, kristalliseeruda koos analüüdiga ja lahustuda sobivates lahustites. Peamiseks kasutatav maatriks on α -tsüano-4-hüdroksükaneelhape, mille valmistamiseks kasutatakse signaali stabiliseerivat trifluoroäädikhapet (TFA) ja atsetonitriili (AcN) (Leopold et al., 2018).

3.1.2. Fluorestsentspektroskoopia

Fluorestsentspektroskoopia meetod põhineb uuritava aine fluorestsentsomadustel. Fluorestsentspektroskoopias ergastatakse aine molekule kiiritades neid valgusega kindlal lainepikkusel, mida nimetatakse ergastuslainepikkuseks. Selle tulemusena liiguvad elektronid põhiolekust ergastatud olekusse (kõrgemale energiatasemele). Seejärel relakseeruvad molekulid ja kiirgavad fluorestseerudes footoneid teisel lainepikkusel ning naasevad põhiolekusse.

Tööks kasutati LS-55 fluorestsentspektromeetrit (PerkinElmer), mis ergastab proovi ksenoonlambi abil. Valgus läbib ergastusmonokromaatorit. Valitud lainepikkus ergastab proovis olevaid fluorestseeruvaid molekule. Proov asub kvartsküvetis, mis annab täpsemaid tulemusi UV- kiirguse vahemikus. Pärast ergastamist kiirgavad molekulid teise lainepikkusega valgust, mis läbib emissioonimonokromaatorit. See eraldab huvipakkuva lainepikkuse detektoriga tuvastamiseks. Detektor omakorda võimendab signaali, mida seejärel arvuti analüüsib. LS-55 kasutab hajutatud valguse vähendamiseks ja tundlikkuse suurendamiseks holograafilisi võresid. See seade on varustatud magnetsegajaga.

Fluorofoor on aine, mis võib fluorestseeruda. Need ained sisaldavad mitut ühendatud aromaatsset rühma või mitme π -sidemega struktuuri (Uslu et al., 2022). Üldiselt molekulid ei fluorestseeru, kuid neid saab "märgistada" fluorimeetrilise reagentiga, mida nimetatakse ka väliseks fluorofooriks. Sisemisel fluorofooril on fluorestseeruvad omadused natiivsel kujul, see tähendab, et sellised ained fluorestseeruvad iseenesest (autofluorestsents), näiteks flaviinid ja aromaatsed aminohapped, nagu trüptofaan, türosiin ja fenüülalaniin, millel on aromaatsed ringstruktuur. Nad on võimelised UV-kiirguse toimetel teatud lainepikkustel nõrgalt fluorestseeruma. Töös uuriti trüptofaani autofluorestsentsi, mis on apoE struktuuris. Trüptofaanil on suurem kvantefektiivsus kui teistel aminohapetel, see tähendab, et ta kiirgab välja suurema hulga footoneid. See on tundlik ümbritsevate aminohapete suhtes, võimaldades seda kasutada erinevate valk-ligandi interaktsioonide uurimiseks (Lakowicz, 1999). Trüptofaani ergastuse lainepikkus on 270-280 nm ja emissiooni lainepikkus 340-360 nm (Ghisaidoobe & Chung, 2014). Fluorestsentsi maksimum on ligikaudu 350 nm juures. Fluorestsentsi võivad mõjutada mitmesugused tegurid, nagu temperatuur, valgu konformatsioonilised muutused ja interaktsioonid, disulfiidsildade olemasolu või histidiinijääkide protoneerimine (Lakowicz, 1999).

3.2. Eksperimentaalse töö kirjeldus

3.2.1. apoE proovide ettevalmistus

Lüofiliseeritud apoE2 (AE-100-10, AlexoTech AB), apoE3 (AE-101-10, AlexoTech AB) ja apoE4 (AE-102-10, AlexoTech AB) isovormid puhtusega üle 95% säilitati temperatuuril -20°C . Valgud oli toodetud rekombinantset, positsioonis -1 on metioniinijääk. Enne kasutamist lahustati apoE üles 5 mM NaOH-s (30620-1KG-R, Honeywell Fluka) II tüüpi vee (TKA LabTower) lisamisega kontsentratsioonini 50 μM . Seejärel inkubeeriti proove 4°C juures vähemalt 1 tund. Lõpuks jagati proovid 14 μM alikvootideks.

3.2.2. apoE massi kontrollimine MALDI TOF MS abil

Töös kasutati 10 mg/ml maatriksit, mis koosnes α -tsüano-4-hüdroksükaneelhappest (C2020-25G, Sigma), 0,3% TFA-st (10294110, Fisher Chemical), 60% AcN-st (34851-2.5L, Sigma), mida hoiti valguse eest kaitstud kohas temperatuuril 4°C . Uuritav massivahemik oli 10000-75000 Da ja laseri intensiivsus 37%, mis ergastab proovi 337 nm lainepikkusega. Proovi valmistati 3 μl maatriksist ja 1 μl apoE-st, mis segati umbes 20 korda pipetiga. Tehti kaks 1 μl paralleeli MALDI plaadile (Microscout Bruker 96 täpiga) ja jäeti need õhu käes kuivama. Lahusti aurustub ja analüüdi molekulid jäävad maatriksi sisse. Plaat asetatakse MS masinasse, kus seda mõjutab laser. Detektorilt saadud signaal kuvatakse flexControl programmis spektrina. Kuna analüüdi jaotus maatriksis ei ole polaarsuse erinevuste tõttu ühtlane, on vaja laserit kasutada mitmes kohas, kus uuritav aine asub. Protseduuri korratakse mitu korda, misjärel spektrid summeeritakse. Analüüsiks kasutati programmi flexAnalysis. Joonised on tehtud programmi OriginPro abil.

3.2.3. Tsingi ja raua soolade lahjenduste ettevalmistamine tiitrimiseks

Tsingi ionidega tiitrimisel kasutati tsinkatsetaathüdraati ($\text{Zn}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (12431562, Scharlab), mis lahjendati II tüüpi vee abil kontsentratsioonini 0,1 M. Tsingi 12 mM, 6 mM, 3

mM, 1,2 mM, 0,6 mM ja 0,3 mM lahjendused tehti 20 mM 2-(N-morfolino)etaansulfoonhappe puhvriga (MES) (69892-25G, Sigma), mille pH oli 7,3 või 5,0 sõltuvalt katsetest.

Raua ionidega tiitrimisel kasutati raudkloriidtetrahüdraati ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) (44939-50G, Sigma), mis oli valmistatud koos naatriumditioniidiga ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) (71699-50G, Sigma), et vältida raua oksüdatsiooniasuste muutumist. Kõigepealt lahustati $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ degaseeritud II tüüpi vees. Lisati 2,6 M NaOH kuni pH jõudis kuueni ning pärast lisati segule $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, et Fe(II)iooni lahuse lõpp kontsentratsioon oleks 10 mM ja naatriumditioniidil 100 mM. Raua 10 mM, 6 mM, 3 mM, 1,2 mM, 0,6 mM, 0,3 mM ja 0,15 mM lahjendused tehti degaseeritud II tüüpi veega.

3.2.4. Trüptofaani fluorestsentsi intensiivsuse mõõtmine ja K_D leidmine

Tsingiga tiitrimisel segati lahust kvartsküveti, kasutades 50 μM apoE, 200 mM MES puhvrit ja II tüüpi vett, mis andis 600 μl proovi, mis sisaldas 0,2 μM apoE valku ning 20 mM MES puhvrit.

Rauaga tiitrimisel segati kvartsküveti lahust, mis kasutades 50 μM apoE, 200 mM MES puhvrit, 300 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ja II tüüpi vett, mis andis 600 μl proovi, mis sisaldas 0,1 μM apoE ning 20 mM MES puhvrit.

