

# **Alfa-lipoehappe neuroprotektiivne toime Alzheimeri tõve äädikakärbse mudelites**

Bakalaureusetöö

Üliõpilane: Janar Varik  
Üliõpilaskood: 212997LAAB

Juhendaja: Sigrid Kirss, doktorant-nooremteadur,  
Keemia ja biotehnoloogia instituut, Tallinna tehnikaülikool

Kaasjuhendaja: Professor Peep Palumaa,  
Keemia ja biotehnoloogia instituut, Tallinna tehnikaülikool

Õppekava: Rakenduskeemia, toidu- ja geenitehnoloogia

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: Janar Varik

29/05/2024 [allkiri]

Töö vastab bakalaureusetööle esitatavatele nõuetele.

Juhendajad: Sigrid Kirss; Peep Palumaa

29/05/2024 [allkiri]

# Sisukord

Lühendite loetelu .....	5
Sissejuhatus.....	6
1. Kirjanduse ülevaade .....	7
1.1. Alzheimeri tõbi .....	7
1.1.1. Amüloidsed naastud ja nende moodustumine .....	7
1.2. Metallide roll Alzheimeri tõves .....	8
1.2.1. Vase roll .....	9
1.3. Amüloidkaskaadile baseeruvad Alzheimeri tõve teraapiad .....	9
1.3.1. $\alpha$ -lipoehappe toime.....	10
1.4. <i>Drosophila melanogaster</i> kui Alzheimeri tõve mudel .....	11
2. Töö eesmärgid .....	12
3. Eksperimentaalne osa .....	13
3.1. Teoreetiline kirjeldus .....	13
3.1.1. Binaarsed ekspressioonisüsteemid .....	13
3.1.2. Olfaktoorne õppimine .....	13
3.1.3. Induktiivsidestatud plasma mass-spektromeetria .....	14
3.2. Meetodid.....	14
3.2.1. Äädikakärbeste kultiveerimine ja ristamine, kasutatud liinid .....	14
3.2.2. Ronimiskatsed, elulemuse jälgimine .....	16
3.2.3. Lõhnatundmise katse ja positiivne mälu katse .....	17
3.2.4. Metallide määramine äädikakärbe ajudest .....	18
3.3. Andmete analüüs .....	18
4. Tulemused .....	19
4.1. Eelkatsed .....	19
4.2. Q-süsteemi liinid.....	20
4.2.1. Ronimiskatse .....	20
4.2.2. Lõhnatundmiskatse .....	21
4.2.3. Positiivne mälu katse.....	22
4.3. Gal4-süsteemi liinid.....	23
4.3.1. Ronimiskatse .....	23

4.3.2. Kärbeste ajudes metallide määramine .....	23
5. Arutelu.....	25
Kokkuvõte.....	27
Abstract .....	28
Tänuavaldused.....	29
Kirjanduse loetelu .....	30
Lisad.....	35
Lihtlitsents .....	35

## Lühendite loetelu

AT	Alzheimeri tõbi
ATCUN	<i>amino terminal Cu(II)- and Ni(II)-binding</i>
APOE	apolipoproteiin E
APP	amüloid- $\beta$ eellasvalk
A $\beta$	amüloid- $\beta$ peptiid
CQ	kliokinool
CS	<i>conditioned stimulus</i>
DHLA	dihüdrolipoehape
Elav	<i>embryonic lethal abnormal vision</i>
FDA	USA Toidu- ja Ravimiamet
HEPES	4-(2-hüdrosüetüül)-1-piperasiinetaansulfoonhape
ICP-MS	induktiivsidestatud plasma mass-spektromeetria
LA	$\alpha$ -lipoehape
NFT	neurofibrillaarsed kämbud
nSyb	<i>neuronal synaptobrevin</i>
QUAS	<i>Q-system upstream activating sequence</i>
RNAi	RNA interferents
ROS	reaktiivsed hapnikuühendid
SEM	standardviga
TF	transkriptsioonifaktor
UAS	<i>upstream activating sequence</i>
3-OCT	3-oktanool
4-MCH	4-metüülsükloheksanool

## Sissejuhatus

Alzheimeri tõbi (AT) on üks levinumaid dementsuse vorme. Maailmas kannatab selle all üle 55 miljoni inimese. Suurimaks riskifaktoriks AT puhul on vanus ning arvestades meie aina vananevat rahvastikku, võib haigestunute arv paarikümne aastaga mitmekordistuda. Hoolimata aastakümneid kestnud haiguse mehhanismide ja potentsiaalsete ravimeetodite uurimisest ei suuda me tänasel päeval AT ravida. Kasutuses on vaid mõned sümptomeid leevendavad ravimid ning USA Toidu- ja Raviameti (FDA) poolt on aktsepteeritud kaks haiguse kulgu modifitseerivat teraapiat. Nimetatud ravimite hind on väga suur, esineb palju kõrvaltoimeid ning soovida jätab ka efektiivsus.

Kuigi täpsed AT tekkepõhjused on seni selgusetud, on tuvastatud palju muutusi AT inimese ajus, mis viivad neuronite hävimiseni. Esimesi patoloogiaid, mis ilmneb ajus juba kümneid aastaid enne kliiniliste sümptomite teket, on amüloid- $\beta$  peptiidi ( $A\beta$ ) agregeerumine toksilisteks amüloidseteks naastudeks. Lisaks mängivad rolli mitmed olulised protsessid: neurofibrillaarsete kämpude moodustumine, oksüdatiivne stress, põletikulised protsessid, mitokondriaalne düsfunktsioon ning metallide homöostaasi häirimine.

Oluliste biometallide nagu vask düshomöostaas on tihedalt seotud amüloidsete naastude moodustumisega, sest neis sisalduv  $A\beta$  seob vaske, mille tagajärjel moodustub ekstratsellulaarses ruumis vaskioonide liig, mis omakorda viib vabade hapnikuradikaalide (ROS) tekkeni. Samal ajal areneb intratsellulaarselt vase defitsiit, mille tagajärjel häirub oluliste vaskensüümide töö, mis omakorda aitab kaasa neurodegeneratsioonile. Samuti on katseliselt näidatud, et vaskioonide seondumine kiirendab oluliselt  $A\beta$  agregeerumist.

Kirjeldatud protsesse arvesse võttes on AT ravina välja pakutud metallide kelaatoreid, mis reguleeriks metallide tasemeid ajus. Loomkatsetes ja varastes kliinilistes uuringutes on näidatud mitmete ravimikandidaatide positiivset mõju, kuid hilisemates uuringutes on seni kõik efektiivsuse puudumise või kõrvaltoimete tõttu põrunud.

$\alpha$ -lipoehape (LA) on naturaalne mitmete kasulike omadustega ühend, mida toodetakse meie rakkude mitokondrites, aga ta on omastatav ka toidust. Meie uurimisrühm on varem näidanud, et LA redutseeritud vorm seob vaskioone optimaalse tugevusega ning rakkude koekultuuri mudelis demonstreeriti, et LA suudab viia vaske ekstratsellulaarsest ruumist tagasi rakku sisse. Samuti näitas meie rühm AT äädikakärbsemudelis ronimiskatsega LA positiivset mõju. Seega suudab LA normaliseerida vase metabolismi ja võiks tänu sellele osutada kasulikuks AT ennetamises või isegi ravis.

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida LA mõju erinevate äädikakärbse AT mudelliinide lokomotoorsele aktiivsusele ja mälule ning lisaks AT patoloogias oluliste biometallide sisaldusele ajus. Viidi läbi esialgsed katsed sobivaimate äädikakärbse liinide valimiseks. Valitud liinidega teostati mälukatsed LA toime uurimiseks. LA ja vasega rikastatud toidu mõju kärbeste lokomotoorikale uuriti ronimiskatsega ning määrati AT-s potentsiaalselt oluliste metallide (Cu, Fe, Zn, Mn) sisaldus kärbeste ajudes kasutades ICP-MS meetodit.

# 1. Kirjanduse ülevaade

## 1.1. Alzheimeri tõbi

Alzheimeri tõbi (AT) on vanusega süvenev neurodegeneratiivne haigus, mis on üks enim levinumaid dementsuse vorme ("2023 Alzheimer's Disease Facts and Figures," 2023). Üle maailma kannatab selle haiguse all üle 55 miljoni inimese ja on hinnatud, et haigestunute arv võib kolmekordistuda aastaks 2050 (E. Nichols et al., 2022). AT puhul toimub progressiivne mälu ja kognitiivsete funktsioonide halvenemine, mida põhjustab neuronite töö häirumine ja rakkude surm mitmetes aju piirkondades eeskätt hipokampuses ja ajukoos (Whitehouse et al., 1982).

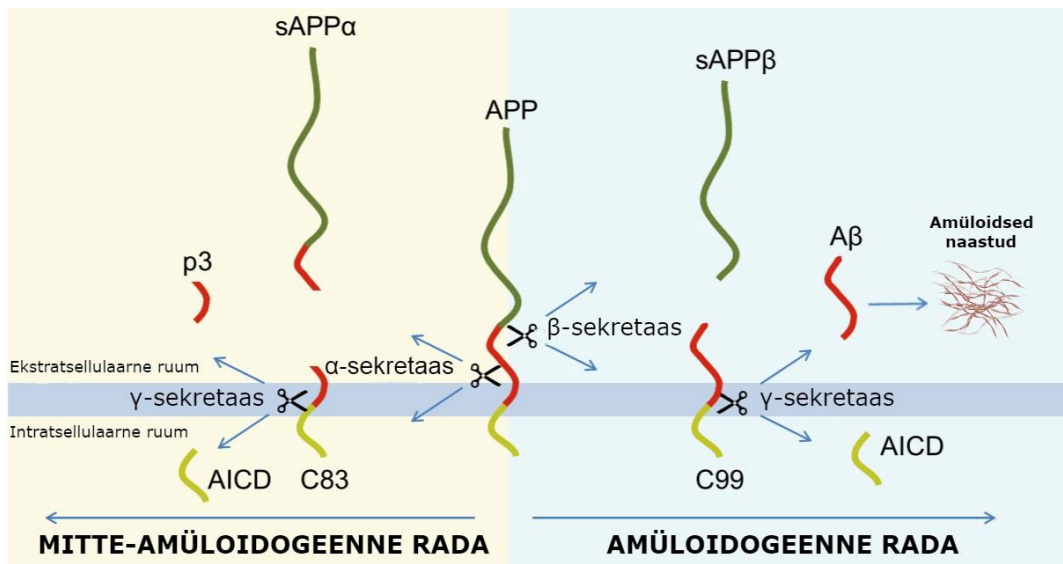
Iseloomulikud neuropatoloogilised tunnused AT patsientidel on amüloidsed naastud (ingl.k. *amyloid plaques*) ja neurofibrillaarsed kämbud (ingl.k. *neurofibrillary tangles*, NFT) (Hippius & Neundörfer, 2003). Amüloidsed naastud on ekstratsellulaarselt paiknevad valgukogumid, mille põhikomponentideks on agregeerunud amüloid-beeta (A $\beta$ ) peptiidid (Cras et al., 1991). Neid peptiide leidub inimese aju erineva pikkusega, millest levinumad koosnevad 40-st või 42-st aminohappejäägist (A $\beta$ <sup>40</sup> ja A $\beta$ <sup>42</sup>) (Selkoe & Hardy, 2016).

Lisaks naastudele neuronite vahel iseloomustavad AT-e intraneuraalsed muutused, mille käigus tau-valgu hüperfosforüleerumise tulemusena tekivad NFT-d. Eelpool kirjeldatud muutused algavad juba enne kliiniliste sümptomite ilmnemist, ning seejuures amüloidsete naastude moodustumine eelneb üldiselt NFT-dele (Braak & Braak, 1991).

Sõltuvalt geneetilistest põhjustest jaotatakse AT kaheks vormiks: sporaadiliseks ning perekondlikuks. Üle 90% haigusjuhtudest esinevad hilise algusega sporaadilise vormina, mis avaldub tavaliselt peale 65. eluaastat. Sporaadilise AT areng toimub paljude geneetiliste ja keskkonna mõjude tõttu ning seni ainus fikseeritud geneetiline riskifaktor on apolipoproteiin E geeni (*APOE*)  $\epsilon$ 4 alleeli esinemine. Varase algusega perekondlik AT algab tavaliselt enne 65. eluaastat. Võrreldes sporaadilise vormiga, on perekondliku AT geneetiline taust selgem. Haigus on põhjustatud mutatsioonidest kolmes geenis: APP, preseniliin 1 või preseniliin 2 (Piaceri, 2013).

### 1.1.1. Amüloidsed naastud ja nende moodustumine

Amüloidsetes naastudes sisalduvad A $\beta$  peptiidid tekivad vastava amüloid-beeta eellasvalgu (ingl.  *$\beta$ -amyloid precursor protein*, APP) proteolüüsil normaalsete füsioloogiliste radade kaudu (Cras et al., 1991). APP on membraanvalk, mille N-terminus asub rakuvälises ruumis ja C-terminus tsütosoolis. Seda valku töödeldakse proteolüütiliselt kolme ensüümi poolt:  $\alpha$ -,  $\beta$ - ja  $\gamma$ -sekretaas. Kui  $\beta$ - ja  $\gamma$ -sekretaas vahendavad A $\beta$  tootmist, siis  $\alpha$ -sekretaas mõjub A $\beta$  moodustumisele hoopis konkureerivalt. Sellest tulenevalt nimetatakse APP protsessimist, mis algab  $\beta$ -sekretaasi töötusega, amüloidgeenseks rajaks ning  $\alpha$ -sekretaasi toimel toimuvat lüüsi mitte-amüloidgeenseks rajaks (**Joonis 1**) (Haass et al., 2012).



