

## **Madalmolekulaarne vase kandja hiirte uriini proovidest**

Bakalaureusetöö

Üliõpilane: Andrei Jepifanov

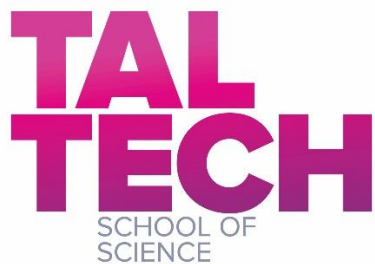
Üliõpilaskood: 213012LAAB

Juhendajad: Julia Smirnova, PhD, teadur

Ekaterina Kabin, PhD, insener

Keemia ja Biotehnoloogia Instituut

Õppekava: Rakenduskeemia, toidu- ja geenitehnoloogia



# **Low molecular weight copper carrier from the mice urine samples**

Bachelor thesis

Student: Andrei Jepifanov

Student code: 213012LAAB

Supervisors: Julia Smirnova, PhD, researcher

Ekaterina Kabin, PhD, engineer

Department of Chemistry and Biotechnology

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: Andrei Jepifanov

[allkiri ja kuupäev]

Töö vastab bakalaureusetööle esitatavatele nõuetele.

Juhendajad: Julia Smirnova; Ekaterina Kabin

[allkiri ja kuupäev]

Töö on lubatud kaitsmisele.

Kaitsmiskomisjoni esimees: Indrek Koppel

[allkiri ja kuupäev]

# Sisukord

Sissejuhatus.....	6
1. Kirjanduse ülevaade .....	7
1.1. Vase metabolism.....	7
1.2. Wilsoni tõbi.....	8
1.3. Wilsoni tõve ravi .....	10
1.4. Wilsoni tõve loomamudelid.....	11
1.5. Väike vase transporter, SCC.....	12
2. Töö eesmärgid.....	13
3. Materjalid ja meetodid.....	14
3.1. Materjalid .....	14
3.2. Meetodid .....	14
3.2.1. Valkude uurimine eksklusioonikromatograafia abil.....	14
3.2.2. Massispektromeetria .....	16
3.2.2.1. ICP-MS.....	17
3.2.2.2. LC-ICP MS proovidest.....	18
3.2.2.3. MALDI MS .....	18
3.2.2.4. MALDI MS vaske sisaldavatest fraktsioonidest .....	19
4. Tulemused.....	20
4.1. SEC .....	20
4.2. LC-ICP MS.....	20
4.3. MALDI MS .....	21
5. Arutelu.....	24
Kokkuvõte.....	25
Abstract .....	26
Tänuavaldused .....	27
Lisad.....	28
Kasutatud kirjandus.....	29

## Lühendite loetelu

BAL – 2,3-dimeerkaptopropanool

CcO - tsütokroom c oksüdaas

CP – tseruloplasmiin

Cu,Zn-SOD1 - Cu,Zn-superoksiidi dismutaas

ESI – elektropihustusionisatsioon

ICP - induktiivsidestatud plasma

KF - Kayser-Fleischer

LC - vedelikkromatograafia

LEC - Long-Evansi kaneelirott

MALDI - maatrikseotud laserdesorptsioon/ionisatsioon

MS - massispektromeetria

MT – metallotioneiin

PA - D-penitsillamiin

ROS - aktiivseid hapnikuühendeid

SCC – väike vase transporter

SEC – eksklusioonikromatograafia

TOF - lennuajaanalüsaator

TR – trietüleentetramiindivesinikkloriid

TTM – ammoniumtetratiomolübdiaat

tx - toksilise piima hiir

WT – Wilsoni tõbi

## Sissejuhatus

Wilsoni tõbi (WT) on autosoomne retsessiivne haigus, mis on põhjustatud *ATP7B* geeni mutatsioonidest, mis põhjustavad P-tüüpi ATPaasi ATP7B talitlushäireid. Haiguse levimus on 1:30'000 ning on kirjeldatud juba rohkem, kui 500 mutatsiooni *ATP7B* geenis. Suurim kogus ATP7B valku leidub hepatotsüütides, kus ta täidab vase kehast eemaldamise funktsiooni sapi kaudu ning sisestab vaske tseruloplasmiini, mis omakorda vabastatakse verre. Vase homöostaas on organismis rangelt reguleeritud, kuna suurtes kogustes on vask mürgine ja põhjustab oksüdatiivset stressi.

WT korral on ATP7B valgu mõlemad funktsioonid häiritud, mis viib liigse vase kogunemisele raku sees, põhjustades selle hävimise. Samuti laguneb apo-tseruloplasmiin mittemetalleerumise tõttu ja selle kontsentratsioon veres väheneb. Tseruloplasmiini vere tase muutus on üheks WT diagnoosimise testiks, kuid ainult selle järgi WT diagnoosida ei saa. Lisaks sellele on WT patsientidel suurenenud vase sisaldus uriinis, mis on teine WT iseloomulik tunnus.

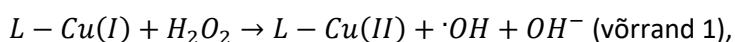
Kuigi haigus on üsna hästi uuritud ja on juba leitud mitmeid tõhusaid ravimeetodeid, pole siiani teada, kuidas vask WT põdevatel patsientidel uriiniga eritub. Varasemad uuringud on näidanud, et vask ei esine uriinis vabas vormis, vaid on seotud väikese molekulmassiga molekuliga, mida nimetati väikeseks vase kandjaks (SCC). Samuti on näidanud, et SCC kogus suureneb vastusena vaba vase kontsentratsiooni suurenemisele. Lisaks sellele on väidetud, et SCC leidub ka tervetel inimestel.

Käesoleva töö eesmärgiks oli tuvastada SCC ning samuti seda iseloomustada. Katsed viidi läbi kolme erinevat tüüpi hiirte uriini proovidega: *Atp7b<sup>+/+</sup>*, *Atp7b<sup>ΔHep</sup>* ja *Atp7b<sup>-/-</sup>*. Neid proove analüüsiti SEC, LC-ICP MS ja MALDI MS meetoditega. Katse tulemused võivad anda täiendavaid teadmisi SCC kohta ning panusata WT uuringutesse.

# 1. Kirjanduse ülevaade

## 1.1. Vase metabolismism

Vask on kõigi elusorganismide üks peamisi mikroelemente. Vask osaleb redoks katalüüsis, samuti sünaptilises ülekandes ja mängib kofaktori rolli Cu,Zn-superoksiidi dismutaasi (Cu,Zn-SOD1) ja tsütokroom c oksüdaasi (CcO) ensüümides (Cobine et al., 2021). Samuti osaleb ta mitogeenaaktiveeritud proteiinkinaasi MEK1 poolt Erk fosforüleerimisel (Turski et al., 2012) ja cAMP lagundava fosfodiesteri PDE3B reguleerimisel (Krishnamoorthy et al., 2016). Ühelt poolt avaldab vask positiivset mõju rakkude talitlusele, soodustades ensüümide korrektset toimimist. Teisest küljest tuleb selle kontsentratsiooni rakus hoolikalt reguleerida, kuna vask võib suuremal kontsentratsioonil avaldada ka toksilist mõju rakkudele (Gaetke & Chow, 2003). Vase toksiline mõju avaldub reaktsioonis vesinikperoksiidiga produtseerides aktiivseid hapnikuühendeid (ROS), nagu hüdroksüül radikaal läbi Fenton reaktsiooni (võrrand 1):