Mõõtmiseks kasutati FIWinLab programmi, kus lülitakse sisse lamp ja toimuvad mõõtmised. Alustuseks viidi katsed läbi ilma metalli lisamata, mille tulemusena fluorestsents mõningal määral kustus kuni platoo saavutamiseni. Hiljem lahutati metallide lisamisega tehtud katsete puhul kontrollkõverad (enne metalli lisamist). 1 μl metalli sisaldavat lahust tiitriti küveti, suurendades kontsentratsiooni. Lisamiste vahel segati lahust 30 sekundit. Lahust ergastati 270 nm juures, kasutades 700 V võimsust ja fluorestsentsi mõõdeti 345 nm juures. Tiitrimine jätkus seni, kuni väärtuse muutumine lakkas. Iga tiitrimine viidi läbi 3 korda. Joonised on tehtud programmi OriginPro abil. X-teljel on metalli kontsentratsioon ja Y-teljel on fluorestsentsi intensiivsus 345 nm juures. Seejärel kõverad normaliseeriti ja dissotsiatsioonikonstandid (K_D) leiti kõverate lähendamisega, kasutades kas Hilli võrrandit või hüperboolset sidumisvõrrandit. Mida väiksem on K_D väärtus, seda tugevam on seostumine.

$$Y = \frac{I_{\max} * X}{I_{0,5} + X} + I_f * X \quad (1)$$

See on hüperboolne sidumisvõrrand, kus I_{\max} – trüptofaani fluorestsentsi intensiivsus, juhul kui metallioon on seotud, $I_{0,5}$ – metallioonide kontsentratsioon, mille puhul trüptofaani intensiivsus on 50% I_{\max} -st, see on võrdne K_D -ga, I_f – lineaarne foon, see on ainel endal esinev mitmesugune efekt ilma sidumata, mis kustutab fluorestsentsi

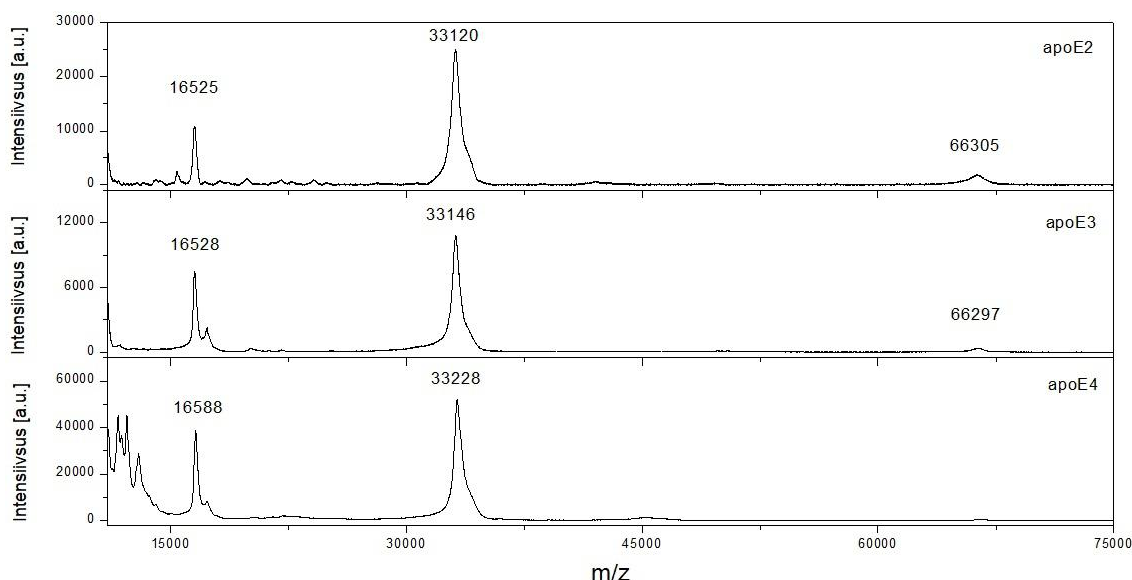
$$Y = \frac{I_{\max} * X^n}{I_{0,5}^n + X^n} \quad (2)$$

See on Hilli koefitsientiga valem, kus I_{\max} – trüptofaani fluorestsentsi intensiivsus, juhul kui metallioon on seotud, n–Hilli koefitsient, mis näitab molekulide arvu, mis iseloomustavad kooperatiivsust ehk kas ühe ligandi sidumine parandab afiinsust teise suhtes, $I_{0,5}$ – metallioonide kontsentratsioon, mille puhul trüptofaani intensiivsus on 50% I_{\max} -st, see on võrdne K_D -ga.

4. Tulemused

4.1. MALDI TOF MS tulemused

apoE tootja kinnituse kohaselt on valgu puhtus üle 95%. Seda kontrolliti enne tiitrimist MALDI TOF MS meetodiga, et saada informatsiooni ka molekulmassi kohta. apoE isovormide teoreetilised massid on järgmised: apoE2 - 34315 Da, apoE3 - 34368 Da, apoE4 - 34421 Da. Graafik näitab, et apoE2 mass on 33120 Da, apoE3-l 33146 Da ja apoE4-l 33228 Da, mis on oodatust veidi väiksemad. Masside erinevuse põhjused pole hetkel teada, kuid need võivad olla seotud rekombinantse valgu järjestuse erinevusest teoreetilisest järjestusest. Lisaks huvipakkuvale üksiku laenguga valgule näitab graafik kahekordse laenguga valke, mille mass on ligikaudu pool huvipakkuva valgu massist, mis kinnitab valgu võimet liita prootoneid. Samuti on uuritavast valgust kaks korda suurema massi korral nähtavad dimeerid, mis tähendab valgu võimet moodustada omavahel agregate.

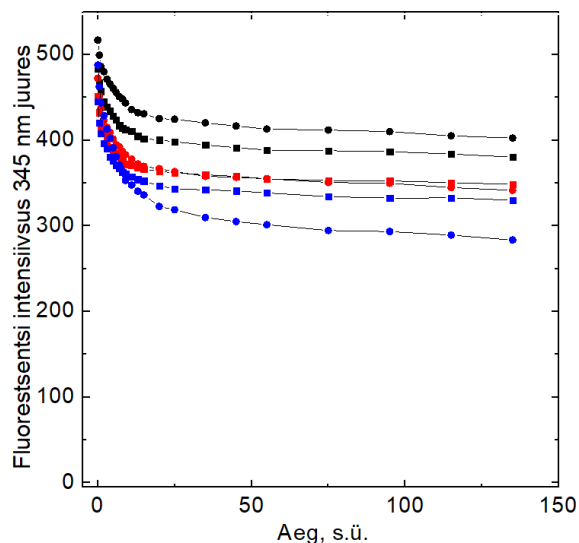


Joonis 3. apoE isovormide MALDI TOF MS spektrid. Ülemine apoE2 spekter näitab, et kahekordse laenguga valk on esindatud massiga 16525 Da, ühekordselt laetud valk massiga 33120 Da (meile huvipakkuva valgu praktiline mass) ja dimeer massiga 66305 Da. Keskel olev apoE3 spekter näitab, et kahekordse laenguga valk on esindatud massiga 16528 Da, ühekordselt laetud valk massiga 33146 Da (meile huvipakkuva valgu praktiline mass) ja dimeer massiga 66297 Da. Alumine apoE4 spekter näitab, et kahekordse laenguga valk on esindatud massiga 16588 Da, ühekordselt laetud valk massiga 33228 Da (meile huvipakkuva valgu praktiline mass), dimeeri on raske tuvastada.

4.2. Fluorestsentspektroskoopia tiitrimise tulemused

Enne tiitrimist viidi läbi katsed apoE-ga, kus täheldati trüptofaani autofluorestsentsi ja selle intensiivsuse nõrgenemist valguse mõjul teatud punktini. Mõõtmised toimusid iga 30 sekundi tagant (Joonis 4).