**Joonis 1. Kaks erinevat APP proteolüütilist rada.** APP järjestikuse lagundamisel  $\beta$ - ja  $\gamma$ -sekretaasi poolt moodustub  $A\beta$  ja seetõttu nimetatakse sellist APP töötlust amüloidoogeenseks rajaks. Mitte-amüloidoogeenses rajas lõigatakse APP-d  $\alpha$ -sekretaasi poolt  $A\beta$ -le vastava järjestuse seest ning  $A\beta$  asemel vabaneb  $\gamma$ -sekretaasiga lõikamise järel p3 fragment (Kohandatud, Tiiman et al., 2013).

Amüloidoogeensete sekretaaside inhibeerimine vähendab  $A\beta$  moodustumist ja on seega ka oluliseks terapeutiliseks sihtmärgiks (Haass, 2004). Mutatsioonid  $\gamma$ -sekretaasi subühikutes (preseniliin 1 või 2), aga ka APP geenis endas suurendavad kergemini agregeeruvate vormide nagu  $A\beta^{42}$  moodustumist. AT puhul on  $A\beta^{42}$  ja teiste isovormide suhe määrava tähtsusega, sest  $A\beta^{42}$  fibrilliseerub ja oligomeriseerub tunduvalt kiiremini, kui näiteks laialdasemalt esinev  $A\beta^{40}$  (Bekris et al., 2010).

Selgitamaks, kuidas  $A\beta$  ladestumine ajus on seotud AT kujunemisega, on välja pakutud amüloidkaskaadi teooria. See teooria selgitab, millised järjestikused muutused ajus viivad dementsuse väljakujunemiseni. Haigus algab  $A\beta^{42}$  tasemete tõusuga, millele järgneb peptiidi kogunemine ja oligomeriseerumine ajus. Naastude moodustumisele järgneb kaskaad muutusi, mis kõik aitavad kaasa neuronaalsete funktsioonide häirimisele lõppedes neurodegeneratsiooniga. Olgugi, et tegu on seni aktsepteerituima AT hüpoteesiga, on siiski veel mitmeid seni lahendamata lünkasid, mis räägivad amüloidkaskaadile vastu. Näiteks ei korreleeru amüloidsete naastude sisaldus ajus täielikult dementsuse kulgemisega ja suurt hulka anti-amüloidseid ravimikanditaate pole kliinilistes katsetes saanud loodetud edu (Selkoe & Hardy, 2016).

## 1.2. Metallide roll Alzheimeri tõves

Levinuimad biometallid eukarüootides on raud, tsink ja vask. Kuigi tegu on mikroelementidega, mida organism vajab väikes koguses, on nad eluliselt äärmiselt tähtsad. Need metallid on kriitiliselt olulised ensüümide funktsiooni säilitamises mängides rolli nii katalüüsis, valkude struktuuri stabiliseerimises, hapniku transpordis ja raku signaaliradades. Seega pole üllatav, et nende metallide homöostaasi häirimine toob kaasa haiguslikke häireid nagu Wilsoni ja Menkesi tõbi, mis on põhjustatud vastavalt vase transporterite ATP7b ja ATP7a defektist, samas kui aneemia ja



hemokromatoos on põhjustatud vastavalt raudioonide puudusest või kuhjumisest (Roberts et al., 2012). AT puhul on eelnimetatud biometallide tasemed ajus düsreguleeritud ning on näidatud, et A $\beta$  peptiidid interakteeruvad Fe, Zn ja Cu ionidega (Huang et al., 1999). Cu ja Fe on redoksaktiivsed metallid, millest tuleneb ka nende olulisus mitmete redoksensüümide aktiivtsentrites. Samas tähendab see, et nende metallide homöostaas peab olema rangelt kontrollitud, et vältida reaktiivsete hapnikuühendite (ROS) moodustumist, mis on ka üheks patoloogiliseks tunnuseks AT puhul (Maynard et al., 2002). Kuigi AT-le iseloomulike amüloidsete naastude moodustumise täpne mehhanism on seni selgusetu, on palju tõendeid, et A $\beta$  peptiidide agregeerumine naastudeks on seotud ajus sisalduvate metalliioonidega (Bush, 2000).

### 1.2.1. Vase roll

Kõige vaserikkamateks organiteks on maks ja aju (Bulcke et al., 2017). Kuigi metallide tasemed ajus võivad piirkonniti erineda, on nii loomade kui inimeste peal näidatud, et vananedes vase sisaldus ajus väheneb (Roberts et al., 2012). Eelnevalt on näidatud, et AT puhul on ekstratsellulaarses piirkonnas naastude läheduses vaskioonide ülekaal, samas kui intratsellulaarses keskkonnas on vase defitsiit (Miller et al., 2006; Schrag et al., 2011).

Välja on pakutud vase (ka tsingi ja raua) võimalik roll AT patogeneesis. Selle kohaselt ajendab lokaalne ionide düshomöostaas ajus A $\beta$  agregaatide moodustumise. Need muunduvad edasi fibrillideks, mis sisaldavad vastavat metalliiooni. Sellised algsed fiibrilid alustavad autokatalüütilist A $\beta$  fibrilleerumist, mille tagajärjel moodustuvad amüloidsed naastud, mis seovad täiendavalt vask- ja ka raudioone. Koostöös A $\beta$ -ga toimuvad nende redoksaktiivsete metalliioonidega redoksreaktsioonid, mis viivad ROS-de moodustumiseni põhjustades oksüdatiivset stressi (Tiiman et al., 2013). Ilmneb, et A $\beta$  redutseerib seostudes Cu<sup>2+</sup> ioone Cu<sup>1+</sup>-ks, mille käigus moodustub hapniku juuresolekul nii H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kui ka vastavalt Fenton või Haber-Weiss reaktsioonile hüdroksüülradikaalid (OH $\cdot$ ) (Huang et al., 1999).

Kõigele lisaks on vaske seostatud ka AT-le iseloomuliku tau patoloogiaga tänu tau valgu fosforüleerimise ja agregeerumise stimuleerimisele ning tau agregaatide toksilisuse suurendamisele. Samuti põhjustab vase defitsiit oluliste vask-sõltuvate ensüümide nagu tsütokroom c oksüdaas ja superoksiidi dismutaas aktiivsuse langust (Bulcke et al., 2017).

Kõike eelnevat arvesse võttes võib AT-le iseloomuliku häiritud vase metabolismi reguleerimine olla potentsiaalselt kasulik AT ravis.

## 1.3. Amüloidkaskaadile baseeruvad Alzheimeri tõve teraapiad

Seni on AT ravi leidmisel enim tähelepanu saanud A $\beta$ -ga seotud patoloogia mõjutamine. On uuritud A $\beta$  tootmise vähendamist läbi  $\gamma$ - ja  $\beta$ -sekretaasi inhibeerimise. Kuigi esialgsed uuringud nii loomudel kui inimeste peal andsid positiivseid tulemusi, on seni kõik kandidaadid hilisemates kliinilistes katsetes põrunud seoses madala efektiivsuse või soovimatute kõrvaltoimetega. Lisaks on uuritud nii aktiivset kui passiivset immuniseerimist vastavalt A $\beta$  või antikehade abil, mille käigus antikehad soodustavad A $\beta$  eemaldamist ajust (Tatlian, 2022).

Tänaseks on suudetud välja arendada vaid kaks AT kulgu modifitseerivat ravimit, mis on FDA poolt aktsepteeritud. Tegu on A $\beta$  vastaste monoklonaalsete antikehadega aducanumab ja lecanemab, mis mõlemad vähendavad patsiendi ajast A $\beta$  taset ja sellega seoses aeglustavad nad mõningal määral ka haiguse kulgu ("2023 Alzheimer's Disease Facts and Figures," 2023). Miinuseks taoliste ravimite puhul on vajadus manustada neid intravenoosselt. Lisaks on nad väga kulukad ja esinevad tugevad kõrvalmõjud (Brockmann et al., 2023).

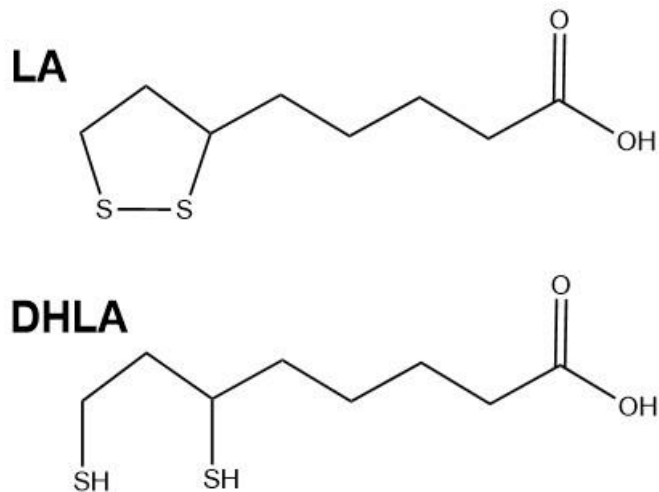
AT raviks on välja pakutud ka metallide kelaatoreid, mis eemaldaks naastudest A $\beta$ -ga seostunud metalliioone ja läbi selle aitaks kaasa naastude lagundamisele. Üks tähelepanuväärsemaid sellise omadusega ühendeid on kliokinool (CQ), mis seob nii vaske kui tsinki olles võimeline viima neid metalliioone rakuvälisest ruumist tagasi raku sisse. Lisaks sellele on CQ hüdrofoobne molekul ja läbib edukalt vereajubarjääri, mis teeb temast hea ravimkandidaadi (Robert et al., 2015). Prekliinilised katsed CQ-i ja analoogse täiustatud ühendi PBT2-ga näitasid kindlat positiivset mõju AT hiirte peal, kellel on ülesreguleeritud A $\beta$  tootmine (Adlard et al., 2008; Cherny et al., 2001). Mõlemad ravimikandidaadid andsid esialgseid positiivseid tulemusi ka varajastes kliinilistes katsetes, kuid takerdusid erinevatel efektiivsuse ja ohutusega seotud põhjustel hilisemates uuringutes (Robert et al., 2015).

### 1.3.1. $\alpha$ -lipoehappe toime

$\alpha$ -lipoehape (LA) on looduslikult esinev ühend, mida toodetakse organismis mitokondrites, aga ta on omastatav ka toidust. Oma biofunktsioonilt on LA mitokondrite ensüümkomplekside kofaktor. Lisaks mõjutab LA rakkudes paljusid erinevaid protsesse käitudes nii antioksidandina kui metallide kelaatorina ning samuti osaleb ta raku signaaliradades (Shay et al., 2009). *In vivo* redutseeritakse LA dihüdroliipoehappeks (DHHA) (**Joonis 2**), mida eksporditakse ka rakkudest välja ja mis omadustelt on veelgi parem antioksidant ja metallide kelaator (Packer et al., 1997). Nendest omadustest tulenevalt on LA neuroprotektiivset toimet uuritud haiguste nagu Alzheimeri, Parkinsoni ja Huntingtoni tõve, aga ka normaalsete vananemisega seotud probleemide puhul, mis on andnud lootustandvaid tulemusi (Molz & Schröder, 2017). AT puhul on näidatud, et LA aitab lagundada amüloidnaastusid *post mortem* inimese ajus (Fonte et al., 2001). Lisaks on tserebraalse amüloidoosiga AT hiire mudeli peal näidatud, et LA vähendab amüloidsete naastude toksilisusest tulenevaid kognitiivseid kahjustusi, kuigi antud uuringus statistiliselt olulist amüloidsete naastude vähenemist ei tuvastatud (Quinn et al., 2007).

Meie töörühmas on hiljuti näidatud, et DHHA seob piisavalt hästi Cu<sup>1+</sup> ioone (Smirnova et al., 2018) ning et LA suudab viia ekstratsellulaarsest ruumist vaskioone tagasi rakkude sisse, käitudes kui ionofoor ja tänu sellele suudab ta potentsiaalselt normaliseerida düsreguleeritud vase metabolismi. Samuti näidati AT äädikakärbse mudelis, et LA parandab Iowa mutatsiooniga inimese A $\beta$ -t ekspresseerivate kärbeste lokomotoorset aktiivsust (Metsla et al., 2022).

Ilmneb, et LA on mitmekülgsete omadustega ühend, mis omab neuroprotektiivset mõju erinevate patoloogiate korral, kuid tema täpsed toimemehhanismid on veel ebaselged ning vajavad seetõttu lisauuringuid.



Joonis 2. Alfa-lipoehappe ja dihidrolipoehappe struktuurvalem (ChemDraw).