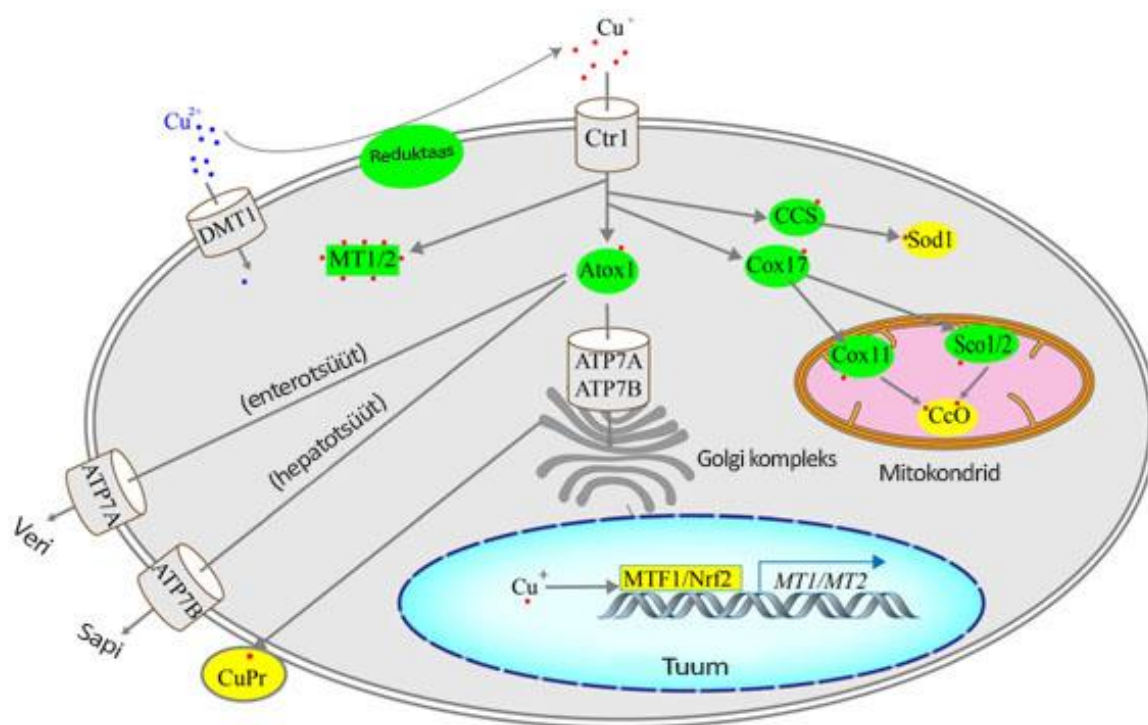


kus L on ligand (Gaetke & Chow, 2003). Need ühendid kahjustavad DNA-d, lipiide ja ensüüme, häirides raku funktsioneerimist, mis võib viia selle surmani (Marnett, 2000, Phaniendra et al., 2015, Stadtman & Levine, 2000, Ylä-Herttua, 1999).

Imetajatel omastavad vaske toidust peensoole enterotsüüdid (Doguer et al., 2018). Raku pinnal olevad transporterid, divalentne metalli transporter-1 (DMT1) ja CTR1 transpordivad vastavalt Cu(II) ja Cu(I) ioone. Rakusiseses ruumis esineb vase redutseeritud vorm redutseerivate ainete NADPH ja glutatiooni (GSH) suure kontsentratsiooni tõttu. Cu(II) on peamiselt leitud valkudes, mis osalevad redoks katalüüsis (Falcone et al., 2021). Selleks, et moodustada Cu(I) ioone, on raku pinnal spetsiaalsed reduktaasid, mis viivad vase Cu(II) olekust Cu(I) olekusse, soodustades transporti läbi peamise CTR1 transportvalgu (Ohgami et al., 2006). Kui vask on imendunud, seondub see kohe glutatiooniga, mis transpordib vase kõrgema afiinsusega valkudele (Maryon et al., 2013). Spetsiaalsed vaske siduvad valgud ehk vase šaperoonid, transpordivad Cu(I) organellidesse ning vahendavad vase seondumist valkudega, toetades rakkude funktsioneerimist (Palumaa, 2013). Vase šaperoon superoksiidi dismutaasile (CCS) transpordib ja aitab aktiveerida tsütosoolses piirkonnas Cu,Zn-SOD1, mis omab antioksidatiivset rolli, vähendades ROS ühendite taset (Wong et al., 2000). COX17 transpordib ja metallirib vasega COX11 ja SCO1 šaperoone, mis omakorda transpordivad ja metallirivad vastavalt COX1 Cu<sub>B</sub>-saiti ning COX2 Cu<sub>A</sub>-saiti. COX1 ja COX2 on CcO kaks peamist subühikut. CcO osaleb raku hingamisahelas vahendades elektroni ülekandmist ning tekitab molekulaarsest hapnikust kaks vee molekuli (Banci et al., 2004). ATOX1 transpordib ja vahetab vaske vase ATP-aasidega ATP7A ja ATP7B, mis asuvad trans-Golgi rajas (Hatori & Lutsenko, 2016). ATP7A ja ATP7B valgud eemaldavad liigset vaske enterotsüütidest või hepatotsüütidest vastavalt verre või sappi (Chen et al., 2020).

Vase homöostaasi rajas osalevad ka metallotioniinid (MT-d), valgud, millel on tugev afiinsus Cu(I) ioonide suhtes (Juárez-Rebollar et al., 2017). MT-d peetakse antioksidantideks, kuna nad võivad siduda metalle, mis on iseeneslikult toksilised (kaadmium ja elavhõbe) või põhjustavad ROS ühendite moodustumist (vask), lisaks seovad MT-d ka Zn(II) ioone (Thirumothy et al., 2011). MT-d on võimelised reguleerida metallioonide tasemeid rakus, kuna neid sünteesitakse vastuseks vase

või tsiingi taseme tõusule. Vastupidi, kui metallioonide kontsentratsioon rakus väheneb, siis metallid vabastatakse MT-dest, et tagada vajalike metallide optimaalset kontsentratsiooni (Coyle et al., 2002). Rakusisene vase lihtsustatud metabolism on illustreeritud joonisel 1.



**Joonis 1. Vase rakusisene metabolism.** Cu(II) - sinine; Cu(I) - punane; DMT1 - Cu(II) transporter; Ctr1 - Cu(I) transporter; MT1/2 - metallotioneiinid; ATOX1 - vase šaperon ATP7A ja ATP7B vase P-tüüpi ATPaasile; COX17, COX11 ja SCO1/2 - vase šaperonid tsütokroom c oksüdaasile (CcO); CCS - vase šaperon Cu,Zn-superoksiidi dismutaasile (Cu,Zn-SOD1); CuPr - sekretoorne vase valk. Kohandatud allikast (Chen et al., 2020).

Kui üks või mitu osalejat vase jaotusahelas ei tööta, põhjustab see tõsiste patoloogiate teket. Näiteks, mutatsioonid geenides *ATP7B* ja *ATP7A*, mis on otseselt seotud vase jaotumisega kehas, kutsuvad esile vastavalt vase kuhjumist või selle puudumist. Need haigused on tuntud Wilsoni ja Menkesi tõve nimede all (Kaler, 2013).

## 1.2. Wilsoni tõbi

Wilsoni tõbi (WT) on autosoomne retsessiivne haigus, mis on põhjustatud mutatsioonidest *ATP7B* geenis. Haiguse levimus on vanuses 5 – 35 aastat ligikaudu 1 juhtum 30'000-st. Varajasel diagnoosimisel on WT ravitav, kuid hilisemates staadiumites avastamisel lõpeb surmaga (Członkowska et al., 2018). *ATP7B* geenis on kirjeldatud rohkem, kui 500 mutatsiooni, millest 380 viivad valgu funktsionaalsuse täieliku kadumiseni (Ferenci et al., 2012).

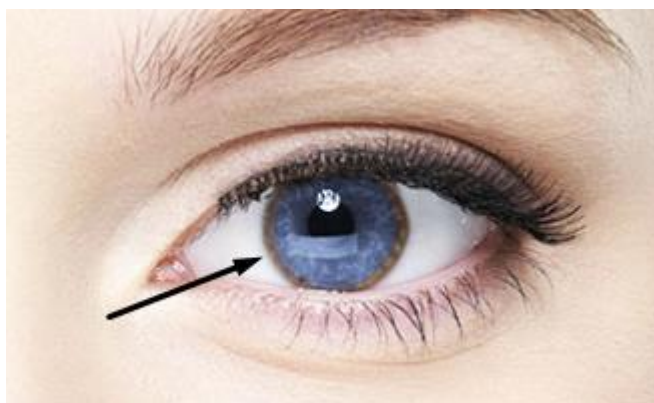
*ATP7B* valku ekspresseeritakse enamasti maksarakkudes (hepatotsüütides), kuid väike kogus esineb ka ajus. Sellest tulenevalt akumulereb vask peamiselt maksas ja ajus, mis põhjustab tõsistel juhtudel vastavalt maksatsirroosi või neurodegeneratsioonist põhjustatud psüühikahäireid. Liigne vask võib kanduda ka vereringesse, mis võib mõjutada selle ladestumist teistesse kehaosadesse, põhjustades tüsistusi südames, neerudes ja silmades (Ferenci et al., 2012).



ATP7B valgu põhiülesanne on eemaldada sapi kaudu organismist liigne vask. Selle valgu teine funktsioon on vasest sõltuva ensüümi tseruloplasmiini (CP) metalleerimine. CP on valk, mis katalüüsib raua oksüdeerumist Fe(II)-st Fe(III)-le, omades samal ajal tugevat vase sidumisvõimet. Pärast metalleerimist eksporditakse CP vereringesse, kus ta transpordib vaske seda vajavatesse rakkudesse (Mzhel'skaya, 2000).

WT korral on ATP7B valgu mõlemad funktsioonid häiritud. Apo-CP ei ole aktiivne ja seda lagundatakse proteasoomides, mis viib CP taseme langusele veres. Seetõttu CP madal tase vereplasmas on üks WT diagnoosimise tunnuseid (Kojimahara et al., 1995).