**apoE isovormide fluorestsentsi
mõõtmise ilma metalliioonide
lisamiseta**



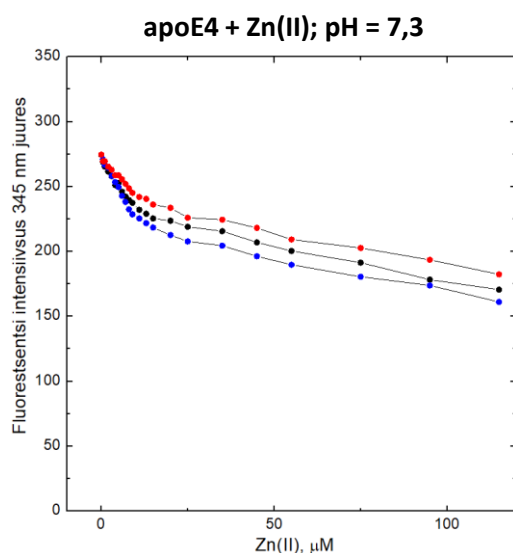
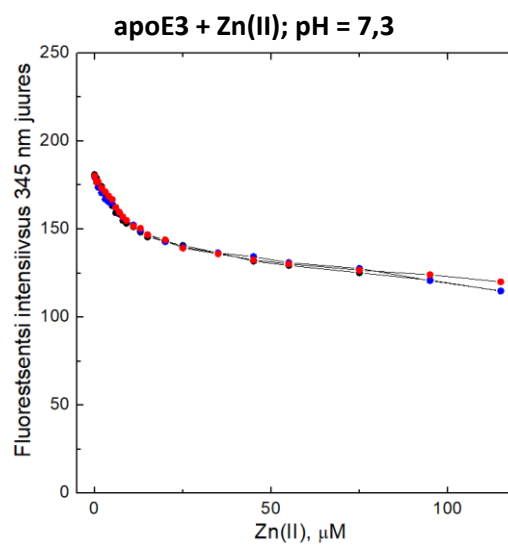
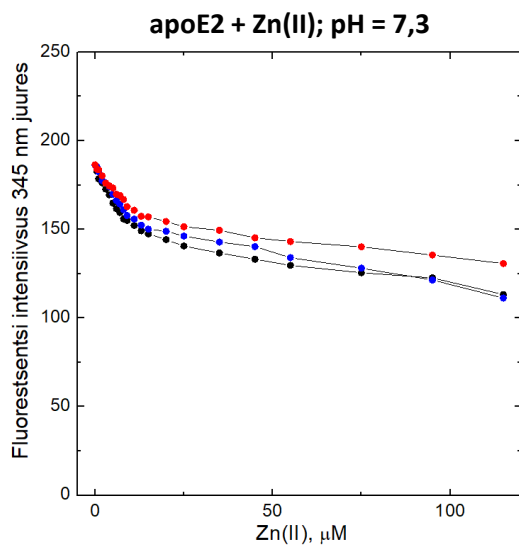
Joonis 4. Kontrollkõverad, mis näitavad trüptofaani fluorestsentsi intensiivsuse muutust (345 nm juures) apoE2, apoE3 ja apoE4 korral ilma metallide lisamiseta pH 5,0 ja 7,3 juures. Must - apoE2; punane - apoE3; sinine - apoE4; ringid - pH=5,0; ruudud - pH=7,3. apoE isovormide kontsentratsioon 0,2 μ M.

Fluorestsentsi intensiivsuse languse täpne põhjus pole teada. Kuid võib eeldada, et apoE võib vähemal määral interakteeruda MES puhvriga ja UV-kiirgusega kokkupuude võib ka autofluorestsentsi kustutada. Tugevamat kustutamist täheldatakse apoE4 puhul, seejärel apoE3 ja kõige vähem apoE2, mis võib viidata arginiini osalemisele. apoE4 puhul täheldati ka mõningast erinevust pH väärtuste vahel.

Metalli seondumise määramisel apoE isovormidega lahutati tiitrimistulemustest kontrollkõverad. Selle tulemusena saadi kõverad, mis kirjeldavad metalliioonide mõju trüptofaani fluorestsentsi kustutamisele.

4.2.1. Fluorestsentspektroskoopia tiitrimise tulemused Zn(II) ionidega

Esmalt viidi katsed läbi pH 7,3 juures ehk füsioloogilise pH juures. Tsingi ionidega tehtud katsed näitasid trüptofaani fluorestsentsi intensiivsuse kergest langust (Joonis 5). Samas ei täheldata olulisi erinevusi isovormide vahel kui võrrelda K_D väärtusi apoE2-l $K_D = 8,65 \pm 1,55 \mu$ M, apoE3-l $K_D = 11,17 \pm 2,87 \mu$ M ja apoE4-l $K_D = 8,73 \pm 1,99 \mu$ M (Tabel 1).

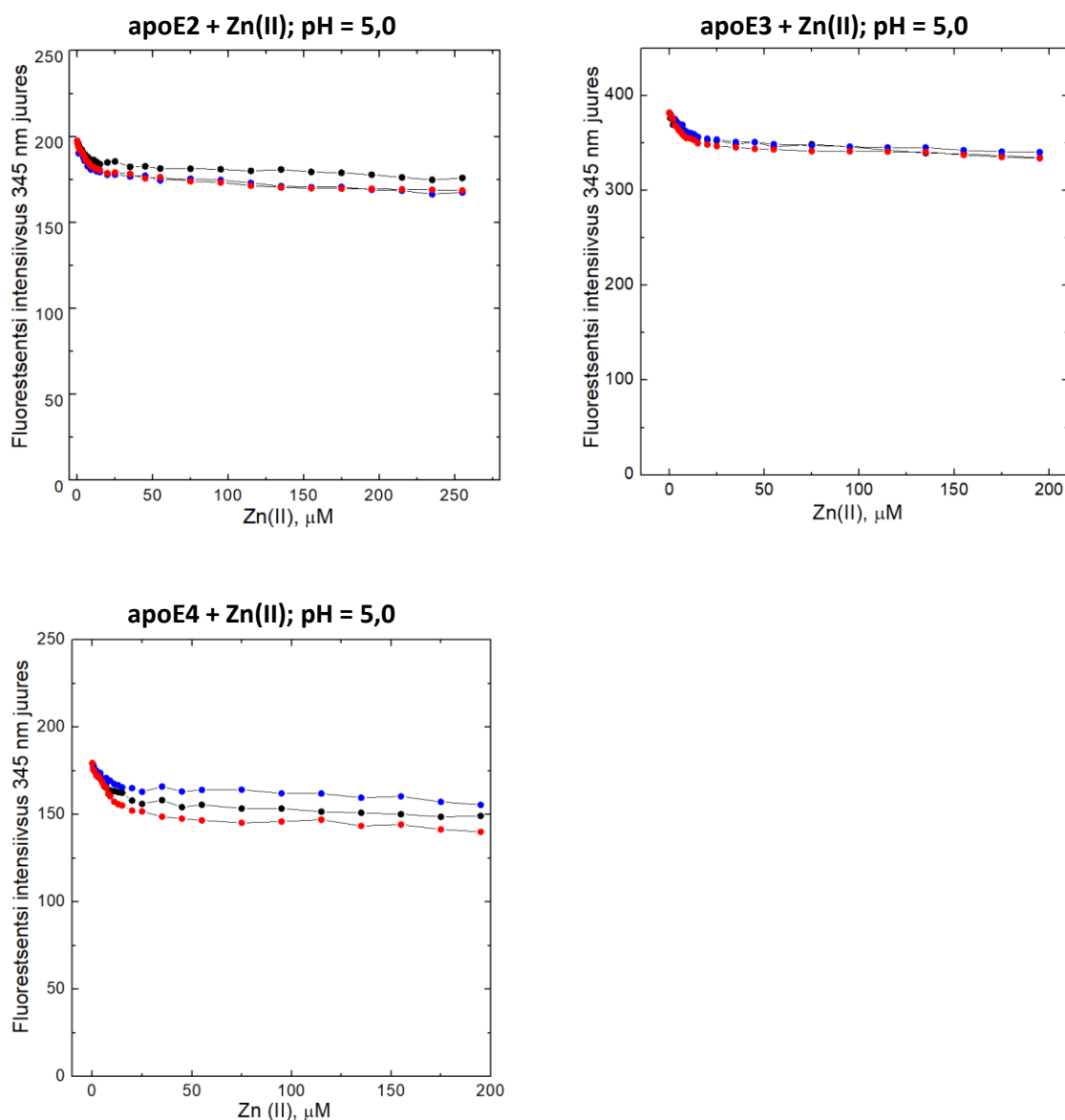


Joonis 5. apoE trüptofaani fluorestsentsi intensiivsuse kustutamine Zn(II) ionide lisamisel pH 7,3 juures. Must - esimene katse; sinine - teine katse; punane - kolmas katse. apoE isovormide kontsentratsioon 0,2 μM .