#### 1.4. *Drosophila melanogaster* kui Alzheimeri tõve mudel

Äädikakärbsed on teaduses kasutatud juba üle saja aasta. Tõeline läbimurre äädikakärbsede kasutamise geneetika uuringuteks saavutati Thomas Hunt Morgani poolt. Nimelt leidis Morgan oma kärbsede seast ühe ainsa valge-silma mutatsiooniga kärbse, kellega viis läbi rea ristamisi. Selle tunnuse pärandumismustrite uurimine aitas tõestada kromosoomiteooriat (Morgan, 1910). Sealt alates on äädikakärbsede abiga tehtud palju fundamentaalseid avastusi nii geneetikas kui arengubioloogias ning tänaseks on äädikakärbsedest kujunenud tähtis mudelorganism paljude inimeste haiguste uurimiseks. Praeguseks on teada, et ligi 75% inimese haigustega seotud geenidest omavad äädikakärbses funktsionaalseid ortolooge (Bier, 2005).

*Drosophila melanogasteri* kasutamisel haiguste uurimises on teiste mudelorganismide ees mitmeid eeliseid. Esiteks on neil vaid 4 kromosoomi, millest 3 sisaldavad suurema osa kõigist äädikakärbse 14000 geenist (C. D. Nichols, 2006). Tänapäeval võimaldab äädikakärbse mudelorganism kõige edasijõudnumat geneetilist manipulatsiooni võrreldes teiste kõrgemate eukarüootidega, mistõttu saame närvisüsteemi keerukust uurida enneolematu detailsusega (Venken et al., 2011). Suur eelis äädikakärbsede puhul on otseloomulikult ka nende lühikene elutsükkel. 25°C juures läbitakse täismoondega areng (embrüo, vastne, nukk, valmik) vaid 10-12 päevaga. Seejuures võib üksainus emane kärbes muneda mõne päevaga sadu mune. Samuti on üldised kärbsede ülalpidamiskulud suhtelistelt madalad ning tööd lihtsustab veel asjaolu, et selgrootute, sh äädikakärbsede, kasutamine teaduses ei ole piiratud loomkatsete regulatsioonidega, mis kehtivad selgroogsetele katseloomadele (C. D. Nichols, 2006).

## 2. Töö eesmärgid

Käesoleva töö eesmärgid olid:

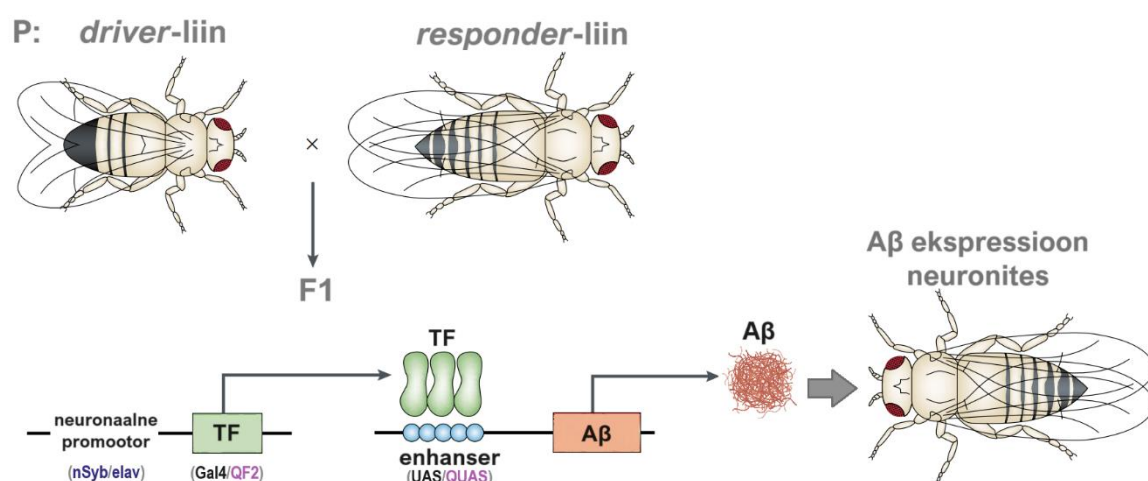
1. Ronimise ja elulemuse eelkatsetega teha kindlaks sobivad AT fenotüübiga kärbseliinid edasisteks katseteks
2. Uurida LA mõju AT fenotüübiga äädikakärbestele läbi käitumiskatsete
3. Vasetoidu ja LA-toidu koosmõju uurimine ronimiskatsega
4. Vasetoidu ja LA-toidu mõju uurimine metallide sisaldusele AT kärbeste ajus kasutades ICP-MS meetodit

### 3. Eksperimentaalne osa

#### 3.1. Teoreetiline kirjeldus

##### 3.1.1. Binaarsed ekspressioonisüsteemid

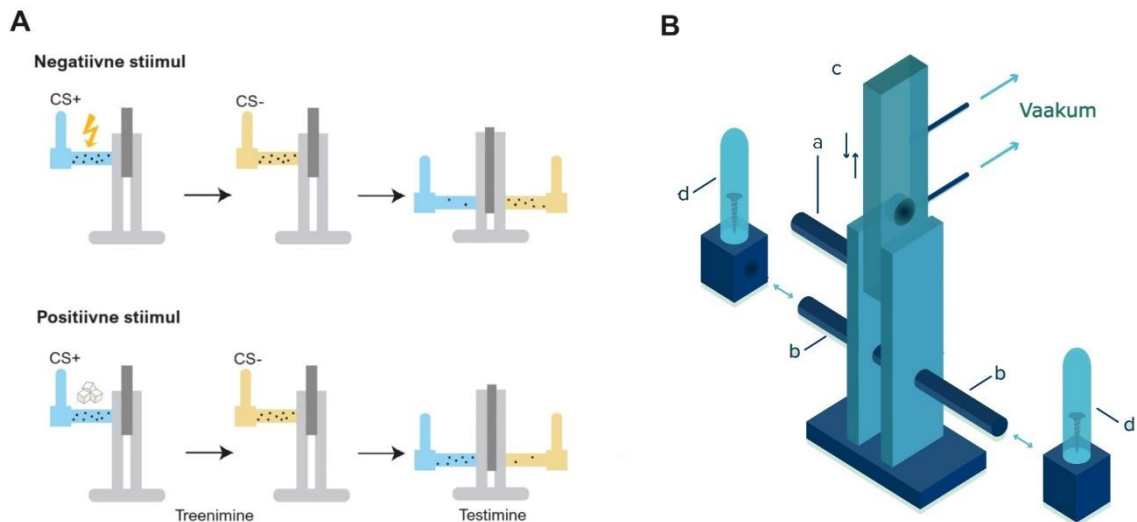
Binaarsed ekspressioonisüsteemid on üheks oluliseimaks tööriistaks äädikakärbsse närvisüsteemi uurimisel, mis võimaldab manipuleerida kindlaid närvisüsteemi rakkude populatsioone nii ajaliselt kui ruumiliselt. Nimetatud meetodis kasutatakse kahte erinevat *Drosophila* püsiliini (*driver* ja *responder*), mida uuritava geeni ekspressiooni käivitamiseks omavahel ristatakse. *Driver*-liin pakub koospetsiifiliselt transkriptsioonifaktori (TF) ekspressiooni ning *responder*-liin omab uuritavat geeni, mis ekspresseeritakse ülesvoolu paikneva enhansi toimel, kui sinna on seondunud *driver*'st pärit TF. Kaks tuntumat meetodit huvipakkuva geeni ekspresseerimiseks on Gal4- ja Q-süsteem, mida kasutati ka käesolevas töös AT mudelkärbeste saamiseks (**Joonis 3**). Nende süsteemide TF/enhanser on vastavalt Gal4/UAS ja QF2/QUAS, kus UAS viitab ingliskeelsele väljendile *upstream activating sequence* (Venken et al., 2011).



**Joonis 3.** Aβ ekspresseerimine kärbsede neuronites binaarsete ekspressioonisüsteemidega. Huvipakkuva geeni (meie katsetes Aβ) ekspresseerimiseks neuronites ristatakse omavahel *driver*- ja *responder*-liin. Järglastes (F1) käivitab neuronitele spetsiifiline promootor (käesolevas töös kasutati *elav* ja *nSyb* promootoritega liine) TF sünteesi, mis omakorda seondub uuritavast geenist ülesvoolu paiknevale enhanserjärjestusele (UAS/QUAS) ja mille tulemusel käivitub Aβ ekspressioon (Kohandatud. St Johnston, 2002).

##### 3.1.2. Olfaktoorne õppimine

Äädikakärbsed salvestavad ümbritsevat infot kasutades nii visuaalset, ruumilist kui olfaktoorseid õppimist. Üheks oluliseimaks äädikakärbsede mälu uurimise meetodiks on lõhnadega seotud mälukatse. Klassikalises mälukatsetes (**Joonis 4**) testitakse kärbsede olfaktoorseid õppimisvõimet kahe lõhnaga, millest üks seotakse kas negatiivse või positiivse aistinguga. Katse viiakse läbi spetsiaalse *T-maze* aparatuuriga (Tully & Quinn, 1985). Kaks põhiliselt mälukatseks kasutatavat lõhna on 4-metüülsükloheksanool (4-MCH) ja 3-oktanool (3-OCT). Katse viiakse läbi pimedas ruumis õrna punase valguse abil, mida kärbsed ei näe, et vähendada visuaalseid mõjusid (Malik & Hodge, 2014).



**Joonis 4. A) positiivse ja negatiivse mälukatses võrdlus.** Negatiivses mälukatses kasutatakse **treeningfaasis** lõhnaaistingu kinnistamiseks lisastiimulina **elektrišokki**, positiivses mälukatses aga **sahharoosi**. Seejuures kasutatakse treenimiseks kahte erinevat lõhna: lisastiimuliga **CS<sup>+</sup>** (ingl.k. *conditioned stimulus*) ning ilma vastava stiimulita **CS<sup>-</sup>**. Kärbeid treenitakse mõlema lõhnaga eraldi ning seejärel lastakse **testimisfaasis** kärbestel samade lõhnade vahel korraga valida (Kohandatud, Mariano et al., 2020). **B) mälukatses T-maze aparaat.** Joonisel tähistatud osad: **a**- treeningtuub; **b**- testimistuubid; **c**- keskmine liigutatav sektsioon ehk lift; **d**- lõhnakambrid. Aparaat ühendatakse vaakumpumbaga, mis tõmbab õhku läbi lõhnakambrite, kust juhitakse see edasi kärbesteni (Kohandatud, Drosophila Olfactory Operant Conditioning - Maze Engineers, n.d.).

### 3.1.3. Induktiivsidestatud plasma mass-spektromeetria

Induktiivsidestatud plasma mass-spektromeetria (ICP-MS) on analüütiline meetod elementide kvalitatiivseks ja kvantitatiivseks määramiseks suure sensitiivsuse ning täpsusega mitmesugustes proovides. Suureks eeliseks selle meetodi puhul on võimalus tuvastada mitmeid elemente korraga ning lisaks võimaldab ICP-MS läbi viia ka isotoopset analüüsi. Tänu nendele eelistele on ICP-MS leidnud laialdast kasutust nii teaduses, meditsiinis kui tööstuses (Bulska & Wagner, 2016).

Lahuse kujul proovid muudetakse aparaadis nebulisaatori abil aerosooliks ja juhitakse tavaliselt argooni plasmasse. Kõrge temperatuuriga plasma (kuni 10000 K) aurustab, atomiseerib ja ioniseerib proovi, tekitades suures koguses positiivseid ioone. Ioonoptika fokuseerib ja juhib ionikiire edasi kvadrupool-massianalüsaatorisse, kus ioonid jaotatakse vastavalt nende massi-laengu suhtele ning eraldatud ionide hulk mõõdetakse detektori abil (Houk et al., 1980).

## 3.2. Meetodid

### 3.2.1. Äädikakärbeste kultiveermine ja ristamine, kasutatud liinid

Äädikakärbeid kasvatati 50 ml plastikviaalides, mis olid suletud õhku läbilaskvate korkidega. Viaalid olid täidetud 1/4 ulatuses kasvusubstraadiga. Kasvusubstraadi koostis ühe liitri vee kohta oli järgmine: 6,5 g agar, 38 g manna, 70,5 g linnasejahu, 17,5 g kuivpärm, 5,9 ml nipagiin (Dutcher Scientific, 30g/100ml 94% EtOH) ja 6,8 ml propioonhape (Fisher Scientific, sigma). Agar, manna ja

linnasejahu lisati keevasse vette ning keedeti pidevalt segades 10 minutit. Aja möödudes lisati pärm, jätkati keetmist 2 minutit ja seejärel jahutati segu vesivannis 70°C-ni. Lisati propioonhape ja nipagiin, mis takistavad söötme riknemist. LA (Alfa-lipohape, Sigma-Aldrich) lahustati eelnevalt etanoolis 200 mM kontsentratsiooniga ja segati kasvusubstraadiga. Kontrolltoidule (C) lisati vastav kogus etanooli (1%), mida kasutati LA-toidu valmistamiseks. Cu-toidu valmistamiseks segati söötmesse 100 mM CuCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich), 0,5% HCl lahust. Kasvusubstraat villiti plastikviaalidesse ja peale jahtumist kaeti korkidega ning hoiustati 4°C juures. Katsetes kasutatud erinevad kasvusubstraadid ja nende kontsentratsioonid on välja toodud alljärgnevalt (**Tabel 1**).