Samuti on WT patsientide tunnuseks Kayser-Fleischeri (KF) ringi olemasolu silma sarvkesta ümber (joonis 2) (Goel et al., 2019). Need on põhjustatud vase ladestumise tõttu sarvkihi tagumisel piirkihil ja neid diagnoositakse peamiselt neuroloogilise kahjustusega patsientidel. KF ringide olemasolu ei häiri nägemisfunktsiooni. KF ringe saab diagnoosida kasutades pilulampi ning peale adekvaatset ja pikaajalist ravi ringid kaovad (Ala et al., 2007).



**Joonis 2.** Kayser-Fleischeri ring. Allikas: (<https://wilsondisease.org/do-i-have-wilson-disease/kayser-fleischer-rings/>).

Wilsoni tõve diagnoosimiseks on võimatu tugineda ainult ühele konkreetsele tunnusele, vaid tuleb arvesse võtta mitmeid näitajaid. Alles pärast seda saab teha kindla järelduse diagnoosi kohta. Õigeks diagnoosimiseks mõõdetakse CP kontsentratsioon vereplasmas, kontrollitakse KF ringide olemasolu silmades ja mõõdetakse vase kontsentratsiooni uriinis (Roberts & Schilsky, 2008). Lisaks on heaks diagnostiliseks meetodiks vahetatava vase sisalduse (CuEXC) mõõtmine vereplasmas. WT patsientidel on CuEXC tase kõrgem, kui tervetel, mis teeb CuEXC tase mõõtmine usaldusväärseks ja kiireks WT diagnoosimise meetodiks (Woimant et al., 2019). Kui saadud tulemustes on ebaselgusi, siis tehakse maksakoe histoloogiline analüüs, kus mõõdetakse vase kontsentratsiooni 1 grammi kuivatatud materjali kohta (Roberts & Schilsky, 2008). Skriining ATP7B geeni mutatsioonide tuvastamiseks on veel üheks tõhuseks võimaluseks tuvastada WT haiguse ohuga patsiente. Näiteks, viidi selline skriinig läbi Puerto Ricos vastsündinute populatsioonis, mis andis võimaluse vanemaid ette teavitada, et lapsel on oht WT tekkeks (Vicario-Feliciano et al., 2022). Eestis viidi läbi Eesti Biopangast 210'000 geenidoonorite elektrooniliste haiguslugude uuring, kus tuvastati 17 kõrge riskiga potentsiaalset WT patsienti. Arstile tagasikutsumise visiitide tulemusena leiti, et nendel inimestel oli vähenenud tseruloplasmiini ja vase tasemed plasmas ning neist enamikul esinesid neurodegeneratsiooni varased või hilised nähud (Nurm et al., 2024).

Kahe viimase uuringu põhjal võivad inimese genoomi skriiningud ja geenipangad saada usaldusväärseteks meetoditeks WT enneaegseks diagnoosimiseks.

### 1.3. Wilsoni tõve ravi

Wilsoni tõbi on ravitav ja tänaseks on välja töötatud üsna tõhusad meetodid. Haigus on hästi ravitav varajases staadiumis. Ravi tulemusena inimene võib kaotada kõik haiguse sümptomid ja elada normaalset elu (Aggarwal & Bhatt, 2018). Peamine WT ravimeetod on kelateerimine, ehk vase sidumine ja organismist eemaldamine. Kõige enimkasutatavad kelaatorid on 2,3-dimeerkaptopropanool (BAL), D-penitsillamiin (PA), trietüleentetramiindivesinikkloriid (trientiin) (TR) ja ammoniumtetratiomolübdaat (TTM) (Walshe, 1999). Kelaatorite struktuuri joonised on toodud Lisas 1. Haiguse hilisemates staadiumites kasutatakse maksa siirdamist.

BAL oli esimene kelaator, mis suutis vaske kehast eemaldada (Denny-Brown & Porter, 1951). Kuigi see ravim on mõne WT patsiendi puhul näidanud paranemist, on see aja jooksul näidanud ka palju puudusi. Seda manustatakse intramuskulaarselt, mis põhjustas valu ja hematoomide süstimise kohas. Samuti kujunes aja jooksul välja tolerantsus ravimi suhtes, mis omas ravis vastupidist mõju (Aggarwal & Bhatt, 2018). Praegu püütakse seda ravimit mitte kasutada ja minna üle vähem ohtlikule suukaudsele ainele, milleks on TR või PA (Aggarwal & Bhatt, 2014).

PA on praegu üks paljudest populaarsetest kelaatoritest. PA kasulikke omadusi kirjeldati juba 1956. aastal. PA suurendas vase eritumist kehast mitu korda võrreldes BAL-iga ja sellel oli vähem kõrvaltoimeid (Walshe, 1956). Ravi määramisel jälgitakse patsiendi esimestel nädalatel tähelepanelikult ja annust reguleeritakse olenevalt kõrvaltoimete esinemisele. Mõnedel patsientidel võib esineda esimestel nädalatel talumatus PA suhtes (Weiss et al., 2013). Sellisel juhul määratakse kas väiksem doos või minnakse üle teisele ravimile. Kui esimestel kasutusnädalatel kõrvaltoimeid ei esine, määratakse PA patsiendile eluaegseks kasutamiseks. Üks tõsisemaid kõrvaltoimeid on neuroloogiliste kõrvalnähtude suurenemine PA-d kasutavatel patsientidel. Arvatakse, et selle põhjuseks on liigse vase vabanemine vereringesse, mis omakorda põhjustab ajurakkude kahjustusi (Kalita et al., 2014).

Juhul, kui patsientidel ilmnevad PA kõrvaltoimed, kasutatakse WT raviks TR-i. Võrreldes PA-ga on sellel ravimil pisut halvem võime eemaldada kehast vaske, kuid TR-il on vähem tõsiseid kõrvaltoimeid. Seetõttu on trientiin WT puhul teine kõige sagedamini kasutatav kelaator (Walshe, 1982). Mõned patsiendid on aja jooksul kogunud PA-ga sarnaseid neuroloogilisi kõrvaltoimeid, kuid nende vähendamiseks võib annust vähendada või üle minna mõnele teisele ravimile (Litwin et al., 2015).

Kuna PA ja TR puhul avaldusid neuroloogilised kõrvalnähtud, siis pakuti välja uus ravim - TTM, millel on kõrge efektiivsus ning samal ajal vähem raskeid ja sagedasi kõrvaltoimeid. TTM on juba näidanud eeliseid varasemate ravimite ees 2. faasi kliinilistel uuringutel, samuti patsientidel, kes ei talu PA, TR ja BAL-i. TTM läbib praegu 3. faasi kliinilisi uuringuid ja on juba näidanud, et tal on oluliselt vähem neuroloogiliste kõrvaltoimete esinemissagedus. Kuna TTM-i pikaajalist toimet pole veel põhjalikult uuritud, on selle efektiivsus ja kasutamine ravimina eksperimentaalne (De Fabregues et al., 2020, Smirnova et al., 2018)

Ravimina kasutatakse ka tsingi soolasid (sulfaati, atsetaati või glükonaati), mis stimuleerivad MT-de tootmist enterotsüütides (Brewer, 1999). MT-del on vase suhtes suurem afiinsus kui tsingi suhtes, mistõttu metallotioneiniid seovad soolestikus rakku sisenevat vaske ega lase seda verre. See ravimeetod ei ole kõige tõhusam ja seda ei kasutata sageli, kuid seda saab kasutada ennetava meetmena või haiguse varajases staadiumis (Aggarwal & Bhatt, 2018).

WT puhul kasutatakse ravi täiendusega ka madala vasesisaldusega dieeti (Uriu-Adams & Keen, 2005).

#### 1.4. Wilsoni tõve loomamudelid

Kuna mitmetel patsientidel kutsub kelaatravi esile ebameeldivaid neuroloogilisi sümptomeid ning samuti pole WT mehhanismid täielikult arusaadavad, oleks vaja uuringuid jätkata. Teadusuuringutes kasutatakse WT mudelloomi, et mõista haigusprotsesse ja leida sobivad ravimeetodid, mida saab inimestele rakendada. On mitmeid WT hiirte ja rottide mudeleid, mille puhul on hea sümptomite sarnasus inimestega ja seepärast on nad ka kõige paremini sobilikud inimeste WT uurimiseks. Need WT mudelid on Long-Evansi kaneelirott (LEC), toksilise piima hiir (tx) ja *Atp7b* geeni kogu keha nokaut hiir (*Atp7b<sup>-/-</sup>*) (Reed et al., 2018).