Tabel 1. K_D väärtused (μM), mis näitavad apoE isovormide ja Zn(II) ionide vahelise interaktsiooni tugevust pH 7,3 juures. Toodud K_D väärtused on leidnud kasutades lähendamiseks hüperboolset sidumisvõrrandit (valem 1).

	Tiitrimine 1	Tiitrimine 2	Tiitrimine 3	Keskmine K_D
apoE2	$7,68 \pm 0,68$	$7,83 \pm 1,40$	$10,44 \pm 1,22$	$8,65 \pm 1,55$
apoE3	$9,61 \pm 0,89$	$9,41 \pm 0,95$	$14,48 \pm 1,35$	$11,17 \pm 2,87$
apoE4	$6,44 \pm 0,82$	$9,76 \pm 1,30$	$10,00 \pm 1,41$	$8,73 \pm 1,99$

Järgmisena viidi läbi katsed pH 5 juures, et näha, kas histidiini jäägid osalevad Zn(II) interaktsioonis apoE isovormidega. Graafikud näitavad, et happelises keskkonnas tiitrimisel täheldatakse fluorestsentsi intensiivsuse väiksemat langust võrreldes füsioloogilise pH-ga (Joonis 6).



Joonis 6. apoE trüptofaani fluorestsentsi intensiivsuse kustutamine Zn(II) ionide lisamisel pH 5,0 juures. Must - esimene katse; sinine - teine katse; punane - kolmas katse. apoE isovormide kontsentratsioon 0,2 μM.

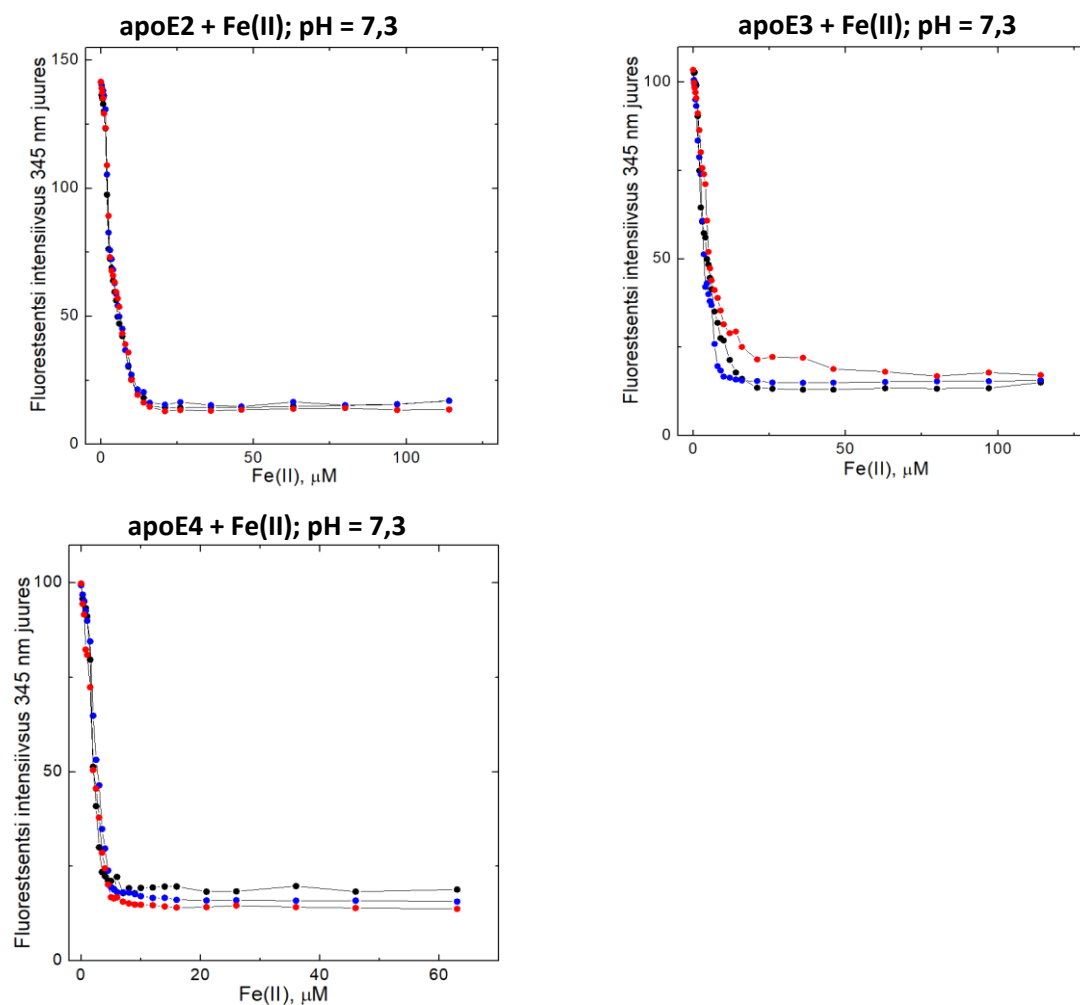
pH 5,0 juures on K_D väärtused mõnevõrra madalamad, mis tähendab, et sidumine muutus tugevamaks. See on vastuolus hüpoteesiga, et histidiini protoneerimisel muutub apoE ja metalliooni vaheline seos nõrgemaks. Siiski on näha, et apoE2 ($K_D = 5,09 \pm 1,48 \mu\text{M}$) seob Zn(II) ioone tugevamini kui teised isovormid (Tabel 2).

Tabel 2. K_D väärtused (μM), mis näitavad apoE isovormide ja Zn(II) ionide vahelise interaktsiooni tugevust pH 5,0 juures. Toodud K_D väärtused on leidnud kasutades lähendamiseks hüperboolset sidumisvõrrandit (valem 1).

	Tiitrimine 1	Tiitrimine 2	Tiitrimine 3	Keskmine K_D
apoE2	$4,18 \pm 0,55$	$4,29 \pm 0,53$	$6,80 \pm 0,51$	$5,09 \pm 1,48$
apoE3	$6,71 \pm 1,16$	$9,44 \pm 0,96$	$6,27 \pm 0,56$	$7,47 \pm 1,72$
apoE4	$7,55 \pm 0,77$	$4,40 \pm 0,88$	$9,64 \pm 1,06$	$7,20 \pm 2,64$

4.2.2. Fluorestsentspektroskoopia tiitrimise tulemused Fe(II) ionidega

Katsed Fe(II) ionidega näitasid teistsugust sidumiskõverat võrreldes Zn(II) ionidega. Fe(II) ionide kontsentratsiooni suurenemisega täheldati trüptofaani fluorestsentsi intensiivsuse tugevat kustutamist. Lisaks on näha esmalt aeglast ja seejärel tugevat fluorestsentsi kustutamist, mis viitab mitmeetapilisele seostumisele (Joonis 7).