**Tabel 1.** Erinevad kasvusubstraadid ning inkubaatori temperatuurid katsetes.

Katse		Temp. inkubaatoris	Kasvusubstraadid ristamisel	Kasvusubstraadid katses
eelkatsed	ronimiskatse	29°C	tavatoit	tavatoit
	elulemus	29°C	tavatoit	tavatoit
Q-süsteem	lõhnatundmiskatse	29°C	tavatoit	tavatoit
	ronimis- ja mälukatse	29°C	tavatoit	<ul style="list-style-type: none"> <li>• C</li> <li>• LA (2 mM)</li> </ul>
Gal4-süsteem	ronimiskatse ja ajude dissekteerimine	25°C	<ul style="list-style-type: none"> <li>• C</li> <li>• LA (1 mM)</li> <li>• Cu</li> <li>• Cu + LA (1 mM)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• C</li> <li>• LA (2 mM)</li> <li>• Cu</li> <li>• Cu + LA (2 mM)</li> </ul>

C: tavatoit + 0,96% EtOH; LA: tavatoit + (1 või 2 mM) LA + 0,96% EtOH; Cu: tavatoit + 0,2 mM CuCl<sub>2</sub>; Cu + LA: tavatoit + 0,2 mM CuCl<sub>2</sub> + (1 või 2 mM) LA + 0,96% EtOH.

Kärbestega viaale hoiti kindlate tingimustega inkubaatorites. 18°C juures hoiustati püsiliine, eksperimendid viidi läbi 25°C ja 29°C inkubaatorites (**Tabel 1**). Kõikides kappides oli keskmine niiskus 60% ja kontrollitud valgusrežiim (12 h valgust/12 h pimedust).

Antud töös kasutati AT mudelkärbestes erinevate A $\beta$ -peptiidide ekspressiooniks Q-süsteemiga (**Tabel 2**) ja Gal4-süsteemiga liine (**Tabel 3**).

**Tabel 2.** Eksperimentides kasutatud Q-süsteemi äädikakärbeste liinid.

Kasutatud liin	Q-süsteem	Selgitus	Allikas
w[1118]; P{w[+]=QUAS-Abeta42.L}4	QUAS-A $\beta$ <sup>42</sup> ss responder	Ekspresseerib QUAS kontrolli all sekretsiooni-signaaliga liidetud A $\beta$ <sup>42</sup> peptiidi	Bloomington Drosophila Stock Center. Liin nr. <b>83347</b>  Välja töötatud: (Li et al., 2018)
w[1118]; S[1]/CyO; P{y[+7.7] w[+mC]=nSyb-QF2w.AD}attP2	nSyb-QF2 driver	Ekspresseerib neuronites QF2 transkriptsiooni-faktorit	Bloomington Drosophila Stock Center. Liin nr. <b>81283</b>  Välja töötatud: (Riabinina et al., 2019)

P{w[+mW.hs] RFP[mCh.3xP3.cPa]=ET- QF2.GB}elav[C155-QF2]; betaTub60D[Pin-1]/CyO	elav-QF2 <i>driver</i>	Ekspressseerib neuronites QF2 transkriptsiooni- faktorit	Bloomington Drosophila Stock Center. Liin nr. <b>66466</b>  Välja töötatud: Christopher Potter, Chun-Chieh Lin (2016)
---	---------------------------	---	---

**Tabel 3.** Eksperimentides kasutatud Gal4-süsteemi äädikakärbestele liinid.

Kasutatud liin	Gal4-süsteem	Selgitus	Allikas
w[*]; PBac{y[+mDint2] w[+mC]=UAS-Abeta.1- 42}VK00033	UAS-A $\beta$ <sup>1-42</sup> <i>responder</i>	Ekspressseerib UAS kontrolli all A $\beta$ <sup>1-42</sup> peptiidi	Bloomington Drosophila Stock Center. Liin nr. <b>64216</b>  Välja töötatud: (Jonson et al., 2015)
w[*]; PBac{y[+mDint2] w[+mC]=UAS-Abeta.3- 42.E3A}VK00033	UAS-A $\beta$ <sup>3-42</sup> <i>responder</i>	Ekspressseerib UAS kontrolli all A $\beta$ <sup>3-42</sup> peptiidi	Bloomington Drosophila Stock Center. Liin nr. <b>64222</b>  Välja töötatud: (Jonson et al., 2015)
w[*]; PBac{y[+mDint2] w[+mC]=UAS-Abeta.11- 42}VK00033/TM3, Sb[1]	UAS-A $\beta$ <sup>11-42</sup> <i>responder</i>	Ekspressseerib UAS kontrolli all A $\beta$ <sup>11-42</sup> peptiidi	Bloomington Drosophila Stock Center. Liin nr. <b>64218</b>  Välja töötatud: (Jonson et al., 2015)
y[1] w[*]; P{w[+m*]=nSyb-GAL4.S}3	nSyb-Gal4 <i>driver</i>	Ekspressseerib neuronites Gal4 transkriptsiooni- faktorit	Bloomington Drosophila Stock Center. Liin nr. <b>51635</b>  Välja töötatud: Hugo J. Bellen; Julie Simpson (2013)
w[1118]	-	Metsiktüüpi geneetilise taustaga liin	Bloomington Drosophila Stock Center. Liin nr. <b>5905</b>  (Ryder et al., 2004)

Ristamiseks võeti 5-15 neitsiemast ja lisati viaali 5-10 isast kärbest. 4-5 päeva järel eemaldati vanemad viaalidest ning 9-11 päeva pärast koguti koorunud kärbeid katsete jaoks.

### 3.2.2. Ronimiskatsed, elulemuse jälgimine

Umbes 7-13 kärbest (emased ja isased eraldi) sorteeriti erinevatele kasvusubstraatidele (**Tabel 1**) 15 ml viaalidesse. Viaale hoiti 7 päeva inkubaatoris, tõstes iga kahe päeva järel kärbsed uuele söötmele. 7 päeva möödudes sooritati ronimiskatse. Selleks koputati kärbsed tühjadesse 15 ml viaalidesse, mis ühendatud teise samasuguse viaaliga liites need kokku läbipaistva teibiga. Katseviaalid paigutati



skaala ette, mis oli kõrguste järgi jaotatud võrdselt 10-ks segmendiks. Ronimise mõõtmiseks koputati kolme tugeva löögiga kärbsed viaalide põhja ja fotografeeriti tulemus 10 sekundi möödudes. Kärbestel lasti puhata 1 minut ja korrati sama katset veel kahel korral (kokku 3 kordust). Tehtud piltidelt registreeriti iga kärbsse ronimiskõrgus skaalal 1-10 ja arvutati viaalis olnud kärbsede keskmine ronimisskoor, et näha erinevusi liinide vahel ning LA- või Cu-toidu mõju.

Elulemuse jälgimiseks sorteeriti emased ja isased kärbsed eraldi 20-30 kaupa tavalise söötmega 15 ml viaalidesse ja hoiti 29°C inkubaatoris. Üle päeva tõsteti kärbsed värsele toidule, et vältida söötme riknemist ning loendati surnud kärbsed, et näha elulemuse erinevusi kasutatud liinide vahel.

### 3.2.3. Lõhnatundmise katse ja positiivne mälu katse

Lõhnakatses analüüsitakse kärbsede tundlikkust katses kasutatavate lõhnade suhtes võrreldes õhuga. Kärbsed sorteeriti (emased, isased eraldi) tavatoidule kahes korduses 10-40 kaupa. Kärbsed hoiti kuni katseni 7 päeva 29°C inkubaatoris ning viidi uuele kasvusubstraadile iga 2-3 päeva tagant. Katsele eelnevalt täideti lõhnakambrid 30 µl mineraalõlis lahjendatud lõhnadega (3-OCT 1:100, 4-MCH 1:67). Optimaalse koguse kärbsede analüüsiks liideti sama liini emased ja isased kärbsed kokku ja seejärel sisestati *T-maze* aparadi keskmisesse kambrisse (**Joonis 4**), lülitati sisse pump ning lasti kohanedada 90 sekundit. Samal ajal ühendati testimistuubid - ühel pool koos lõhnakambriga: 4-MCH või 3-OCT ja teisel pool ilma lõhnata tühi kamber (ainult õhk). Ruum pimendati kardinaga ja kärbsed lasti liftiga testimistuubidesse 120 sekundiks, misjärel kärbsed loendati. Lõhnatundmise katset korratakse eraldi mõlema lõhnaga ja arvutatakse kärbsede eelistusindeksid (ingl. k., *olfactory preference index*) kummagi lõhna suhtes valemiga:

$$eelistusindeks = \frac{kärbsed(lõhn) - kärbsed(\text{õhk})}{Kõik kärbsed}$$

Mälu katseks sorteeriti kärbsed (emased, isased eraldi) kahes korduses 10-40 kaupa C- ja LA-toidule (**Tabel 1**). Kärbsed hoiti 29°C inkubaatoris 7 päeva ja tõsteti uuele kasvusubstraadile iga kahe päeva tagant. Kuuendal päeval (16 h enne katset) koputati kärbsed nälgima ilma toiduta viaalidesse, mille põhjas oli veega immutatud õhuke kork. Nälgimine aitab suurendada suhkru mõju õppimisele.

Katse ettevalmistamiseks täideti lõhnakambrid 30 µl lahjendatud lõhnalahustega. Treeningtuubide seinad kaeti *Whatman* filterpaberiga. Seinad immutati vastavalt veega (CS<sup>-</sup>) või 2 M sahharoosi lahusega (CS<sup>+</sup>) ja kuivatati.

Enne katset liideti jällegi vastavate liinide sama toiduga emased ja isased kärbsed kokku. Kärbsed koputati CS<sup>-</sup> treeningtuubi ja liideti aparadiga. Lülitati sisse vaakumpump ning kärbsed kohanesid 90 sekundit. Seejärel lisati 120 sekundiks CS<sup>-</sup> lõhn. Aja möödudes eemaldati lõhn ning kärbsed taastusid 30 sekundit tavalise õhuvooluga. Seejärel koputati kärbsed suhkruga CS<sup>+</sup> treeningtuubi, liideti aparadiga ja koheselt lisati 120 sekundiks CS<sup>+</sup> lõhn. Treenimisfaasi lõppedes koputati kärbsed masina keskmisse vahelkambrisse ning lasti 90 sekundit puhata. Samaaegselt ühendati *T-maze* testimistuubid ja mõlemad lõhnakambrid ning katseruum pimendati kardinaga. Aja möödudes viidi kärbsed liftiga testimistuubide kambrisse. Valimine lõhnade vahel toimus 120 sekundi jooksul.

Seejärel kärbsed eraldati ja loendati mikroskoobi all. Katset korrati mõlema lõhnaga. Katsetulemuste põhjal arvutati sooritusindeks (ingl. k., *performance index*) valemiga:

$$\text{sooritusindeks} = \frac{CS^+ \text{ kärbeste arv} - CS^- \text{ kärbeste arv}}{\text{Kõik kärbsed}}$$

### 3.2.4. Metallide määramine äädikakärbse ajudest

Metallide määramiseks koguti Gal4-süsteemi isased ja emased kärbsed eraldi vastavatele kasvusubstraatidele (**Tabel 1**). Kärbsed hoiti 7 päeva 25°C inkubaatoris ja tõsteti iga 2-3 päeva järel uuele substraadile. Seejärel dissekteeriti ajud metallide sisalduse mõõtmiseks.

Dissekteerimine toimub stereomikroskoobi abil musta silikooniga kaetud aluse peal spetsiaalsete pintsettidega. Metallide saastuse vältimiseks pesti tööks vajalikud vahendid eelnevalt 2% HNO<sub>3</sub> lahusega. Dissekteeritavad kärbsed uinutati ja lõmastati alusele ilma päid vigastamata. Pead eemaldati ülejäänud keha küljest ja viidi puhvritilga (50 mM HEPES, 50 mM NaCl, pH=7,4) sisse, kus eemaldati aju ning puhastati muudest pea osadest (silmade jäägid, kitiinkest jms). Iga paralleeli kohta koguti 10 aju (5 isast, 5 emast). Dissekteeritud ajud viidi 1,5 ml happepestud tuubi 50 µl HEPES puhvri sisse. Kogutud paralleele hoiti kuni analüüsini -80°C juures.