LEC mudel on enim uuritud. *Atp7b* geenis avastati autosomaalse retsessiivse päranduvusega mutatsioon, mis viis sünteesitud valgu funktsiooni kadumiseni. LEC-rottidel ilmnis vase taseme tõus maksas, hepatiidi teke, tseruloplasmiini taseme langus vereseerumis, samuti vase sisalduse langus sapi seerumis (Okayasu et al., 1992, Wu et al., 1994, Yamada et al., 1993). Rottidel avastati ka mõned neuroloogilised kõrvalekalded, mis olid arvatavasti seotud vase vabanemist hepatotsüütidest ja selle ülekandmist ajju (Hayashi et al., 2006). Kõik ülalnimetatud sümptomid esinevad ka WT patsientidel, seega valiti see mudel edasiseks *in vivo* katseteks. LEC mudeli kasutades demonstreeriti *Atp7b* valgu võime eemaldada vaske sapi kaudu ning sisestada teda CP-sse. Samuti viidi läbi maksa siirdamise katsed (Terada et al., 1999, Terada et al., 1998). Kuigi sellel mudelil on palju sarnasusi, on sellel ka oma erinevusi WT-st. Näiteks, neil loomadil esineb sageli hepatotsellulaarne- ja kolangiokartsinoom, mis esineb ainult 1,2%-l haigestunud inimestest. Samuti puuduvad rottidel KF ringid ja neuroloogiline pilt ei ole täiesti sarnane inimesel täheldatavaga, mis tekitab WT modelleerimisel mõningaid piiranguid (Pfeifferberger et al., 2015, Reed et al., 2018).

Toksilise piima hiire (tx) avastas professor Rauch 1974. aastal. Vastsündinud hiired olid nõrgad, neil oli vähenenud pigmentatsioon, kehv kasv, värisemine ja ebanormaalne liikumiskäitumine, mis viis surmani 2 nädala jooksul (Rauch et al., 1983). Selgus, et selle fenotüübi põhjustas madal vase kontsentratsioon emarottide piimas, mis omakorda oli põhjustatud autosomaalsest retsessiivsest mutatsioonist *Atp7b* geenis. Mutatsioon viis *Atp7b* valgu funktsionaalsuse kadumiseni ja emasloomas kogunes vask ajus, maksas ja teiste organite kudedes, kuid ei eritunud piima kaudu. Poegade toitmine terve ema piimaga viis nende seisundi paranemiseni ja selle tulemusena normaalse arenguni (Michalczyk et al., 2000, Rauch et al., 1983).

Professor Jacksoni laboris avastati sarnane mudel *Atp7b* geeni mutatsiooniga (tx<sup>J</sup>), mis tekitab sarnaseid sümptomeid tx rottidega. Mutatsioon tõi kaasa vanematel rottidel vase taseme tõusu maksas, madala CP taseme veres ja vase taseme languse nende piimas (Coronado et al., 2001). Selles mudelis tuvastati mõned neuroloogilised kõrvalekalded, sarnaselt inimpatsientidega, kuid

siiani pole selge, mis on nende põhjuseks. Praegu kasutatakse seda mudelit *Atp7b* valgu funktsiooniga seotud vase homöostaasi uurimiseks (Przybyłowski et al., 2013, Reed et al., 2018).

*Atp7b*<sup>-/-</sup> mudel loodi geneetiliselt, sisestades *Atp7b* geeni teise eksonisse terminatsioonikoodonid, mis takistavad täielikult *Atp7b* valgu sünteesi kogu kehas. Hiired sündisid vasepuudusega ja kui neid toitis sama mutatsiooniga ema, tekkisid neuroloogilised kõrvalekalded. Neuroloogiliste sümptomitega pojad surid kaks nädalat pärast sündi. Terve ema toitmisel tõusis vase tase loomade maksas kuue kuu jooksul kriitilise piirini. Teistes elundites (aju, neerud, silmad) kogunes vask aeglasemalt, mis on arvatavasti seotud teise P-tüüpi ATPaasi *Atp7a* kompensatoorse funktsiooniga (Buiakova et al., 1999, Lutsenko, 2008).

Praegu kasutatakse *Atp7b*<sup>-/-</sup> mudelit maksapatoloogiate ja WT arengu täiendavate mehhanismide uurimiseks.

Lisaks ülaltoodud mudelitele loodi hiljuti veel üks oluline mudel - *Atp7b*<sup>ΔHep</sup>. Selle liini eripära seisneb selles, et *Atp7b* valk inaktiveeriti ainult hepatotsüütides, mis viib vase akumulatsioonile maksas, kõrgele vase tasemele uriinis ja madalale CP kontsentratsioonile vereplasmas. Kuigi fenotüüp on sarnane *Atp7b*<sup>-/-</sup>-ga (kõrge Cu tase maksas ja uriinis ja madal CP tase vere plasmas), ei esine *Atp7b*<sup>ΔHep</sup>-il ägedat maksahaigust, nagu *Atp7b*<sup>-/-</sup> puhul. Samuti oli MT-de tase oluliselt kõrgem kui *Atp7b*<sup>-/-</sup> puhul (Muchenditsi et al., 2017).

*Atp7b*<sup>ΔHep</sup> hiirte hepatotsüütides oli vase homöostaas häiritud, lisaks täheldati hepatotsüütide lipiidide ja nukleiinhapete regulatsiooni häireid (Muchenditsi et al., 2021). Selle taustal tekkis hiirtel umbes 45 nädala pärast maksa steatoos. Hetkel ei ole teada, mis täpselt põhjustab kliiniliste piltide erinevusi *Atp7b*<sup>-/-</sup> ja *Atp7b*<sup>ΔHep</sup> vahel. Mehhanismide üksikasjalikumaks kirjeldamiseks on selles valdkonnas vaja teha täiendavaid uuringuid (Muchenditsi et al., 2017).

## 1.5. Väike vase transporter, SCC

Üks WT markeritest on vase sisalduse tõus uriinis. Selle fenomeni täpne mehhanism on aga ebaselge. *Atp7b*<sup>-/-</sup> hiire uriini uuringud näitasid, et vask ei ole vabas vormis, vaid pigem seotud ~2 kDa peptiidiga, mida nimetati väikeseks vase transporteriks (SCC) (Gray et al., 2012). Samuti näidati, et SCC konkureerib vaba vase sidumise eest CTR1-ga. Sellised leiud viitavad lisaks peamisele, ATP7B kaudu toimuvale mehhanismile, veel täiendava mehhanismi olemasolule vase eemaldamiseks kehast (Gray et al., 2012). Samuti on näidatud, et SCC esineb ka normaalses vase homöostaasis, kuid väikestes kontsentratsioonides. Vase kontsentratsiooni suurenemisega rakkudes suureneb SCC sekretsioon uriiniga. Kõik need leiud viitavad vase homöostaasi keerukamale reguleerimisele kehas (Gioilli et al., 2022). SCC edasised uuringud aitavad täiendavalt mõista vase homöostaasi ning annavad rohkem selgitusi WT mehhanismide kohta.

## 2. Töö eesmärgid

Käesoleva töö eesmärgiks oli SCC tuvastamine *Atp7b<sup>+/+</sup>*, *Atp7b<sup>ΔHep</sup>*, *Atp7b<sup>-/-</sup>* hiire uriini proovides ning selle peptiidi täiendav iseloomustamine SEC, LC-ICP MS ja MALDI MS meetoditega.

## 3. Materjalid ja meetodid

### 3.1. Materjalid

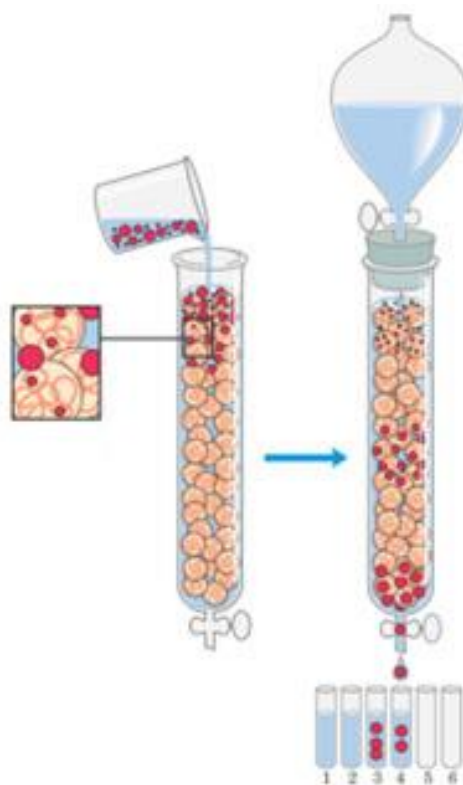
*Atp7b<sup>+/+</sup>*, *Atp7b<sup>ΔHep</sup>*, *Atp7b<sup>-/-</sup>* hiirte uriini proovid saadi Ameerika Ühendriikidest Johns Hopkinsi Ülikoolist. Proovid olid kogutud dr. Ekaterina Kabini poolt kasutades metaboolseid puure (Giral et al., 2022). Kõik uriiniproovid tsentrifugeeriti 30 minutit 21000 rpm-ga, et eemaldada uriinist tahked osakesed, rakud ja suuremad valkude agregaadid. Seejärel jagati proovid puhtadesse Eppendorfi tuubidesse 130 µl kaupa. Proovide pikaajaliseks säilitamiseks hoiti neid -80°C juures. Käesolevas töös kasutatud kemikaalid: α-tsüano-4-hüdrosükaneelhape (Sigma, C2020-25G), ammooniumatsetaadi pulber (Sharlau, AM0254), Milli Q vesi (TKA LabTower TII (UV)), lämmastikhape (Fisher, A509-P1), insuliin (Sigma, I2643-50MG), vitamiin B-12 (Sigma, V2876), sünteetiline IPF valk (Niedersächsisches Institut für Peptid-Forschung GmbH), L-trüptofaan (Fluka, T0254-1G).