Joonis 7. apoE trüptofaani fluorestsentsi intensiivsuse kustutamine Fe(II) ionide lisamisel pH 7,3 juures. Must - esimene katse; sinine - teine katse; punane - kolmas katse. apoE isovormide kontsentratsioon $0,1 \mu\text{M}$.

K_D väärtused näitavad Fe(II) ionide tugevamat sidumist kui Zn(II) ionid. Siiski on näha, et apoE4 ($K_D = 2,01 \pm 0,27 \mu\text{M}$) seob Fe(II) ioone veidi tugevamalt kui teised isovormid (Tabel 3).

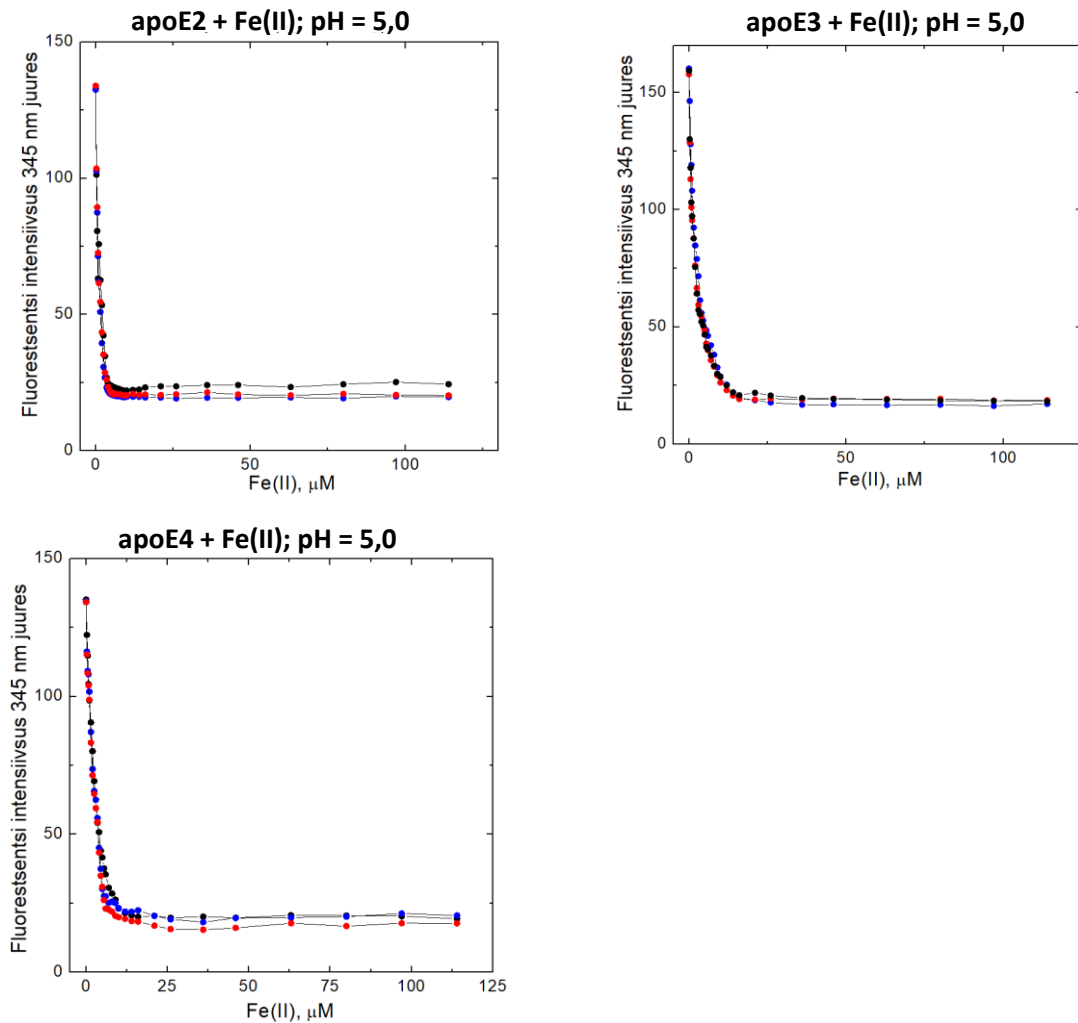
K_D väärtuste leidmiseks kasutati Hilli valemit, kus Hilli koefitsiendid olid alati suuremad kui 1, mis näitab positiivse kooperatiivsuse olemasolu ehk ühe Fe(II)iooni lisamine muudab apoE kättesaadavaks teise Fe(II)iooni sidumiseks, mis omakorda suurendab afiinsust järgmise iooni suhtes (Joonis 7).

Tabel 3. K_D väärtused (μM), mis näitavad apoE isovormide ja Fe(II) ionide vahelise interaktsiooni tugevust pH 7,3 juures. Toodud K_D väärtused on leidnud kasutades lähendamiseks Hilli võrrandit (valem 2).

	Tiitrimine 1	Tiitrimine 2	Tiitrimine 3	Keskmine K_D
apoE2	$3,06 \pm 0,10$ $n = 1,75 \pm 0,10$	$3,34 \pm 0,11$ $n = 1,90 \pm 0,11$	$3,43 \pm 0,11$ $n = 1,75 \pm 0,10$	$3,28 \pm 0,19$
apoE3	$3,59 \pm 0,10$ $n = 1,69 \pm 0,08$	$3,09 \pm 0,08$ $n = 2,09 \pm 0,11$	$4,34 \pm 0,12$ $n = 1,85 \pm 0,09$	$3,67 \pm 0,63$
apoE4	$1,87 \pm 0,03$ $n = 3,84 \pm 0,22$	$2,33 \pm 0,04$ $n = 3,00 \pm 0,15$	$1,84 \pm 0,06$ $n = 2,22 \pm 0,13$	$2,01 \pm 0,27$

Tiitrimisel pH 5,0 juures saadud kõverad näitavad alguses lag faasi puudumist, mis esines pH 7,3 juures. Fluorestsentsi kustutamist täheldatakse kohe pärast tiitrimise algust (Joonis 8).

K_D väärtused näitasid pH 5,0 juures taas tugevamat seondumist kui pH 7,3 juures. Sel juhul seob apoE2 kõige tugevamalt Fe(II) ioone ($K_D = 0,66 \pm 0,01 \mu\text{M}$) (Tabel 4). Lähendamiseks kasutati ka Hilli võrrandit, kus kõik Hilli koefitsiendid olid ligikaudu võrdsed ühega, mis tähendab kooperatiivsuse puudumist või positiivse kooperatiivsuse nõrkust.



Joonis 8. apoE trüptofaani fluorestsentsi intensiivsuse kustutamine Fe(II) ionide lisamisega pH 5,0 juures. Must - esimene katse; sinine - teine katse; punane - kolmas katse. apoE isovormide kontsentratsioon 0,1 μM .

Tabel 4. K_D väärtused (μM), mis näitavad apoE isovormide ja Fe(II) ionide vahelise interaktsiooni tugevust pH 5,0 juures. Toodud K_D väärtused on leidnud kasutades lähendamiseks Hilli võrrandit (valem 2).