Ajude lüüsimiseks lisati proovidele 100 µl 68% HNO<sub>3</sub> (A509 Trace Metal™, Fisher Chemical) ja inkubeeriti 24 h toatemperatuuril. ICP-MS analüüsi jaoks lahjendati lahused 3,4% HNO<sub>3</sub>-ni. Kõikide proovide ettevalmistuseks kasutati ultrapuhast Milli-Q vett takistusega 18.2 MΩ/cm, mis toodetud Merck Millipore Direct-Q & Direct-Q UV veepuhastussüsteemiga (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

Metalliliste elementide määramiseks kasutati käesolevas töös Agilent Technologies (Santa Clara, USA) Agilent 7800 seeria ICP-MS aparati (Agilent, USA), mis töötab piigi hüpperežiimis, 6 punkti piigi kohta, 100 skaneeringut replikaadi kohta, 5 kordust proovi kohta. Proovi sisestamiseks kasutati Agilent SPS-4 automaatset proovisisestajat (*autosampler*) (Agilent Technologies, USA). Aparatuuri kontrolliks ja andmete kogumiseks kasutati tarkvara *ICP-MS MassHunter 4.4* versiooni C.01.04 (Agilent Technologies, USA). Töö ICP-MS-iga teostati maatriksi üldises töörežiimis järgmistel tingimustel: RF võimsus 1550 W, nebulisaatorgaasi vooluhulk 1,05 l/min, plasmagaasi vooluhulk 15 l/min, nebuliseerija tüüp: MicroMist. Mõõtmised sooritati He režiimis.

ICP-MS aparaat kalibreeriti kasutades 3,4% HNO<sub>3</sub> multielementset kalibratsioonistandardit 2A (Agilent Technologies, USA), mis sisaldas Ag, Al, As, Ba, Be, Ca, Cd, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, Ga, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Rb, Se, Sr, Tl, U, V, Zn tasemetel 0,5-50 ppb. Sisestandard metallide määramiseks oli Ge<sup>72</sup> (ICP-MS sisemine standardsegu 1 µg/mL 3,4%-lises HNO<sub>3</sub>-s, Agilent Technologies). Proovides määrati Cu<sup>63</sup>, Fe<sup>56</sup>, Mn<sup>55</sup> ja Zn<sup>66</sup> elementide sisaldused.

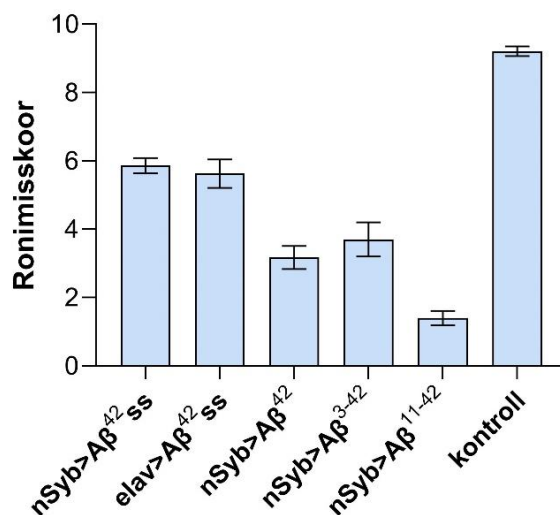
### 3.3. Andmete analüüs

Andmete visualiseerimiseks ja statistiliseks analüüsiks kasutati GraphPad Prism 10 programmi. Joonistel on andmed esitatud kujul: keskvärtus ± standardviga (SEM). Statistiliselt oluliseks peeti p-väärtusi <0,05.

## 4. Tulemused

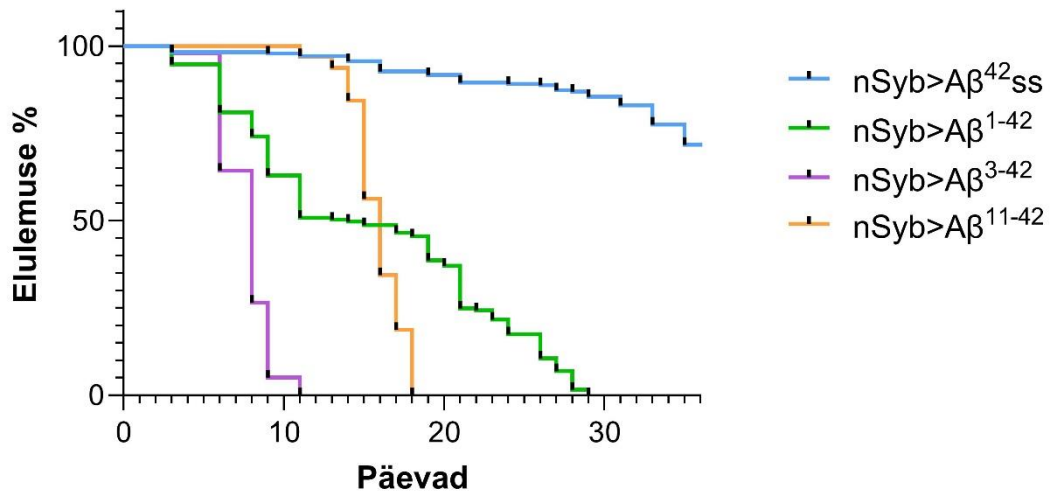
### 4.1. Eelkatsed

Kärbestega tehti esialgsed ronimiskatsed veendumaks, et näeme AT kärbestes negatiivset geotaksise efekti ning saaksime planeerida edasiseid katseid. Tulemustest (**Joonis 5**) näeme, et Q-süsteemi liinide nSyb>A $\beta^{42}$ ss ja elav>A $\beta^{42}$ ss ronimisskoor oli Gal4-süsteemi liinidest parem.



**Joonis 5. Ronimiskatse erineva A $\beta$  ekspressiooniga liinide võrdlemiseks.** Kasutatud Q-süsteemi liinid: nSyb>A $\beta^{42}$ ss, elav>A $\beta^{42}$ ss, kontroll (QUAS-A $\beta^{42}$ ss). Kasutatud Gal4-süsteemi liinid: nSyb>A $\beta^{1-42}$ , nSyb>A $\beta^{3-42}$ , nSyb>A $\beta^{11-42}$ . Kärbsed kasvatati tavalisel toidul 7 päeva 29°C inkubaatoris. Joonisel on esitatud keskvärtus  $\pm$  SEM, n=6, igas paralleelis 7-13 kärbest.

Elulemuskatse tulemustest (**Joonis 6**) näeme, et juba 11 päevaga hukkusid kõik nSyb>A $\beta^{3-42}$  kärbsed ja seega otsustati nendega antud uurimuses edasi mitte töötada. nSyb>A $\beta^{1-42}$  ja nSyb>A $\beta^{11-42}$  tulemused olid keskmised: elasid vastavalt 18. ja 29. päevani. Nende liinidega otsustati uurida nii LA- kui Cu-toidu mõju kärbsede ronimistulemusele, aga ka metallide sisaldusele ajus. nSyb>A $\beta^{42}$ ss kärbsed olid kõige elujõulisemad ja parema ronimisskooriga, mistõttu otsustati neid LA mõju uurimiseks edaspidi kasutada mälu katsetes.

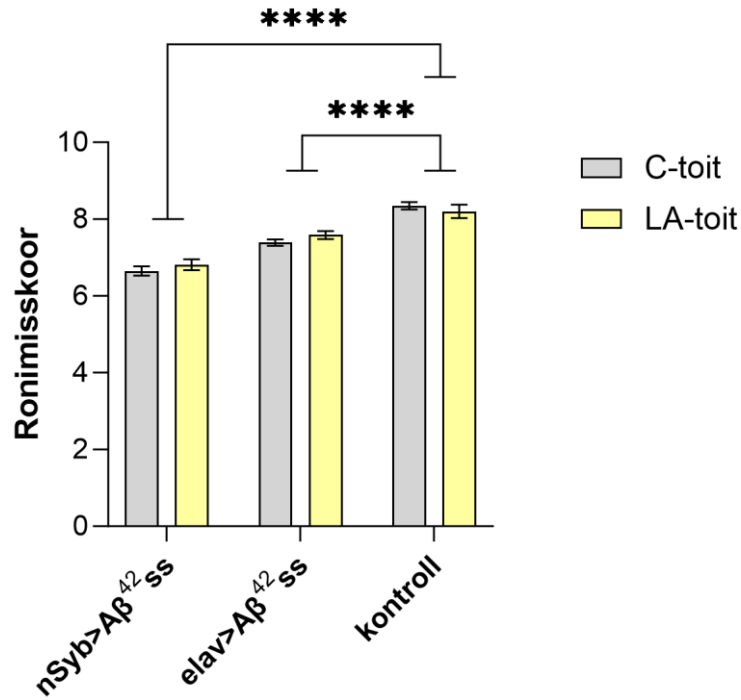


**Joonis 6. Erinevate AT transgeensete äädikakärbeste elulemuse jälgimine.** Kasutatud liinid: nSyb>Aβ<sup>42</sup>ss (sinine), nSyb>Aβ<sup>1-42</sup> (roheline), nSyb>Aβ<sup>3-42</sup> (lilla), nSyb>Aβ<sup>11-42</sup> (oranž). Kärbeid kasvatati tavatoidul 29°C juures. Elulemuse jälgimine lõpetati katse 37. päeval. Analüüsiks kasutati Log-rank (Mantel-cox) testi, n=4.

## 4.2.Q-süsteemi liinid

### 4.2.1. Ronimiskatse

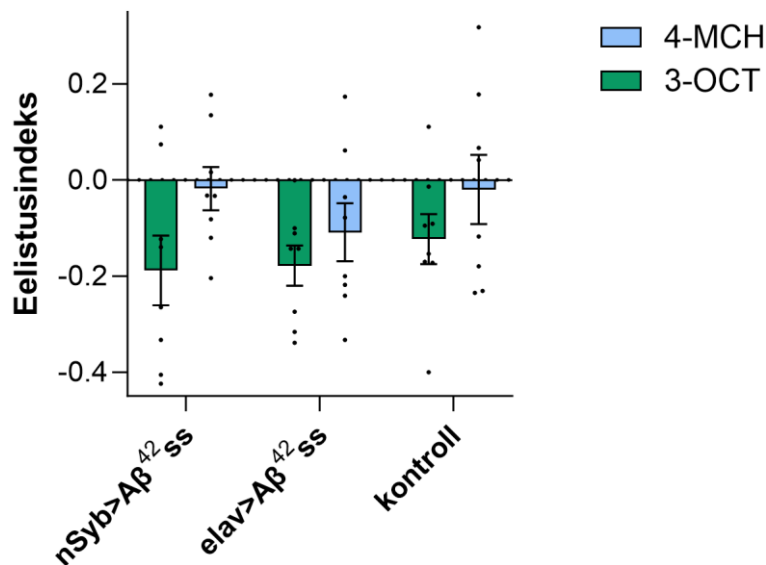
Q-süsteemi kärbeste ronimistulemustest (**Joonis 7**) näeme, et LA-toidul kasvatatud kärbestel puudub statistiliselt oluline ronimiskoori erinevus võrreldes kontrolltoidu kärbestega. Nii elav>Aβ<sup>42</sup>ss kui nSyb>Aβ<sup>42</sup>ss kärbeste ronimistulemus oli võrreldes kontroll-liini kärbestega vähenenud, viidates AT fenotüübi olemasolule.



**Joonis 7. LA mõju Q-süsteemi AT kärbeste ronimisele.** Katses kasutatud liinid: nSyb>Aβ<sup>42</sup>ss, elav>Aβ<sup>42</sup>ss, QUAS-Aβ<sup>42</sup>ss (kontroll). Kärbsed kasvatati 7 päeva C (0,96% EtOH) ja LA (2 mM LA; 0,96% EtOH) kasvusubstraatidel 29°C juures. Tulemuste põhjal arvutati keskmine ronimisskoor. Joonisel on esitatud keskväärtsus ± SEM, n=60-90, igas paralleelis 7-13 kärbest. Tulemuste statistiline analüüs teostati GraphPad Prismi abil kasutades *Two-way* ANOVA testi koos Tukey mitmekordse võrdlusega.

#### 4.2.2. Lõhnatundmiskatse

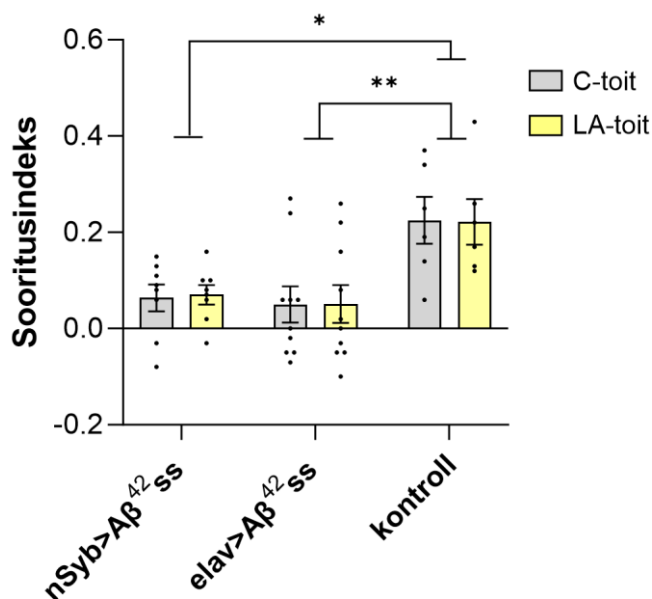
Eelnevalt on näidatud, et 4-MCH ja 3-OCT on tõrjuvad lõhnad (Hussain et al., 2018). Q-süsteemi kärbeste lõhnatundmise katse tulemustest (**Joonis 8**) näeme, et kõik kasutatud liinid lähevad eemale 3-OCT lõhnast, aga 4-MCH lõhna tunnevad ainult elav>Aβ<sup>42</sup>ss kärbsed. nSyb>Aβ<sup>42</sup>ss ja kontrollkärbsed 4-MCH lõhna õhuvoolust ei eristanud.