### 3.2. Meetodid

#### 3.2.1. Valkude uurimine eksklusioonikromatograafia abil

Eksklusioonikromatograafia (SEC) on üks tuntumaid kromatograafilisi meetodeid, mida kasutatakse laialdaselt proovis sisalduvate molekulide lahutamiseks nende suuruse alusel. Kolonn on täidetud inertse, poorse materjaliga (statsionaarne faas), millest juhatakse läbi proovist ja lahustist koosnev vedel segu (liikuv faas/eluent) (joonis 3). Proovis sisalduvad molekulid liiguvad koos eluendiga kolonnis gravitatsiooni või pumba abil. Suuremad molekulid läbivad kolonni poorsete materjalide vahelt ja väljuvad kolonnist esimesena, väiksemad aga tungivad pooridesse, suurendades seeläbi kolonnis veedetud aega ja väljuvad hiljem (joonis 3).

Seda analüüsimeetodit saab kasutada kolonnist väljuvate molekulide ligikaudse molekulmassi määramiseks, samuti proovi kohta põhjalikuma teabe saamiseks, sidudes SEC-i teiste analüüsimeetoditega (Striegel, 2022).



**Joonis 3. SEC meetodi põhimõtte.** Osakesed (punased) eraldatakse nende suuruse alusel. Kohandatud allikast (Wolf, 2015).

#### **SEC tingimused:**

Uuritavate proovide fraktsioneerimiseks kasutati Superdex peptide HR 10/300 SEC kolonni, mille statsionaarseks faasiks oli dekstraan. Kolonni läbimõõt oli 10 mm ja kõrgus 300 mm, maksimaalne maht on 24 ml ja maksimaalne võimalik rõhk 1,5 MPa. See kolonn sobib molekulide eraldamiseks massivahemikus 100 kuni 7000 Da. Kolonn oli ühendatud Äkta Explorer 100 vedelikkromatograafia seadmega koos Frac-950 fraktsioonide kollektoriga. Aparaat koosnes pumbast (P-900) ning UV/VIS detectorist (UV-900). Valkude tuvastamiseks valiti lainepikkuseks 280 nm ning vase tuvastamiseks 610 nm.

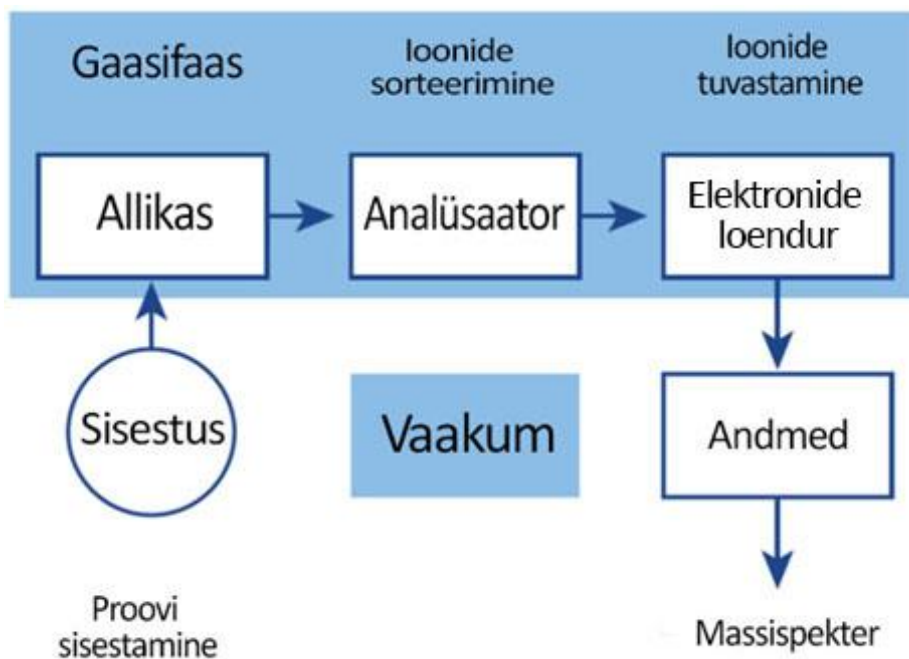
Puhvrina kasutati 50 mM ammoonium atsetaati, pH 7.4. Voolukiiruseks valiti 0.4 ml/min. Selleks et tuvastada täpselt vase sisaldavate fraktsioonide väljumisaja ühendati hiljem sama kolonn LC-ICP MS apparaadi külge kus maksimaalne lubatud kiirus on 0.4 ml/min. Proovide süstimis ruumala oli 100 µl. Enne proovide süstimist sulatati need jääl. Ennem uue katse tegemist süstiti 100 µl mQ, et kontrollida kolonni puhtust. Eluaat koguti 96-süvendiga plaatidesse 250 µl fraktsioonide kaupa. Kõik plaadid hoiti jää peal ning pikaajaliseks säilitamiseks hoiti neid -80°C juures. Andmete visualiseerimiseks kasutati OriginPro 8.5 programm (OriginLab).

Saadud fraktsioone analüüsiti MALDI-TOF MS meetodiga.

### 3.2.2. Massispektrometria

Massispektrometria on analüüsimeetod, mis põhineb molekulide või osakeste eraldamisel nende massi ( $m$ ) ja laengu ( $z$ ) suhe alusel. Analüüsi käigus tuleb proov ioniseerida, et molekulid saaksid laengu. Sel eesmärgil on massispektrometrias mitmeid ioniseerimismeetodeid, mis toodavad erinevat tüüpi ioone ja annavad vastavalt erinevat tüüpi tulemusi. Ioniseerivate seadmete õigeks valimiseks on vajalik teada selle tööpõhimõtet, huvipakkuva katse läbiviimise tingimusi ning nõutavaid katsetulemusi (Haag, 2016). Ioniseerimise käigus genereeritakse ioonide voog, mis saadetakse massianalüsaatorisse. Peamiselt on kasutusel kvadrupool, lennuaja- (TOF) ja magnetmassianalüsaatorid. Kvadrupool massianalüsaator eraldab ioonid teatud  $m/z$  vahemikus ülejäänudioonivoost. Lennuaja massianalüsaator eraldab osakesed nende lennuaja alusel, mis omakorda sõltub nende  $m/z$  suhtest.

Magnetmassianalüsaator eraldab osakesed nende lennutrajektoori muutuste põhjal magnetväljas sõltuvalt nende  $m/z$  suhtest (Miller & Denton, 1986). Kombineerides ionisatsioonimeetodeid ja massianalüsaatoreid, on võimalik saada ainulaadseid eksperimendi nõuetele vastavaid instrumente. Pärastioonivoo läbimist massianalüsaatorist jõuavad ioonid detektorisse, mis võtab vastu ja võimendab ionsignaali. Arvuti interpreteerib signaale massispektrisse, mis näitab signaali intensiivsuse sõltuvust selle  $m/z$  suhtest (joonis 4).



**Joonis 4.** Massispektrometria põhimõte. Kohandatud allikast (Vandenbroucke, 2017).

Massispektrometria peamine kasutusala on ühendite molekulmassi leidmine. Esialgu oli meetod kasutusel ainult lihtsate keemiliste ühendite analüüsiks, kuid peale elektropihustusionisatsiooni (ESI) ja maatriksseotud laserdesorptsiooni/ionisatsiooni (MALDI) meetodi väljatöötamist sai võimalikuks analüüsida ka suuremaid molekule, nagu valke (Fenn et al., 1989). Massispektrometria abil võib samuti hinnata kvalitatiivselt kindla iooni olemasolu ja tuvastada ühendeid.