	Tiitrimine 1	Tiitrimine 2	Tiitrimine 3	Keskmine K_D
apoE2	$0,65 \pm 0,06$ $n = 1,19 \pm 0,13$	$0,66 \pm 0,02$ $n = 1,43 \pm 0,07$	$0,67 \pm 0,03$ $n = 1,38 \pm 0,08$	$0,66 \pm 0,01$
apoE3	$1,33 \pm 0,05$ $n = 0,98 \pm 0,03$	$1,87 \pm 0,05$ $n = 1,09 \pm 0,04$	$1,37 \pm 0,06$ $n = 0,95 \pm 0,05$	$1,52 \pm 0,3$
apoE4	$1,93 \pm 0,07$ $n = 1,38 \pm 0,06$	$1,75 \pm 0,09$ $n = 1,47 \pm 0,10$	$1,76 \pm 0,09$ $n = 1,43 \pm 0,10$	$1,81 \pm 0,1$

5. Arutelu

Alzheimeri tõve tekkemehhanism on endiselt ebaselge. Haiguse käigus täheldatakse A β peptiidide ladestumist, mis põhjustab neuronite surma. Mõned uuringud kinnitavad seost *apoE* geeni - tugeva geneetilise teguri ja metalliioonide vahel, mis seostuvad A β peptiidide ja amüloidsete naastudega ning ladestuvad ajus. Suurtes kogustes ladestuvad peamiselt tsink-, vask- ja raudioonid (Xu et al., 2014). Lisaks on uuringuid, mis kinnitavad erinevate apoE isovormide erinevaid interaktsioone metalliioonidega. Kirjanduses on andmed, mille kohaselt näiteks apoE2, mis on kaitsefaktor, seob tsingioone tugevamini kui teised isovormid ja võib kaitsta A β ladestumise eest (Moir et al., 1999). On ka näidatud, et apoE4 on võimeline kiirendama raua akumulatsiooni (Zhang et al., 2022). Olemasolevad andmed on huvitavad ja väärivad edasist uurimist ja kinnitust.

Selles töös mõõdeti fluorestsentsstiirimise meetodil apoE struktuuris esineva trüptofaani autofluorestsentsi muutust metalliioonide, nimelt Zn(II) ja Fe(II) ionide kontsentratsiooni suurenemise tingimustes. Trüptofaani fluorestsents on teadaolevalt tundlik teda ümbritsevale keemilisele keskkonnale ja selle muutustele ligandi ja valgu interaktsiooni tõttu. Saadud tulemused kinnitasid apoE isovormide võimet siduda neid metallioone füsioloogilise pH juures (pH 7,3). Lisaks täheldati erinevat sidumismehhanismi. Zn(II) ionid seonduvad apoE-ga väiksema tugevusega ja mõjusid nõrgalt trüptofaani autofluorestsentsile. Kui Fe(II) ionid lisati madalates kontsentratsioonides, kustutasid nad fluorestsentsi vähe, kuid kontsentratsiooni tõuses fluorestsentsi kustutamine suurenes märkimisväärselt, mis viitab kooperatiivsete protsesside esinemisele ning mitmeetapilisele Fe(II) ionide seostumisele. Fe(II) ionid seonduvad mõningal määral tugevamini, kui Zn(II) ionid. Siiski ei täheldatud olulisi erinevusi apoE isovormide seostumise vahel iga metalliooni puhul. See tähendab, et tõenäoliselt ei osale tsüsteiini- ja arginiinijäägid seondumises, mis eristavad apoE isovorme, ning seondumine toimub sarnaste sidumissaitide kaudu. Seetõttu lükatakse ümber selles töös püstitatud hüpotees, et apoE2 seob tsingioone kõige tugevamini. Siiski on apoE metalleerimise interaktsiooni uurimiseks vaja täiendavaid uuringuid, kasutades ka teisi meetodeid.

Katsed viidi läbi ka pH 5,0 juures, et näha, kas histidiinijäägid osalevad interaktsioonis. Kuna madala pH juures on histidiinijäägid protoneeritud, siis selline vorm ei saa metallioone hästi siduda. Võrreldes pH 7,3-ga täheldati pH 5,0 puhul vaid kergest muutust seondumisomadustes, mis viitab suure tõenäosusega histidiinijääkide mitteosalemisele Fe(II) ja Zn(II) ionide seondumises apoE-ga. Tõenäoliselt osalevad mõlema metalliooni seondumises teised aminohappejäägid.

Saadud tulemused viitavad vajadusele täiendavalt uurida apoE interaktsioone metallidega, et saada lisateavet apoE seondumiskohtade kohta Fe(II) ja Zn(II) ionidega.

Kokkuvõte

Alzheimeri tõbi (AT) on kõige levinum dementsuse vorm, mis avaldub peamiselt pärast 65. eluaastat. Eeldatava eluea pikenemisega suureneb ka AT-ga patsientide arv. Praegu pole aga teada ei haiguse täpset tekkemehhanismi ega tõhusat ravimeetodit. Haiguse korral on häiritud metallide nagu tsingi, vase ja raua homöostaas. On teada, et need metallid võivad interakteeruda apoE isovormidega, millel on oluline roll haiguse tekkes. Seega võib selle interaktsiooni mõistmine anda ülevaate AT tekke mehhanismidest ja võimalikest ravimeetoditest.

Selle töö eesmärk oli uurida Zn(II) ja Fe(II) ionide interaktsioon apoE isovormidega, mõista, kui tugev seondumine on iga isovormi puhul ning uurida seondumist füsioloogilise ja happelise pH juures. Interaktsiooni uurimise meetodiks oli fluorestsentsstiitrimine, kus metalliioonide kasvava kontsentratsiooni tingimustes täheldati apoE struktuuris trüptofaani autofluorestsentsi kustutamist.

Saadud andmete põhjal võime öelda, et kahel metalliioonil on erinev sidumismehhanism ja apoE isovormid seostuvad Fe(II) ionidega tugevamini kui Zn(II) ionidega. Kasutatud meetod ei näidanud olulisi K_D väärtuste erinevusi apoE isovormide ega ka erinevate pH väärtuste puhul. Seetõttu võib eeldada, et histidiini-, tsüsteiini- ja arginiinijäägid ei osale nende kahe metalliiooni seondumises, mis eristavad apoE isovorme üksteisest.

Et kinnitada järeldusi, et erinevate apoE isovormide ja metalliioonide seondumise vahel ei ole erinevusi, on vaja kontrollida seostumist täiendavate meetoditega või teha lisakatseid, mis võiksid anda täpsema kinnituse histidiini-, arginiini- ja tsüsteiinijääkide osalemise või mitteosalemise kohta.

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia, occurring primarily after age 65. As life expectancy increases, the number of patients with AD also increases. However, neither the mechanism of the disease nor an effective treatment method is currently known. In the case of the disease, patients experience a disturbance in the homeostasis of metals such as zinc, copper, and iron. It is known that these metals can interact with apoE isoforms, which play an important role in the development of the disease. Thus, understanding this interaction may provide insight into the mechanisms of AD development and help to elaborate potential treatments.

The purpose of this work was to study the interaction of Zn(II) and Fe(II) ions with apoE isoforms, to understand how strong the binding of each isoform is with both metal ions at physiological and acidic pH values. The method for studying the interaction was fluorescent titration, in which quenching of the autofluorescence of tryptophan located in the apoE structure was observed under conditions of increasing the concentration of metal ions.

Based on the data obtained, it can be concluded that the two metal ions have different binding mechanisms and the apoE isoforms bind to Fe(II) ions more strongly than Zn(II) ions. The method used did not show significant differences in K_D values for apoE isoforms, as well as for different pH values. Therefore, it can be assumed that histidine, cysteine and arginine residues are not involved in the binding of these two metal ions, which distinguish the apoE isoforms from each other.

To confirm the conclusion that there is no difference between the binding of metal ions to different apoE isoforms, it is necessary to test the binding by using additional methods or conduct additional experiments that could provide more precise confirmation about the participation or non-participation of histidine, arginine and cysteine residues.

Tänuavaldused

Käesoleva töö autor tahab tänada metalloproteoomika labori inseneri Andra Noormägi toetuse ja laboris juhendamise eest, kes võis mõnda asja mitu korda seletada, kuni see saab selgeks keele mõistmise raskuste tõttu. Suur tänu selle labori professorile Peep Palumaale väga hea juhendamise eest töö valmimise käigus, soovitusi ja keelekorrektuuri eest. Samuti soovib autor tänada Vello Tõugu tema sisukate kommentaaride ja soovitude eest töö tegemiseks.