**Joonis 8. Q-süsteemi AT kärbe**ste tundlikkus 3-OCT ja 4-MCH lõhna suhtes. Kasutati Q-süsteemi liine: nSyb>Aβ<sup>42</sup>ss, elav>Aβ<sup>42</sup>ss, QUAS-Aβ<sup>42</sup>ss (kontroll). Kärbeid kasvatati 7 päeva tavatoidul 29°C juures. Katses kasutati lahjendatud lõhnalahuseid 1:100 3-oktaanool (3-OCT) ja 1:67 4-metüülsükloheksanool (4-MCH). Tulemuste põhjal arutati kärbe

#### 4.2.3. Positiivne mälu

Positiivse mälu katse tulemustest (**Joonis 9**) näeme, et nii elav>Aβ<sup>42</sup>ss kui nSyb>Aβ<sup>42</sup>ss kärbe



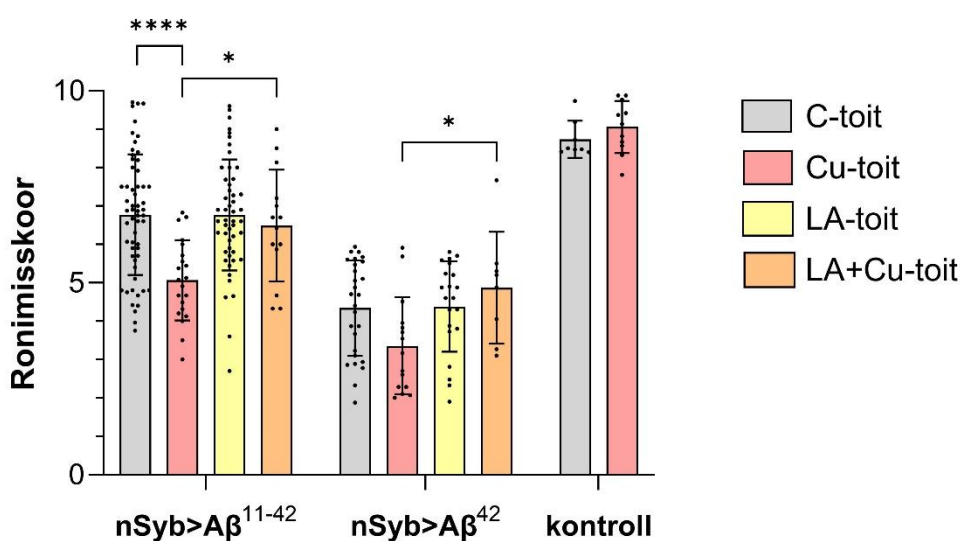
**Joonis 9. LA mõju Q-süsteemi AT kärbe**ste õppimisvõimele/lühimälule. Kasutati Q-süsteemi liine: nSyb>Aβ<sup>42</sup>ss, elav>Aβ<sup>42</sup>ss, QUAS-Aβ<sup>42</sup>ss (kontroll). Kärbeid kasvatati 7 päeva C (0,96% EtOH) ja LA (2 mM LA; 0,96% EtOH) toidul 29°C juures. 16 h enne katse algust tõsteti kärbe

OCT) ja 1:67 4-metüülsükloheksanool (4-MCH). CH<sup>+</sup> treeningtuubi seinä immutamiseks kasutati 2 M sahharoosi lahust. Tulemuste põhjal arvutati kärbeeste keskmine sooritustusindeks (ingl. k., *performance index*). Joonisel on esitatud keskvaartus ± SEM, n=8-11 katset, igas paralleelis keskmiselt 30-60 kärbest. Tulemuste statistiline analüüs teostati GraphPad Prismi abil kasutades *Two-way ANOVA* testi koos Šidák'i testiga.

### 4.3. Gal4-süsteemi liinid

#### 4.3.1. Ronimiskatse

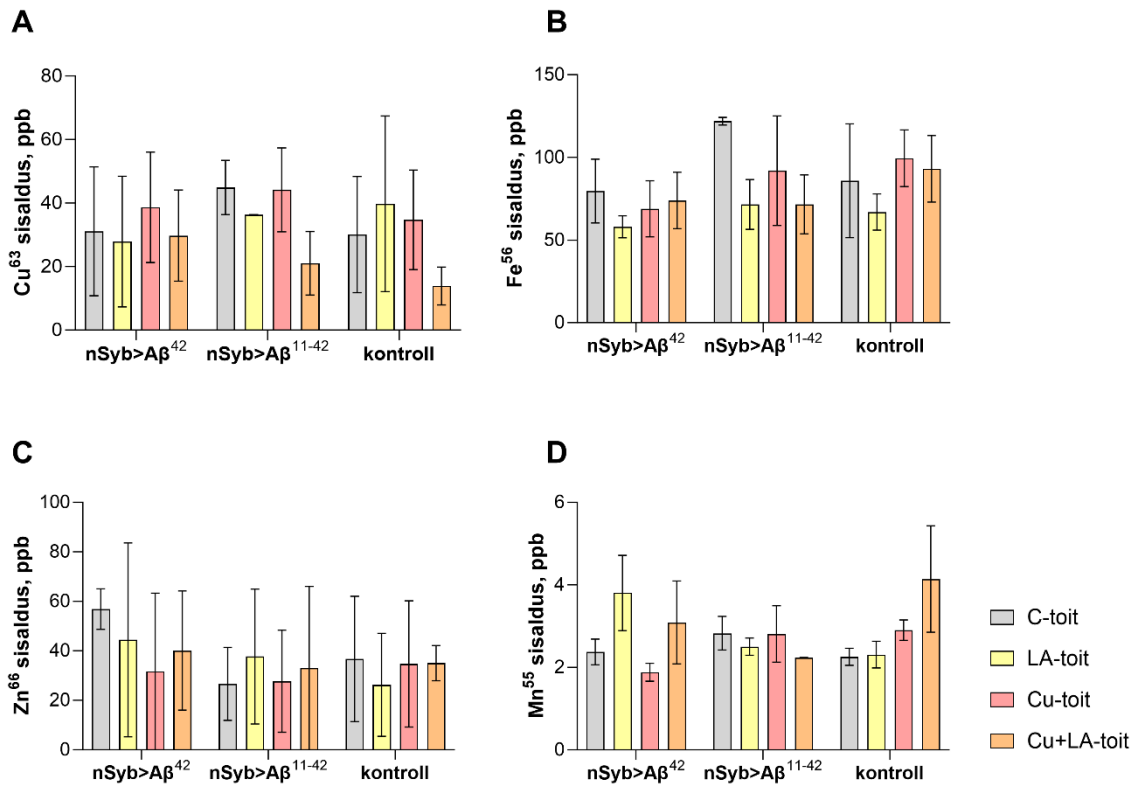
Gal4-süsteemi kärbeeste ronimistulemustest (Joonis 10) näeme, et nSyb>Aβ<sup>1-42</sup> ja nSyb>Aβ<sup>11-42</sup> AT kärbesed ronivad võrreldes kontrollkärbestega halvemini. AT kärbeestele LA-toidu söötmine ronimistulemust ei parandanud. Cu-toit langetas AT kärbeeste ronimistulemust ning kontrollkärbestel selline efekt puudus. Lisades Cu-toidule LA-d paranes AT kärbeeste ronimistulemus.



**Joonis 10. Cu- ja LA-toidu mõju Gal4-süsteemi AT kärbeeste ronimisele.** Katses kasutati Gal4-süsteemi liine: nSyb>Aβ<sup>42</sup>, nSyb>Aβ<sup>11-42</sup>, nSyb>w<sup>1118</sup> (kontroll). Kärbeeste kasvatati 7 päeva C (0,96% EtOH), LA (2 mM LA; 0,96% EtOH), Cu (0,2 mM CuCl<sub>2</sub>; 0,5% HCl) ning Cu + LA (0,2 mM CuCl<sub>2</sub>; 0,5% HCl, 2 mM LA; 0,96% EtOH) toidul 25°C juures. Joonisel on esitatud keskvaartus ± SEM, n=10-60 igas paralleelis 7-13 kärbest. statistiline analüüs teostati GraphPad Prismi abil kasutades One-way ANOVA testi koos Tukey mitmekordse võrdlusega.

#### 4.3.2. Kärbeeste ajudes metallide määramine

ICP-MS meetodiga määrati nelja olulise biometalli (Cu<sup>63</sup>, Fe<sup>56</sup>, Zn<sup>66</sup> ja Mn<sup>55</sup>) sisaldus kärbeeste ajudes (Joonis 11). Enim sisaldab kärbeeste aju rauda, järgnevad sarnase sisaldusega vask ja tsink ning tunduvalt vähem sisaldab aju mangaani. Väikse paralleelkatsete arvu (vaid kaks) tõttu praegusel hetkel järeldusi erinevate kasvusubstraatide mõjust teha ei saa.



**Joonis 11. Cu- ja LA-toidu mõju biometallide sisaldusele Gal4-süsteemi AT kärbe ajus.** Määrati nelja elemendi sisaldus: **A)**  $\text{Cu}^{63}$ , **B)**  $\text{Fe}^{56}$ , **C)**  $\text{Zn}^{66}$  ja **D)**  $\text{Mn}^{55}$ . Kasutati Gal4-süsteemi liine: nSyb>A $\beta^{42}$ , nSyb>A $\beta^{11-42}$ , nSyb>w<sup>1118</sup> (kontroll). Kärbeid kasvatati 7 päeva 25°C juures kasvusubstraatidel: **C-toit** (0,96% EtOH), **LA-toit** (2 mM LA; 0,96% EtOH), **Cu-toit** (0,2 mM  $\text{CuCl}_2$ ; 0,5% HCl) ning **Cu + LA-toit** (0,2 mM  $\text{CuCl}_2$ ; 0,5% HCl; 2 mM LA; 0,96% EtOH). Ühe proovi kohta koguti 50  $\mu\text{l}$  HEPES puhvrissi 10 äädikakärbe dissekteeritud aju (5 emast, 5 isast). Sooritati kaks korduskatset. Joonisel on esitatud keskväärtnus  $\pm$  SEM, n=2 katset.



## 5. Arutelu

AT puhul esineb ajus lisaks amüloidsetele naastudele ja teistele muutustele vase düshomöostaas. On näidatud, et ekstratsellulaarselt on ajus vase üleküllus ja vaskioonid akumulereuvad amüloidsetesse naastudesse, kuid samaaegselt on intratsellulaarses keskkonnas vase defitsiit (Miller et al., 2006; Schrag et al., 2011). Seega võiks vase metabolismi reguleerimine olla alternatiivne terapeutiline lähenemine AT puhul. Arvestades LA erinevaid positiivseid omadusi, on seda ühendit uuritud seoses erinevate neurodegeneratiivsete haiguste korral ning ka üldise neurotoksilisuse ja vananemisega (Molz & Schröder, 2017).

Meie uurimisrühm on näidanud, et DHLA seob  $\text{Cu}^{1+}$  ioone optimaalse tugevusega (Smirnova et al., 2018) ning seejuures suudab viia vaskioone ekstratsellulaarsest ruumist neuronilaadsetesse rakkudesse, mis võiks tasakaalustada häiritud vase metabolismi (Metsla et al., 2022). Seetõttu võiks LA osutada kasulikuks nii AT ennetamises kui ravis. Lisaks on meie uurimisrühm näidanud transgeensete Iowa mutatsiooniga  $\text{A}\beta$ -t ekspresseerivate AT kärbeste mudelis, et LA parandab ronimiskatses kärbeste lokomotoorset aktiivsust (Metsla et al., 2022).

Käesoleva töö eesmärgiks oli täiendavalt uurida LA mõju erinevatele AT *Drosophila* mudelliinidele sooritades käitumiskatseid. Samuti huvitas meid LA ja vasega rikastatud kasvusubstraadi koosmõju uurimine nii ronimiskatsetega, kui ka määrides ICP-MS meetodil vase ning teiste oluliste biometallide tasemeid kärbeste ajudes.

Eelkatsete käigus võrdlesime ronimiskatsete ja elulemuse jälgimise kaudu erinevaid AT mudelliine. Katsetulemuste põhjal selgus, et Q-süsteemiga  $\text{A}\beta^{42}$ ss peptiidi ekspresseerivate kärbeste lokomotoorne aktiivsus ning elulemus olid tunduvalt paremad ülejäänud liinidest (**Joonis 5** ja **Joonis 6**) mistõttu otsustati neid edaspidi rakendada mälu katsetes. Mälu katsetele lisaks sooritati lõhnaeristamise katsed veendumaks, et kärbseliinid eristavad katses kasutatavaid lõhnu. Lõhnaeristamiskatse tulemustest (**Joonis 8**) selgus, et kärbsed eristavad piisavalt 4-OCT lõhna ning vastavalt negatiivsele eelistusindeksile toimib see nende jaoks eemale tõrjuvalt, mida on ka varem kirjeldatud (Hussain et al., 2018). 3-MCH puhul oli vaid elav  $\text{A}\beta^{42}$ ss kärbeste eelistusindeks negatiivne ning nSyb  $\text{A}\beta^{42}$ ss ja kontrollkärbsed (QUAS- $\text{A}\beta^{42}$ ss) nimetatud lõhna õhuvoolust pigem ei eristanud.