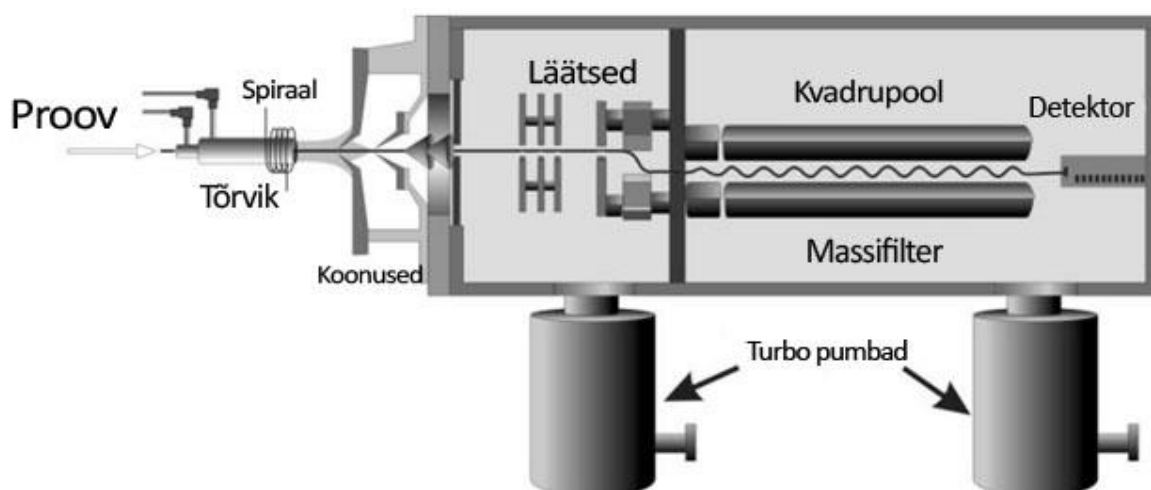


Sõltuvalt massispektromeetria meetodist, on vaja proove eelnevalt töödelda, näiteks lahutada SEC kolonnis. Mõned mass spektromeetrid lubavad ühendada vedelik- (LC) või gaaskromatograafia (GC) seadet täiendavate uurimistulemuste saamiseks (Schmitz, 2016).

### 3.2.2.1. ICP-MS

Induktiivsidestatud plasma (ICP) on üks ioniseerimismeetodeid massispektromeetrias, kus ionisatsiooni allikana kasutatakse kõrge temperatuurini elektriliselt kuumutatud gaasi, mis võimaldab saavutada plasmaoleku. ICP-MS kasutatakse perioodilisuse tabeli elementide uurimiseks väga madalates kontsentratsioonides, sest meetod on ülitundlik ja täpne. Plasma on elektriliselt laetud, ning võimaldab elektrone üle kanda. Samuti osaleb ta molekulide ioniseerimisel ning iooni transportimisel massianalüsaatorisse. Tavaliselt kasutatakse gaasina argooni, mis tagab plasma stabiilse oleku ning olles inertne, ei interakteeru analüüdi molekulidega (Wilschefski & Baxter, 2019).

Tavaline ICP-MS süsteem koosneb proovide sisestamise seadmest, plasma piirkonnast, koonuste vahelisest ruumist, ionioptikast, massianalüsaatorist ja detektorist (joonis 5). Proovi sisestamiseks kasutatakse nebulisaatorit, mis pihustab vedeliku proovi gaasikambri, tekitades aerosooli. Gaasikambrit nimetatakse "tõrvik", mis on kvartsist valmistatud kolmik-toru, mille sees voolab gaas ning ühest otsast on kinnitatud elektrivooluga spiraal, mis soojendab gaasi plasma olekusse. Argooni plasma ioniseerib ja lagundab analüüdi molekulid aatomiteks. Ionisatsiooniprotsessi käigus aurustub kõigepealt molekuli ümbrisev vedelik, jättes järele aurustunud analüüdi molekulid, seejärel dissotsieerub molekul aatomiteks, mis seejärel ioniseeritakse, tekitades seeläbi laetud osakeste voo. Peale ioniseerimist liigub osakeste voog läbi ruumi, mis koosneb kahest koonusest. Koonused eraldavad plasmast massianalüsaatorist. Enne massianalüsaatori sattumist läbib ioonivoog elektrilisi läätsi, mis eraldavad ioniseeritud osakesed neutraalsetest ja fokuseerivad ioonivoo massianalüsaatorisse. Massianalüsaatorina kasutatakse tavaliselt kvadrupooli, mis eraldab ioone nende  $m/z$  suhe alusel. Eraldanud ioonid sattuvad detektorisse, kus signaal muudetakse digitaalseks (Wilschefski & Baxter, 2019).



Joonis 5. ICP-MS töö põhimõtte skeem. Kohandatud allikast (Košler & Sylvester, 2003).

ICP-MS analüüsiks kasutatakse vedelaid proove, mis võimaldab proovide pidevat süstimist ja täieliku atomiseerimist. Selle omaduse tõttu on võimalik ICP-MS-i ühendada kromatograafiliste tehnikatega (nt LC või GC) (Sutton & Caruso, 1999).

Tänapäeval kasutatakse ICP-MS-i üleminekurea metallide uurimiseks, toksikoloogia uuringuteks, proteoomika katseteks, ning proovide koostise uurimiseks; (Calderón-Celis & Encinar, 2019, (Jaishankar et al., 2014, Laur et al., 2020).

### 3.2.2.2. LC-ICP MS proovidest

Selleks, et tuvastada vaske sisaldavad fraktsioonid kasutati käesolevas töös Agilent Technologies 7800-seeria ICP-MS (joonis 6), mis oli ühendatud Agilent Technologies Infinity LC aparaadiga, mis koosnes 1260-seeria  $\mu$ -degasaatorist, 1200-seeria kapillaarpumbast, Micro WPS autosamplerist ja 1200-seeria MWD VL detektorist. Metallide eemaldamiseks puhvril kasutati Chelex eelkolonni. Peptiidide lahutamiseks kasutati Superdex HR 10/300 SEC kolonni.



**Joonis 6.** Agilent Technologies 7800-seeria ICP-MS. Allikas: (Mccurdy et al., 2015).

ICP-MS efektiivsuse optimeerimiseks kasutati Tune Solution-it (Agilent, 5185-5959), mis sisaldas Ce, Co, Li, Mg, Ti ja Y ioone. Gaasina kasutati argooni. Enne analüüsi proovid sulatati jääl. LC detektori lainepikkus oli 280 nm ja ICP-MS-ga jälgitud isotoop oli  $^{63}\text{Cu}$ . Voolukiirus oli 0.4 ml/min. Proovide ruumala oli 40  $\mu\text{l}$ . Puhvrina kasutati 150 mM ammooniumatsetaati, pH 7.4.

ICP-MS eadme juhtimiseks kasutati programmi MassHunter (Agilent) ning HPLC süsteemi juhtimiseks kasutati Chemstation (Agilent). Andmete visualiseerimiseks kasutati programmi OriginPRO 8.5 (OriginLab).

### 3.2.2.3. MALDI MS

MALDI MS on massispektromeetria analüüsimeetod, kus proovi ioniseerimiseks kasutatakse laserit. MALDI MS jaoks proov segatakse maatriksiga ja kantakse spetsiaalsele plaadile, kus proovis moodustuvad kristallid analüüdi molekulide ümber. MALDI on pehme ionisatsiooni meetod, mis ei purusta molekuli struktuuri. Maatriksi valik on oluline hea analüüsi läbiviimiseks. Maatriksid on tavaliselt orgaanilised happed ja need osalevad prootoni doonoritena ioniseerimise käigus. Maatriksi valik sõltub analüüdi molekuli tüübist ning uuringute läbiviimise tingimustest. Enamkasutatavad on sinapiinhape,  $\alpha$ -tsüano-4-hüdrosükaneelhape ja 2,5-dihüdrosübensoehape (DHB). Need maatriksid sobivad hästi valkude analüüsiks (Beavis et al., 1992, Beavis et al., 1989, Strupat et al., 1991).

Ioniseerimiseks kiiritatakse maatriksiga seotud analüüdi proove laseriga, purustades maatriksi kristallstruktuuri fragmentideks ja samaaegselt ioniseerides analüüdi molekule. Ioniseeritud analüüdi ioonid suunatakse massianalüsaatorisse, kus need eraldatakse m/z suhe järgi. Massianalüsaatorina kasutatakse sageli TOF-i (Knochenmuss, 2006).

MALDI-TOF MS kasutatakse väga laialdaselt valkude massianalüüsis, mikrobioloogilises analüüsis (Singhal et al., 2015) ja kliinilises analüüsis (Tsuchida et al., 2020).

Käesolevas töös kasutati Bruker Microflex<sup>®</sup> aparati N<sub>2</sub> laseri lainepikkusega 337 nm ja TOF massianalüsaatoriga, mis suudab detekteerida ioone massivahemikus 0 kuni 500'000 Da. Analüüsiks kasutati 96 täpiga microscout Bruker plaati. Maatriksina kasutati  $\alpha$ -tsüano-4-hüdrosükaneelhapet, mis oli segatud 0,3% trifluoroäädikhappe (TFA) (Fischer, 10294110) ja 60% atsetonitriili (AcN) (Sigma, 34851-2,5L) lahusega lõppkontsentratsiooniga 10 mg/ml.