Tahaks autor ka tänada kõiki uurimisrühma liikmeid, kes oma mõtteid jagasid ja toetavad.

Aitäh kõigile, kes osalesid selle lõputöö ettevalmistamisel.

Kasutatud kirjandus

- Abbaspour, N., Hurrell, R., & Kelishadi, R. (2014). Review on iron and its importance for human health. *Journal of Research in Medical Sciences*, *19*(2), 164–174.
- Adlard, P. A., Parncutt, J. M., Finkelstein, D. I., & Bush, A. I. (2010). Cognitive loss in zinc transporter-3 knock-out mice: A phenocopy for the synaptic and memory deficits of Alzheimer's disease? *Journal of Neuroscience*, *30*(5), 1631–1636. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5255-09.2010>
- Allan Butterfield, D., & Boyd-Kimball, D. (2018). Oxidative Stress, Amyloid- β Peptide, and Altered Key Molecular Pathways in the Pathogenesis and Progression of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, *62*(3), 1345–1367. <https://doi.org/10.3233/JAD-170543>
- Ballard, C., Gauthier, S., Corbett, A., Brayne, C., Aarsland, D., & Jones, E. (2011). Alzheimer's disease. *The Lancet*, *377*(9770), 1019–1031. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61349-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61349-9)
- Barnham, K. J., Masters, C. L., & Bush, A. I. (2004). Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nature Reviews Drug Discovery*, *3*(3), 205–214. <https://doi.org/10.1038/nrd1330>
- Birla, H., Minocha, T., Kumar, G., Misra, A., & Singh, S. K. (2020). Role of Oxidative Stress and Metal Toxicity in the Progression of Alzheimer's Disease. *Current Neuropharmacology*, *18*(7), 552–562. <https://doi.org/10.2174/1570159x18666200122122512>
- Botchway, B. O. A., Liu, X., Zhou, Y., & Fang, M. (2023). Biometals in Alzheimer disease: emerging therapeutic and diagnostic potential of molybdenum and iodine. *Journal of Translational Medicine*, *21*(1). <https://doi.org/10.1186/s12967-023-04220-5>
- Breijyeh, Z., & Karaman, R. (2020). Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules*, *25*(24). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25245789>
- Cai, Y., An, S. S. A., & Kim, S. (2015). Mutations in presenilin 2 and its implications in Alzheimer's disease and other dementia-associated disorders. *Clinical Interventions in Aging*, *10*, 1163–1172. <https://doi.org/10.2147/CIA.S85808>
- Cheignon, C., Tomas, M., Bonnefont-Rousselot, D., Faller, P., Hureau, C., & Collin, F. (2018). Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox Biology*, *14*, 450–464. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.10.014>
- Chen, G. F., Xu, T. H., Yan, Y., Zhou, Y. R., Jiang, Y., Melcher, K., & Xu, H. E. (2017). Amyloid beta: Structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacologica Sinica*, *38*(9), 1205–1235. <https://doi.org/10.1038/aps.2017.28>
- Collins, J. F., & Klevay, L. M. (2011). Copper. *Advances in Nutrition*, *2*(6), 520–522. <https://doi.org/10.3945/an.111.001222>

- Gandhi, K., Lal, D., Kumar, A., Sarkar, P., & Aghav, A. (2013). MALDI-TOF MS: Applications in Dairy and Related Sectors. *Journal of Dairy Science and Technology*, 2(2), 19–27. <https://www.researchgate.net/publication/311494241>
- Gao, H., Zheng, W., Li, C., & Xu, H. (2021). Isoform-specific effects of apolipoprotein E on hydrogen peroxide-induced apoptosis in human induced pluripotent stem cell (Ipsc)-derived cortical neurons. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21). <https://doi.org/10.3390/ijms222111582>
- GBD 2019 Dementia Forecasting Collaborators. (2022). Estimation of the global prevalence of dementia in 2019 and forecasted prevalence in 2050: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet Public Health*, 7(2), e105–e125. [https://doi.org/10.1016/S2468-2667\(21\)00249-8](https://doi.org/10.1016/S2468-2667(21)00249-8)
- Genin, E., Hannequin, D., Wallon, D., Sleegers, K., Hiltunen, M., Combarros, O., Bullido, M. J., Engelborghs, S., De Deyn, P., Berr, C., Pasquier, F., Dubois, B., Tognoni, G., Fiévet, N., Brouwers, N., Bettens, K., Arosio, B., Coto, E., Del Zompo, M., ... Campion, D. (2011). APOE and Alzheimer disease: A major gene with semi-dominant inheritance. *Molecular Psychiatry*, 16(9), 903–907. <https://doi.org/10.1038/mp.2011.52>
- Ghisaidoobe, A. B. T., & Chung, S. J. (2014). Intrinsic tryptophan fluorescence in the detection and analysis of proteins: A focus on Förster resonance energy transfer techniques. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(12), 22518–22538. <https://doi.org/10.3390/ijms151222518>
- Goldberg, T. E., Huey, E. D., & Devanand, D. P. (2020). Association of APOE e2 genotype with Alzheimer's and non-Alzheimer's neurodegenerative pathologies. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18198-x>
- Hardy, J., & Selkoe, D. J. (2002). The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. *Science*, 297(5580), 353–356. <http://doi.org/10.1126/science.1072994>
- Hung, Y. H., Bush, A. I., & Cherny, R. A. (2010). Copper in the brain and Alzheimer's disease. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 15(1), 61–76. <https://doi.org/10.1007/s00775-009-0600-y>
- Hung, Y. H., Bush, A. I., & Fontaine, S. La. (2013). Links between copper and cholesterol in Alzheimer's disease. *Frontiers in Physiology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00111>
- Karlin, S., & Zhu, Z.-Y. (1997). Classification of mononuclear zinc metal sites in protein structures. *Chemistry*, 94(26), 14231–14236. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.26.14231>
- Khanahmadi, M., Farhud, D. D., & Malmir, M. (2015). Genetic of Alzheimer's Disease: A Narrative Review Article. *Iran J Public Health*, 44(7), 892–901.

- Kimura, N. (2016). Diabetes mellitus induces Alzheimer's disease pathology: Histopathological evidence from animal models. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(4). <https://doi.org/10.3390/ijms17040503>
- Kiouri, D. P., Tsoupra, E., Peana, M., Perlepes, S. P., Stefanidou, M. E., & Chasapis, C. T. (2023). Multifunctional role of zinc in human health: an update. *EXCLI Journal*, 22, 809–827. <https://doi.org/10.17179/excli2023-6335>
- Lakowicz, J. R. (1999). Fluorophores. In *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (2nd ed., pp. 63–93).
- Lee, J. Y., Cho, E., Kim, T. Y., Kim, D. K., Palmiter, R. D., Volitakis, I., Kim, J. S., Bush, A. I., & Koh, J. Y. (2010). Apolipoprotein E ablation decreases synaptic vesicular zinc in the brain. *BioMetals*, 23(6), 1085–1095. <https://doi.org/10.1007/s10534-010-9354-9>
- Leopold, J., Popkova, Y., Engel, K. M., & Schiller, J. (2018). Recent developments of useful MALDI matrices for the mass spectrometric characterization of lipids. *Biomolecules*, 8(4). <https://doi.org/10.3390/biom8040173>
- Linder, M. C. (2016). Ceruloplasmin and other copper binding components of blood plasma and their functions: an update. *Metallomics*, 8(9), 887–905. <https://doi.org/10.1039/c6mt00103c>
- Liu, B., Moloney, A., Meehan, S., Morris, K., Thomas, S. E., Serpell, L. C., Hider, R., Marciniak, S. J., Lomas, D. A., & Crowther, D. C. (2011). Iron promotes the toxicity of amyloid β peptide by impeding its ordered aggregation. *Journal of Biological Chemistry*, 286(6), 4248–4256. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.158980>
- Liu, F., Zhang, Z., Zhang, L., Meng, R. N., Gao, J., Jin, M., Li, M., & Wang, X. P. (2022). Effect of metal ions on Alzheimer's disease. *Brain and Behavior*, 12(3). <https://doi.org/10.1002/brb3.2527>
- Ma, J., Qian, C., Bao, Y., Liu, M. Y., Ma, H. M., Shen, M. Q., Li, W., Wang, J. J., Bao, Y. X., Liu, Y., Ke, Y., & Qian, Z. M. (2021). Apolipoprotein E deficiency induces a progressive increase in tissue iron contents with age in mice. *Redox Biology*, 40. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.101865>
- Meloni, G., Sonois, V., Delaine, T., Guilloureau, L., Gillet, A., Teissié, J., Faller, P., & Vašák, M. (2008). Metal swap between Zn7-metlothionein-3 and amyloid- β -Cu protects against amyloid- β toxicity. *Nature Chemical Biology*, 4(6), 366–372. <https://doi.org/10.1038/nchembio.89>
- Mendez, M. F. (2017). Early-Onset Alzheimer Disease. *Neurologic Clinics*, 35(2), 263–281. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2017.01.005>
- Miyata, M., & Smith, J. D. (1996). Apolipoprotein E allele-specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidative insults and β -amyloid peptides. *Nature Genetics*, 14(1), 55–61. <https://doi.org/10.1038/ng0996-55>