Mälu katse põhjal (**Joonis 9**) positiivset LA mõju kärbeste sooritusele ei nähtud. Ronimiskatse tulemused (**Joonis 7**) ühtisid mälu katse omadega - LA neuroprotektiivset toimet täiskasvanud kärbestele ei selgunud. Selline negatiivne tulemus aga kindlasti veel ei tähenda, et LA-l puudub mõju AT fenotüübile. Meie hüpoteesi põhjal võiks LA abil vase metabolismi reguleerimine aidata eelkõige varajases AT faasis ja see võib olla ka üheks põhjuseks, miks me ei näinud soovitud LA mõju. Eelpool kirjeldatud käitumiskatsete jaoks alustati kärbestele LA söötmist alles alates valmikustaadiumist, kuid  $\text{A}\beta^{42}$ ss ekspressioon kärbsetes algab juba varasemates elustaadiumites ning valmikustaadiumiks võib pöördumatu neurodegeneratsioon olla juba toimunud. Varem on mitmete loomkatsetega näidatud LA positiivset mõju neurodegeneratsioonile, sh AT puhul. APP üleekspressiooniga AT mudelhiirte puhul parandas LA söötmine mälu, kuid ei vähendanud  $\text{A}\beta$

tasemeid (Quinn et al., 2007). Lisaks on läbi viidud kaks uuringut AT patsientide peal, mille põhjal järeldati, et LA manustamine stabiliseeris dementsuse edasist süvenemist patsientidel (Hager et al., 2001, 2007).

Järgnesid uuringud Gal4-süsteemi liinidega. Varem sooritatud elulemuskatse tulemuste (**Joonis 6**) põhjal nägime, et nSyb>A $\beta^{3-42}$  kärbeste eluiga oli tunduvalt madalam teistest liinidest. Töömahu optimeerimise eesmärgil otsustati nimetatud liiniga selle töö raames mitte edasi töötada ning vase ja LA kasvusubstraadi mõjusid uuriti edasi nSyb>A $\beta^{1-42}$ , nSyb>A $\beta^{11-42}$  ning nSyb>w\* (kontroll) kärbestega. Ronimiskatsest nende liinidega (**Joonis 10**) selgus, et A $\beta^{42}$  peptiidi ekspresseerimine avaldas suuremat toksilisust, kui A $\beta^{11-42}$ , mis vastab ka varem nende liinidega tehtud toksilisuse katsetele (Jonson et al., 2015). Vase kasvusubstraadi söötmine langetas oluliselt mõlema AT mudelliini ronimist ning kontrollkärbeste puhul selline mõju puudus. Varem on näidatud AT jäneste mudeli peal, et juba väga väikesed vase kogused (0,12 ppm) joogivees, indutseerivad kolesterooli dieediga jänestel A $\beta$  ladestumist ja amüloidsetele naastudele sarnaste struktuuride moodustumist ajus, millega kaasnesid ka raskused keerulisemate ülesannete täitmisel (Sparks & Schreurs, 2003). Mis kõige põnevam - LA lisamisega vase kasvusubstraadile kirjeldatud negatiivne mõju pöördus. Seega nägime LA neuroprotektiivset toimet vasest tingitud toksilisusele AT fenotüübi puhul. ATCUN (ingl.k. *amino terminal Cu(II)- and Ni(II)-binding*) motiivi tõttu seob A $\beta^{11-42}$  suurema afiinsusega vaskioone (Noormägi et al., 2023), mistõttu kahtlustasime selle peptiidi puhul suuremat vase-toidu mõju. Katsetulemuste põhjal A $\beta^{11-42}$  siiski oluliselt suuremat toksilisust ei näidanud võrreldes A $\beta^{1-42}$  liiniga. Edaspidi soovime samade liinidega sooritada ka lõhna- ja mälukatseid, et näha, kas esineb sarnane vase ja LA vaheline efekt.

Metallide sisalduse määramise katse (**Joonis 11**) suure mahukuse tõttu (ühe paralleelkatse jaoks koguti 120 dissekteeritud aju) jõuti läbi viia vaid kaks katset ja seega vajab see katse järelduste tegemiseks lisakorduseid. Siiski valideerisime, et suudame selle meetodiga edukalt oluliste biometallide sisaldust määrata. Oluline on ka märkida, et kuigi kasutatud vahendeid puhastati eelnevalt 2% HNO<sub>3</sub> lahusega, siis mõne analüüsitud proovi puhul esines kontaminatsioonikahtlus ning seega tasuks kindlasti täiendavalt analüüsida võimalikke saastuse allikaid dissekteerimisel.

Käesolevas töös kasutatud liinide puhul rakendati AT mudelis erinevate A $\beta$  peptiidide ekspressiooni. Edasistes katsetes soovime kasutada äädikakärbseid, kellel on lisaks A $\beta$  ekspressioonile samaaegselt häiritud vase metabolism. Selleks vaigistame RNA interferentsi (RNAi) abil vase metabolismis olulisi geene nagu CTR1C, ATOX ja DmATP7. Käitumiskatsed selliste liinidega töötavad tuua detailsemaid selgitusi selle kohta, kuidas LA täpsemalt vase metabolismi AT puhul mõjutab.

## Kokkuvõte

Alzheimeri tõbi (AT) on üks levinumaid dementsuse vorme, mille all kannatab üle 55 miljoni inimese üle maailma. Kuigi seda haigust on intensiivselt uuritud, ei ole efektiivset ravi seni leitud. Täpsed haiguse tekkepõhjused on veel lahtised, aga teame, et üheks esimeseks ja oluliseimaks muutuseks AT patsiendi ajus on A $\beta$  peptiidide ladestumine amüloidseteks naastudeks. Lisaks on kirjeldatud ka mitmete biometallide tasemete häireid. Vase metabolismi puhul on märgatud samaaegselt ekstratsellulaarselt vaskioonide liiga, millega kaasnevad toksilised reaktsioonid ning oksüdatiivne stress, kui ka intratsellulaarset defitsiiti, mille tagajärel häirub mitmete oluliste vaskensüümide töö. Selline vaskioonide paigutus võib olla põhjustatud interaktsioonidest A $\beta$  peptiididega ning nende koostoime mängib eeldatavasti olulist rolli AT patogeneesis.

Alfa-lipoehape (LA) on nii vesi- kui rasvlahustuv naturaalne antioksidantse toimega metalliioonidega seostuv ligand. Tänu oma mitmekülgsetele omadustele võiks LA aidata AT puhul vaskioonide sisaldust tasakaalustada ning seeläbi olla kasulik nii haiguse ennetamises kui ravis. Varasemalt on meie grupis näidatud LA positiivset mõju nii rakukultuurides, kui AT *Drosophila* mudelites. Käesoleva töö eesmärgiks oli täiendavalt uurida LA mõju erinevate äädikakärbse AT mudelliinide lokomotoorsele aktiivsusele ja mälule ning lisaks AT patoloogias oluliste biometallide sisaldusele ajus.

Antud töös kasutatud kärbeste AT mudelliinide puhul me LA positiivset mõju täiskasvanud kärbeste lokomotoorsele aktiivsusele või ka mälule ei näinud. Gal4-süsteemi abil A $\beta^{42}$  ja A $\beta^{11-42}$  peptiide ekspresseerivate liinide puhul selgus, et vasega rikastatud kasvusubstraadi söötmine langetas oluliselt kärbeste ronimisskoori, kuid LA söötmine vähendas kirjeldatud vase toksilisust. Selleks, et teha järeldusi kärbeste ajus biometallide sisalduse muutuste kohta, on vajalik sooritada täiendavaid katseid.

Vananeva rahvastikuga seoses süveneb aina enam vajadus efektiivse AT ravi järele, mida praegusel hetkel veel saadaval pole. Arvestades AT keerukat patogeneesi ning äädikakärbse anatoomilist erinevust ei ole käesoleva töö tulemused otseselt ülekantavad inimesele, kuid aitavad sellegipoolest selgitada LA olulisust AT puhul vase metabolismi reguleerimisel. Muidugi ei maksa ka unustada, et LA võib oma mitmekülgselt heade omaduste tõttu osutada tervendavaks ka teistsuguste toimemehhanismide kaudu.

## Abstract

Alzheimer's disease (AD) is one of the most common forms of dementia, affecting more than 55 million people worldwide. Although this disease has been studied for a long time, no effective treatment has yet been found. The exact causes of the disease are still not known, but we know that one of the first and most important changes in the brain of an AD patient is the deposition of A $\beta$  peptides into amyloid plaques. In addition, disturbances in the levels of several biometals have also been described. In the case of copper metabolism, an excess of extracellular copper ions, which is accompanied by toxic reactions and oxidative stress, as well as an intracellular deficit, which subsequently disrupts the work of several important copper enzymes, has been noticed. This arrangement of copper ions may be caused by interactions with A $\beta$  peptides, which is expected to play an important role in the pathogenesis of AD.

Alpha-lipoic acid (LA) is a water- and fat-soluble natural metal-binding ligand with antioxidant activity. Due to its versatile properties, LA could help to balance the content of copper ions in AD brain and thus be useful both in the prevention and treatment of the disease. Previously, our group has found a positive effect of LA both in cell cultures and in AD *Drosophila* models. The aim of this study was to further investigate the effect of LA on the locomotor activity and memory of different fruit fly AD model lines, and also detect the effect of LA on the content of biometals important in AD pathology in the brain.

In case of the AD model lines used in this work, we did not see a positive effect of LA on the locomotor activity or memory of adult flies. In the case of lines expressing A $\beta$ <sup>42</sup> and A $\beta$ <sup>11-42</sup> peptides using the Gal4 system, it was found that feeding copper-enriched growth medium significantly decreased the climbing score of flies, but feeding LA rescued the described copper toxicity. Further experiments are needed to draw conclusions about the changes in biometal content in the flies' brains.

In connection with the aging population, the need for effective AD treatment, which is not yet available, is increasing. Considering the complex pathogenesis of AD and the anatomical difference of the fruit fly, the results of this work cannot be directly transferred to humans, but they nevertheless help to explain the importance of LA in the regulation of copper metabolism in AD. Of course, we should not forget that LA can also prove to be healing through other mechanisms of action due to its versatile properties.

## Tänuavaldused

Suurim tänu minu põhijuhendajale Sigrid Kirssile, kes abistas nii teadmiste kui ka katsete läbiviimisega. Tema energia ja motivatsioon muutsid töö sooritamise mõnusaks ja muretuks. Samuti soovin tänada professor Peep Palumaad igakülgse juhendamise eest kogu töö vältel.

Suur aitäh Julia Smirnovale, kes juhendas ja viis läbi analüüse ICP-MS aparaadiga ning ka ülejäänud metalloproteoomika rühma liikmetele, kes olid mulle igakülgset toeks.

Eriline tänu molekulaarse neurobioloogia uurimisrühma liikmetele: Mari Palgile, kes aitas planeerida mitmeid katseid, samuti Carl Sander Kiirele ja Laura Tambergile, kelle jagatud teadmised ja oskused olid suureks abiks kärbestega töötamisel.