#### **3.2.2.4. MALDI MS vaske sisaldavatest fraktsioonidest**

Selleks, et tuvastada madalamolekulaarse vase kandjat, teostati igast LC vaske sisaldavast fraktsioonist MALDI analüüs. Selleks võeti igast fraktsioonist 1  $\mu$ l ja segati 3  $\mu$ l maatriksiga. Plaadile kanti 2 paralleeli segu (igaüks 1  $\mu$ l) ja oodati, kuni maatriks kristalliseerus. Laseri intensiivsuse ja mõõtmisparameetrite juhtimiseks kasutati programmi FlexControl (Bruker Daltonics). Mõlemat paralleeli kiiritati laseriga 30% intensiivsusega vähemalt 5 korda, summeerides kõik saadud spektrid. Massivahemik valiti 400-7040 Da ning analüüsiti teostati lineaarses režiimis.

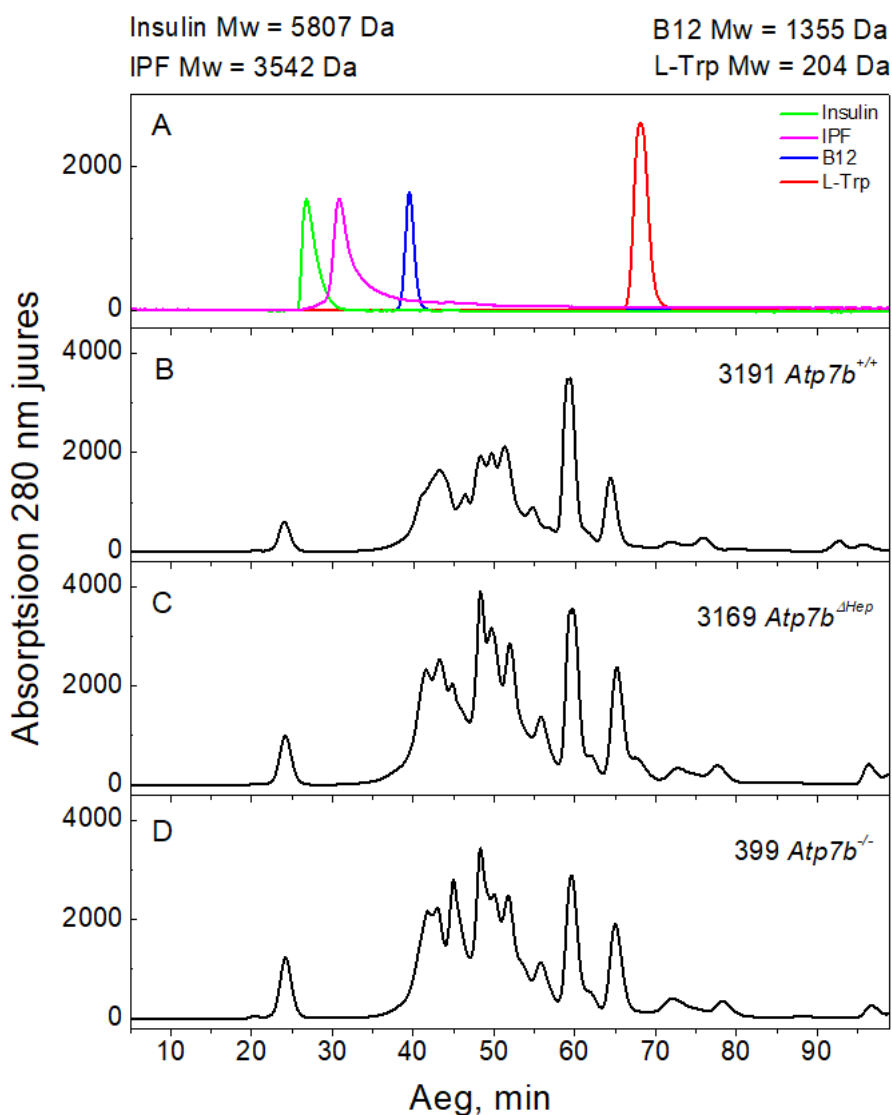
Saadud tulemuste analüüsimiseks kasutati FlexAnalysis programmi (Bruker Daltonics). Andmete visualiseerimiseks kasutati programmi OriginPRO 8.5 (OriginLab).

## 4. Tulemused

### 4.1. SEC

SEC-meetodiga fraktsioneerimiseks valiti erineva genotüübiga 3 isashiirte uriini proovid (*Atp7b*<sup>+/+</sup>, *Atp7b*<sup>ΔHep</sup> ja *Atp7b*<sup>-/-</sup> liinid). Peptiidide ligikaudse molekulmassi hindamiseks mõõdeti ka 4 teadaoleva molekulmassiga standardit. Saadud kromatogramm on toodud joonisel 7A.

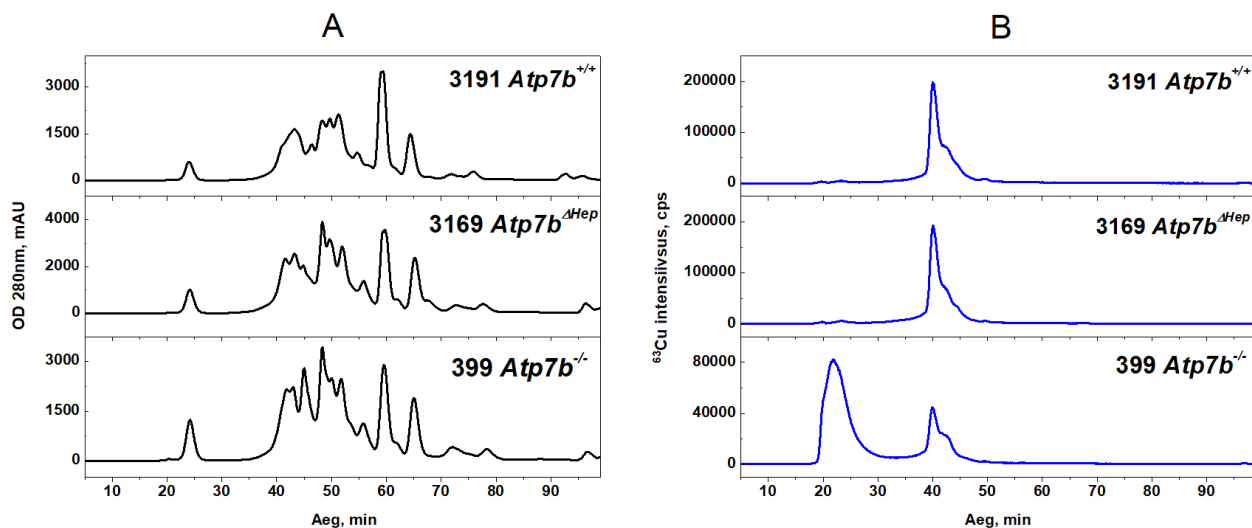
Uriini proovide suurem osa peptiididest elueeritakse retensiooni aegade 37 - 68 minutit vahel. Kõigis proovides esines ka suure molekulmassiga peptiidide piik retensiooni ajaga 22.5 - 26 minutit vahel (joonis 7B-D).



**Joonis 7. Kromatogramm SEC katsest. (A)** Kolonni kalibreerimine standartitega. Standardid: insuliin (roheline), IPF (lilla), B12 (sinine), L-Trüptofaan (punane) **(B)** *Atp7b*<sup>+/+</sup> hiire uriini proov **(C)** *Atp7b*<sup>ΔHep</sup> hiire uriini proov **(D)** *Atp7b*<sup>-/-</sup> hiire uriini proov. SEC tingimused: Superdex Peptide HR 10/300 kolonn, voolukiirus 0.4 ml/min, 50 mM ammooniumatsetaadi puhver, pH 7.4.