- Moir, R. D., Atwood, C. S., Romano, D. M., Laurans, M. H., Huang, X., Bush, A. I., Smith, J. D., & Tanzi, R. E. (1999). Differential effects of apolipoprotein E isoforms on metal-induced aggregation of A β using physiological concentrations. *Biochemistry*, *38*(14), 4595–4603. <https://doi.org/10.1021/bi982437d>
- Moreira, G. G., Cristóvão, J. S., Torres, V. M., Carapeto, A. P., Rodrigues, M. S., Landrieu, I., Cordeiro, C., & Gomes, C. M. (2019). Zinc binding to tau influences aggregation kinetics and oligomer distribution. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(23). <https://doi.org/10.3390/ijms20235979>
- Oikawa, N., & Walter, J. (2019). Presenilins and γ -secretase in membrane proteostasis. *Cells*, *8*(3). <https://doi.org/10.3390/cells8030209>
- Patel, R., & Aschner, M. (2021). Commonalities between copper neurotoxicity and Alzheimer's disease. *Toxics*, *9*(1), 1–11. <https://doi.org/10.3390/toxics9010004>
- Peng, Y., Chang, X., & Lang, M. (2021). Iron homeostasis disorder and alzheimer's disease. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(22). <https://doi.org/10.3390/ijms222212442>
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, *30*(1), 11–26. <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>
- Querfurth, H. W., & LaFerla, F. M. (2010). Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine*, *362*(4), 329–344. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0909142>
- Raha, A. A., Biswas, A., Henderson, J., Chakraborty, S., Holland, A., Friedland, R. P., Mukaetova-Ladinska, E., Zaman, S., & Raha-Chowdhury, R. (2022). Interplay of Ferritin Accumulation and Ferroportin Loss in Ageing Brain: Implication for Protein Aggregation in Down Syndrome Dementia, Alzheimer's, and Parkinson's Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(3). <https://doi.org/10.3390/ijms23031060>
- Raulin, A. C., Doss, S. V., Trottier, Z. A., Ikezu, T. C., Bu, G., & Liu, C. C. (2022). ApoE in Alzheimer's disease: pathophysiology and therapeutic strategies. *Molecular Neurodegeneration*, *17*(1). <https://doi.org/10.1186/s13024-022-00574-4>
- Saraswathy, N., & Ramalingam, P. (2011). Mass spectrometry for proteomics. In *Concepts and Techniques in Genomics and Proteomics* (pp. 171–183). CRC Press. <https://doi.org/10.1533/9781908818058.171>
- Silva, M. V. F., Loures, C. D. M. G., Alves, L. C. V., De Souza, L. C., Borges, K. B. G., & Carvalho, M. D. G. (2019). Alzheimer's disease: Risk factors and potentially protective measures. *Journal of Biomedical Science*, *26*(1). <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0524-y>
- Song, F., Han, G., Bai, Z., Peng, X., Wang, J., & Lei, H. (2015). Alzheimer's Disease: Genomics and Beyond. In *International Review of Neurobiology* (Vol. 121, pp. 1–24). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.irn.2015.05.001>

- Uslu, A., Tümay, S. O., & Yeşilot, S. (2022). Fluorescent materials based on phosphazene derivatives and their applications: Sensors and optoelectronic devices. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 53. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2022.100553>
- Van Bergen, J. M. G., Li, X., Hua, J., Schreiner, S. J., Steininger, S. C., Quevenco, F. C., Wyss, M., Gietl, A. F., Treyer, V., Leh, S. E., Buck, F., Nitsch, R. M., Pruessmann, K. P., Van Zijl, P. C. M., Hock, C., & Unschuld, P. G. (2016). Colocalization of cerebral iron with Amyloid beta in Mild Cognitive Impairment. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep35514>
- Wang, L., Yin, Y. L., Liu, X. Z., Shen, P., Zheng, Y. G., Lan, X. R., Lu, C. B., & Wang, J. Z. (2020). Current understanding of metal ions in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Translational Neurodegeneration*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s40035-020-00189-z>
- Watt, N. T., Whitehouse, I. J., & Hooper, N. M. (2011). The role of zinc in Alzheimer's disease. *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2011. <https://doi.org/10.4061/2011/971021>
- Wu, K. Y., Lin, K. J., Chen, C. H., Chen, C. S., Liu, C. Y., Huang, S. Y., Yen, T. C., & Hsiao, I. T. (2018). Diversity of neurodegenerative pathophysiology in nondemented patients with major depressive disorder: Evidence of cerebral amyloidosis and hippocampal atrophy. *Brain and Behavior*, 8(7). <https://doi.org/10.1002/brb3.1016>
- Xu, H., Finkelstein, D. I., & Adlard, P. A. (2014). Interactions of metals and apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 6. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00121>
- Younus, H. (2018). Therapeutic potentials of superoxide dismutase. *International Journal of Health Sciences*, 12(3), 88–93.
- Zhang, Y., Gao, H., Zheng, W., & Xu, H. (2022). Current understanding of the interactions between metal ions and Apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*, 172. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2022.105824>
- Zvěřová, M., Fišar, Z., Jiráček, R., Kitzlerová, E., Hroudová, J., & Raboch, J. (2013). Plasma cortisol in Alzheimer's disease with or without depressive symptoms. *Medical Science Monitor*, 19(1), 681–689. <https://doi.org/10.12659/MSM.889110>

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks¹

Mina Jelizaveta Aleksandrova

1. Annan Tallinna Tehnikaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Apolipoproteiini (apoE) isovormide interaktsioon Fe(II) ja Zn(II) ioonidega mille juhendajad on Andra Noormägi, Peep Palumaa;

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.

28.05.2024

¹ Lihtlitsents ei kehti juurdepääsupiirangu kehtivuse ajal vastavalt üliõpilase taotlusele lõputööle juurdepääsupiirangu kehtestamiseks, mis on allkirjastatud teaduskonna dekaani poolt, välja arvatud ülikooli õigus lõputööd reprodutseerida üksnes säilitamise eesmärgil. Kui lõputöö on loonud kaks või enam isikut oma ühise loomingu tegevusega ning lõputöö kaas- või ühisautor(id) ei ole andnud lõputööd kaitsvale üliõpilasele kindlaksmääratud tähtjaks nõusolekut lõputöö reprodutseerimiseks ja avalikustamiseks vastavalt lihtlitsentsi punktidele 1.1. ja 1.2, siis lihtlitsents nimetatud tähtaja jooksul ei kehti.