## Kirjanduse loetelu

- 2023 Alzheimer's disease facts and figures. (2023). *Alzheimer's & Dementia*, 19(4), 1598–1695. <https://doi.org/10.1002/alz.13016>
- Adlard, P. A., Cherny, R. A., Finkelstein, D. I., Gautier, E., Robb, E., Cortes, M., Volitakis, I., Liu, X., Smith, J. P., Perez, K., Laughton, K., Li, Q.-X., Charman, S. A., Nicolazzo, J. A., Wilkins, S., Deleva, K., Lynch, T., Kok, G., Ritchie, C. W., ... Bush, A. I. (2008). Rapid Restoration of Cognition in Alzheimer's Transgenic Mice with 8-Hydroxy Quinoline Analogs Is Associated with Decreased Interstitial A $\beta$ . *Neuron*, 59(1), 43–55. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.06.018>
- Bekris, L. M., Yu, C.-E., Bird, T. D., & Tsuang, D. W. (2010). Genetics of Alzheimer disease. *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology*, 23(4), 213–227. <https://doi.org/10.1177/0891988710383571>
- Bier, E. (2005). Drosophila, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. *Nature Reviews Genetics*, 6(1), 9–23. <https://doi.org/10.1038/nrg1503>
- Braak, H., & Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathologica*, 82(4), 239–259. <https://doi.org/10.1007/BF00308809>
- Brockmann, R., Nixon, J., Love, B. L., & Yunusa, I. (2023). Impacts of FDA approval and Medicare restriction on anti-amyloid therapies for Alzheimer's disease: patient outcomes, healthcare costs, and drug development. *The Lancet Regional Health - Americas*, 20, 100467. <https://doi.org/10.1016/j.lana.2023.100467>
- Bulcke, F., Dringen, R., & Scheiber, I. F. (2017). *Neurotoxicity of Copper* (pp. 313–343). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-60189-2\\_16](https://doi.org/10.1007/978-3-319-60189-2_16)
- Bulska, E., & Wagner, B. (2016). Quantitative aspects of inductively coupled plasma mass spectrometry. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 374(2079), 20150369. <https://doi.org/10.1098/rsta.2015.0369>
- Bush, A. (2000). Metals and neuroscience. *Current Opinion in Chemical Biology*, 4(2), 184–191. [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(99\)00073-3](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(99)00073-3)
- Cherny, R. A., Atwood, C. S., Xilinas, M. E., Gray, D. N., Jones, W. D., McLean, C. A., Barnham, K. J., Volitakis, I., Fraser, F. W., Kim, Y.-S., Huang, X., Goldstein, L. E., Moir, R. D., Lim, J. T., Beyreuther, K., Zheng, H., Tanzi, R. E., Masters, C. L., & Bush, A. I. (2001). Treatment with a Copper-Zinc Chelator Markedly and Rapidly Inhibits  $\beta$ -Amyloid Accumulation in Alzheimer's Disease Transgenic Mice. *Neuron*, 30(3), 665–676. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00317-8](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00317-8)
- Cras, P., Kawai, M., Lowery, D., Gonzalez-DeWhitt, P., Greenberg, B., & Perry, G. (1991). Senile plaque neurites in Alzheimer disease accumulate amyloid precursor protein. *Proceedings of the*

*National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(17), 7552–7556.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.88.17.7552>

*Drosophila Olfactory Operant Conditioning - Maze Engineers*. (n.d.). Retrieved April 23, 2024, from  
<https://maze.conductscience.com/portfolio/drosophila-olfactory-operant-conditioning#documentation>

Fonte, J., Miklossy, J., Atwood, C., & Martins, R. (2001). The severity of cortical Alzheimer's type changes is positively correlated with increased amyloid- $\beta$  Levels: Resolubilization of amyloid- $\beta$  with transition metal ion chelators. *Journal of Alzheimer's Disease*, 3(2), 209–219.  
<https://doi.org/10.3233/JAD-2001-3206>

Haass, C. (2004). Take five—BACE and the  $\gamma$ -secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid  $\beta$ -peptide generation. *The EMBO Journal*, 23(3), 483–488.  
<https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600061>

Haass, C., Kaether, C., Thinakaran, G., & Sisodia, S. (2012). Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(5), a006270.  
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006270>

Hager, K., Kenklies, M., McAfoose, J., Engel, J., & Münch, G. (2007).  $\alpha$ -Lipoic acid as a new treatment option for Alzheimer's disease — a 48 months follow-up analysis. In *Neuropsychiatric Disorders An Integrative Approach* (pp. 189–193). Springer Vienna. [https://doi.org/10.1007/978-3-211-73574-9\\_24](https://doi.org/10.1007/978-3-211-73574-9_24)

Hager, K., Marahrens, A., Kenklies, M., Riederer, P., & Münch, G. (2001). Alpha-lipoic acid as a new treatment option for Alzheimer type dementia. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 32(3), 275–282. [https://doi.org/10.1016/S0167-4943\(01\)00104-2](https://doi.org/10.1016/S0167-4943(01)00104-2)

Hippius, H., & Neundörfer, G. (2003). The discovery of Alzheimer's disease. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 5(1), 101–108. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2003.5.1/hhippius>

Houk, R. S., Fassel, V. A., Flesch, G. D., Svec, H. J., Gray, A. L., & Taylor, C. E. (1980). Inductively coupled argon plasma as an ion source for mass spectrometric determination of trace elements. *Analytical Chemistry*, 52(14), 2283–2289. <https://doi.org/10.1021/ac50064a012>

Huang, X., Atwood, C. S., Hartshorn, M. A., Multhaup, G., Goldstein, L. E., Scarpa, R. C., Cuajungco, M. P., Gray, D. N., Lim, J., Moir, R. D., Tanzi, R. E., & Bush, A. I. (1999). The A $\beta$  Peptide of Alzheimer's Disease Directly Produces Hydrogen Peroxide through Metal Ion Reduction. *Biochemistry*, 38(24), 7609–7616. <https://doi.org/10.1021/bi990438f>

Hussain, A., Pooryasin, A., Zhang, M., Loschek, L. F., La Fortezza, M., Friedrich, A. B., Blais, C.-M., Üçpunar, H. K., Yépez, V. A., Lehmann, M., Gompel, N., Gagneur, J., Sigrist, S. J., & Grunwald Kadow, I. C. (2018). Inhibition of oxidative stress in cholinergic projection neurons fully rescues

- aging-associated olfactory circuit degeneration in *Drosophila*. *ELife*, 7. <https://doi.org/10.7554/eLife.32018>
- Jonson, M., Pokrzywa, M., Starkenberg, A., Hammarstrom, P., & Thor, S. (2015). Systematic A $\beta$  Analysis in *Drosophila* Reveals High Toxicity for the 1-42, 3-42 and 11-42 Peptides, and Emphasizes N- and C-Terminal Residues. *PLOS ONE*, 10(7), e0133272. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133272>
- Li, Y. X., Sibon, O. C. M., & Dijkers, P. F. (2018). Inhibition of NF- $\kappa$ B in astrocytes is sufficient to delay neurodegeneration induced by proteotoxicity in neurons. *Journal of Neuroinflammation*, 15(1), 261. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1278-2>
- Malik, B. R., & Hodge, J. J. L. (2014). *Drosophila* Adult Olfactory Shock Learning. *Journal of Visualized Experiments*, 90. <https://doi.org/10.3791/50107>
- Mariano, V., Achsel, T., Bagni, C., & Kanellopoulos, A. K. (2020). Modelling Learning and Memory in *Drosophila* to Understand Intellectual Disabilities. *Neuroscience*, 445, 12–30. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.07.034>
- Maynard, C. J., Cappai, R., Volitakis, I., Cherny, R. A., White, A. R., Beyreuther, K., Masters, C. L., Bush, A. I., & Li, Q.-X. (2002). Overexpression of Alzheimer's Disease Amyloid- $\beta$  Opposes the Age-dependent Elevations of Brain Copper and Iron. *Journal of Biological Chemistry*, 277(47), 44670–44676. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204379200>
- Metsla, K., Kirss, S., Laks, K., Sildnik, G., Palgi, M., Palumaa, T., Tõugu, V., & Palumaa, P. (2022).  $\alpha$ -Lipoic Acid Has the Potential to Normalize Copper Metabolism, Which Is Dysregulated in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 85(2), 715–728. <https://doi.org/10.3233/JAD-215026>
- Miller, L. M., Wang, Q., Telivala, T. P., Smith, R. J., Lanzirrotti, A., & Miklossy, J. (2006). Synchrotron-based infrared and X-ray imaging shows focalized accumulation of Cu and Zn co-localized with  $\beta$ -amyloid deposits in Alzheimer's disease. *Journal of Structural Biology*, 155(1), 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2005.09.004>
- Molz, P., & Schröder, N. (2017). Potential Therapeutic Effects of Lipoic Acid on Memory Deficits Related to Aging and Neurodegeneration. *Frontiers in Pharmacology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00849>
- Morgan, T. H. (1910). Sex Limited Inheritance in *Drosophila*. *Science*, 32(812), 120–122. <https://doi.org/10.1126/science.32.812.120>
- Nichols, C. D. (2006). *Drosophila melanogaster* neurobiology, neuropharmacology, and how the fly can inform central nervous system drug discovery. *Pharmacology & Therapeutics*, 112(3), 677–700. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2006.05.012>



- Nichols, E., Steinmetz, J. D., Vollset, S. E., Fukutaki, K., Chalek, J., Abd-Allah, F., Abdoli, A., Abualhasan, A., Abu-Gharbieh, E., Akram, T. T., Al Hamad, H., Alahdab, F., Alanezi, F. M., Alipour, V., Almustanyir, S., Amu, H., Ansari, I., Arabloo, J., Ashraf, T., ... Vos, T. (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)
- Noormägi, A., Golubeva, T., Berntsson, E., Wärmländer, S. K. T. S., Tõugu, V., & Palumaa, P. (2023). Direct Competition of ATCUN Peptides with Human Serum Albumin for Copper(II) Ions Determined by LC-ICP MS. *ACS Omega*, *8*(37), 33912–33919. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c04649>
- Packer, L., Tritschler, H. J., & Wessel, K. (1997). Neuroprotection by the Metabolic Antioxidant  $\alpha$ -Lipoic Acid. *Free Radical Biology and Medicine*, *22*(1–2), 359–378. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(96\)00269-9](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(96)00269-9)
- Piaceri, I. (2013). Genetics of familial and sporadic Alzheimer's disease. *Frontiers in Bioscience*, *E5*(1), E605. <https://doi.org/10.2741/E605>
- Quinn, J. F., Bussiere, J. R., Hammond, R. S., Montine, T. J., Henson, E., Jones, R. E., & Stackman, R. W. (2007). Chronic dietary  $\alpha$ -lipoic acid reduces deficits in hippocampal memory of aged Tg2576 mice. *Neurobiology of Aging*, *28*(2), 213–225. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.12.014>
- Riabina, O., Vernon, S. W., Dickson, B. J., & Baines, R. A. (2019). Split-QF System for Fine-Tuned Transgene Expression in *Drosophila*. *Genetics*, *212*(1), 53–63. <https://doi.org/10.1534/genetics.119.302034>
- Robert, A., Liu, Y., Nguyen, M., & Meunier, B. (2015). Regulation of Copper and Iron Homeostasis by Metal Chelators: A Possible Chemotherapy for Alzheimer's Disease. *Accounts of Chemical Research*, *48*(5), 1332–1339. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.5b00119>
- Roberts, B. R., Ryan, T. M., Bush, A. I., Masters, C. L., & Duce, J. A. (2012). The role of metallobiology and amyloid- $\beta$  peptides in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, *120*(s1), 149–166. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07500.x>
- Ryder, E., Blows, F., Ashburner, M., Bautista-Llacer, R., Coulson, D., Drummond, J., Webster, J., Gubb, D., Gunton, N., Johnson, G., O'Kane, C. J., Huen, D., Sharma, P., Asztalos, Z., Baisch, H., Schulze, J., Kube, M., Kittlaus, K., Reuter, G., ... Russell, S. (2004). The DrosDel Collection. *Genetics*, *167*(2), 797–813. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.026658>
- Schrag, M., Mueller, C., Oyoyo, U., Smith, M. A., & Kirsch, W. M. (2011). Iron, zinc and copper in the Alzheimer's disease brain: A quantitative meta-analysis. Some insight on the influence of citation bias on scientific opinion. *Progress in Neurobiology*, *94*(3), 296–306. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.05.001>

- Selkoe, D. J., & Hardy, J. (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Molecular Medicine*, 8(6), 595–608. <https://doi.org/10.15252/emmm.201606210>
- Shay, K. P., Moreau, R. F., Smith, E. J., Smith, A. R., & Hagen, T. M. (2009). Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: Molecular mechanisms and therapeutic potential. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1790(10), 1149–1160. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.07.026>
- Smirnova, J., Kabin, E., Järving, I., Bragina, O., Tõugu, V., Plitz, T., & Palumaa, P. (2018). Copper(I)-binding properties of de-coppering drugs for the treatment of Wilson disease.  $\alpha$ -Lipoic acid as a potential anti-copper agent. *Scientific Reports*, 8(1), 1463. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19873-2>
- Sparks, D. L., & Schreurs, B. G. (2003). Trace amounts of copper in water induce  $\beta$ -amyloid plaques and learning deficits in a rabbit model of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(19), 11065–11069. <https://doi.org/10.1073/pnas.1832769100>
- St Johnston, D. (2002). The art and design of genetic screens: *Drosophila melanogaster*. *Nature Reviews Genetics*, 3(3), 176–188. <https://doi.org/10.1038/nrg751>
- Tatulian, S. A. (2022). Challenges and hopes for Alzheimer's disease. *Drug Discovery Today*, 27(4), 1027–1043. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2022.01.016>
- Tiiman, A., Palumaa, P., & Tõugu, V. (2013). The missing link in the amyloid cascade of Alzheimer's disease – Metal ions. *Neurochemistry International*, 62(4), 367–378. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2013.01.023>
- Tully, T., & Quinn, W. G. (1985). Classical conditioning and retention in normal and mutant *Drosophila melanogaster*. *Journal of Comparative Physiology A*, 157(2), 263–277. <https://doi.org/10.1007/BF01350033>
- Venken, K. J. T., Simpson, J. H., & Bellen, H. J. (2011). Genetic Manipulation of Genes and Cells in the Nervous System of the Fruit Fly. *Neuron*, 72(2), 202–230. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.09.021>
- Whitehouse, P., Price, D., Struble, R., Clark, A., Coyle, J., & DeLong, M. R. (1982). Alzheimer's Disease and Senile Dementia: Loss of Neurons in the Basal Forebrain. *Science*, 215(4537), 1237–1239. <https://doi.org/10.1126/science.7058341>

## Lisad

### Lihtlitsents

Mina, Janar Varik

1. Annan Tallinna Tehnikaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

„Alfa-lipoeehappe neuroprotektiivne toime Alzheimeri tõve äädikakärbse mudelites“, mille juhendajad on Sigrid Kirss ja 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.

29/05/2024