### 4.2. LC-ICP MS

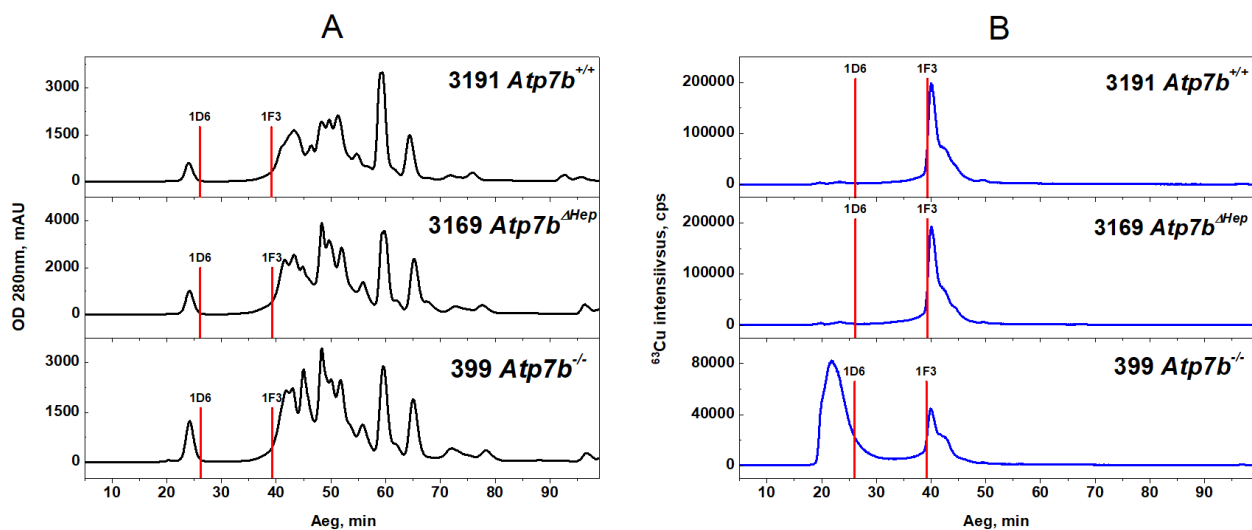
Vaske sisaldava aine retensiooni aja määramiseks viidi läbi LC-ICP MS katse. Proovides *Atp7b*<sup>+/+</sup> ja *Atp7b*<sup>ΔHep</sup> oli vase piik retensiooniajaga piirkonnas 38 - 46 minutit. Lisaks sellele piigile, *Atp7b*<sup>-/-</sup> proovis, esines piik retensiooniajaga 19 - 29 minutit (joonised 8A ja 8B). Edasiseks MALDI katseteks valiti fraktsioone, mille retensiooniaeg oli vahemikus 38 - 46 minutit ja lisafraktsioone retensiooniajaga 19 - 29 minutit *Atp7b*<sup>-/-</sup> proovis.



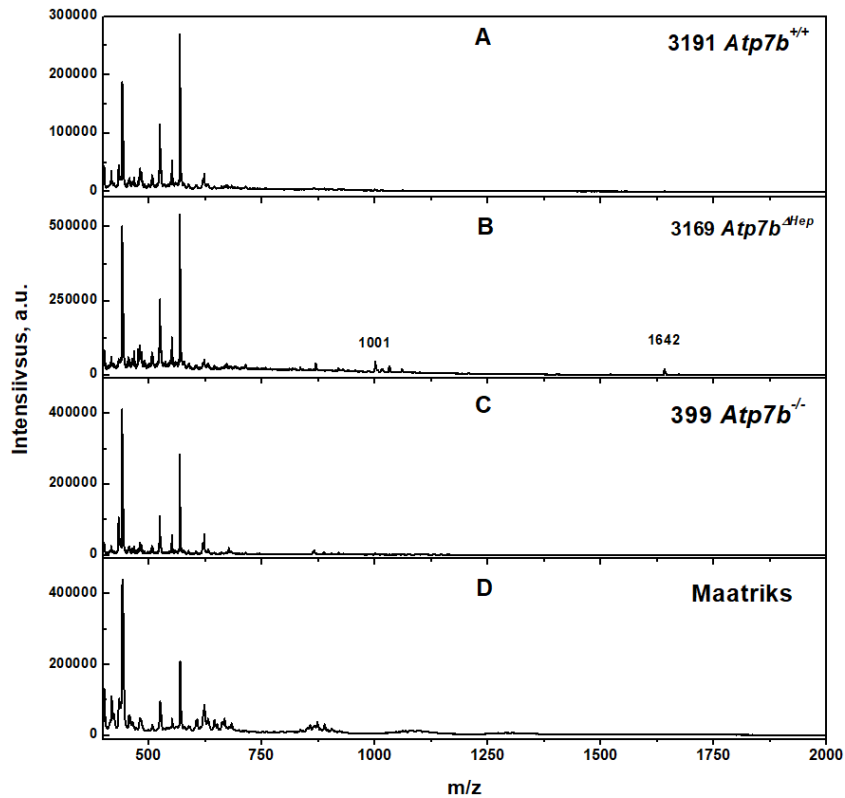
**Joonis 8. Vaske sisaldava aine retensiooniaja määramine LC-ICP MS meetodi abil. (A)** SEC. SEC tingimused: Superdex Peptide HR 10/300 kolonn, voolukiirus 0.4 ml/min, 50 mM ammoniumatsetaadi puhver, pH 7.4. **(B)** LC-ICP MS. ICP tingimused: voolukiirus 0.4 ml/min, detekteeritud <sup>63</sup>Cu isotoop, 150 mM ammonium atsetaadi puhver, pH 7.4.

### 4.3. MALDI MS

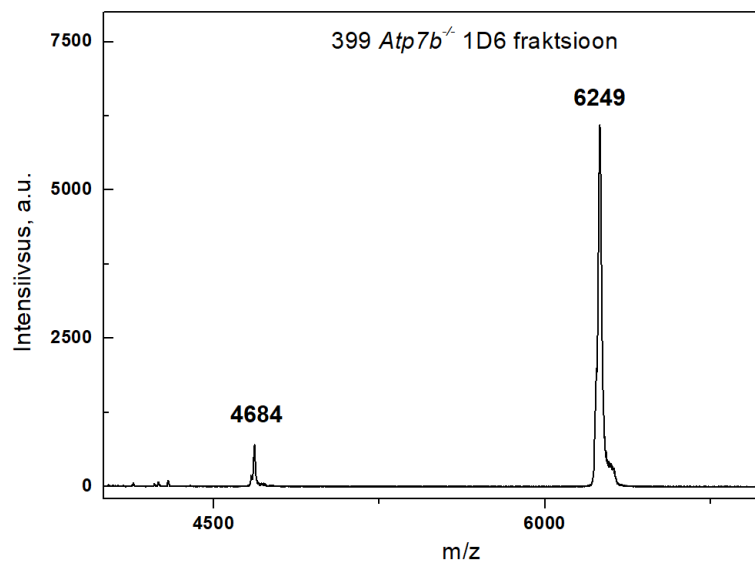
Vaske siduva peptiidi molekulmassi määramiseks teostati MALDI MS mõõtmisi kahe peamise fraktsiooniga - 1D6 ja 1F3 (joonis 9), mis vastavad piigile retensiooniajaga vastavalt 26 ja 39 min. *Atp7b*<sup>ΔHep</sup> proovis fraktsioonis 1F3 (joonis 10B) esinesid piigid m/z suhtega 1642 ja 1001. Fraktsioon 1D6 sisaldas suurema molekulmassiga piiki m/z suhtega 4684 ja 6249 (joonis 11).



**Joonis 9. 1F3 ja 1D6 fraktsioonide asukoht SEC ja LC-ICP MS kromatogrammidel. (A)** SEC. SEC tingimused: Superdex Peptide HR 10/300 kolonn, voolukiirus 0.4 ml/min, 50 mM ammooniumatsetaadi puhver, pH 7.4. **(B)** LC-ICP MS. ICP tingimused: voolukiirus 0.4 ml/min, detekteeritud  $^{63}\text{Cu}$  isotoop, 150 mM ammoonium atsetaadi puhver, pH 7.4.



**Joonis 10. MALDI MS massispekter. (A)** *Atp7b*<sup>+/+</sup> hiire uriini proovi 1F3 fraktsioon **(B)** *Atp7b*<sup>Alep</sup> hiire uriini proovi 1F3 fraktsioon **(C)** *Atp7b*<sup>-/-</sup> hiire uriini proovi 1F3 fraktsioon **(D)** maatriks. MALDI MS tingimused: maatriks 10 mg/ml  $\alpha$ -tsüano-4-hüdrosükaneelhapet, laseri intensiivsus 30%, massivahemik 400-7040 Da.



**Joonis 11. 1D6 fraktsiooni MALDI MS spekter *Atp7b*<sup>-/-</sup> proovist.** MALDI MS tingimused: maatriks 10 mg/ml  $\alpha$ -tsüano-4-hüdrosükaneelhapet, laseri intensiivsus 30%, massivahemik 400-7040 Da.

## 5. Arutelu

Wilsoni tõbi (WT) on autosoomne retsessiivne haigus, mis on seotud *ATP7B* geeni mutatsioonidega, mis põhjustavad kodeeritava valgu talitlushäireid. ATP7B valk on vase homöostaasi oluline tagaja. Suurem osa sellest valgust leidub hepatotsüütides, kus ta eemaldab vaske kehast sapi kaudu ning metalleerib tseruloplasmiini (CP) vasega, mis omakorda vabaneb verre ja transpordib vaske teistesse kudedesse. ATP7B düsfunktsiooni korral koguneb vask maksarakkudesse, põhjustades maksapõletikku. Samuti laguneb mittemetalleeritud apo-CP, mis põhjustab selle madala sisalduse veres. See on üks olulisemaid tunnuseid haiguse diagnoosimisel. Samuti leiti WT patsientidel suurenenud vase sisaldus uriinis, mida tervetel inimestel ei täheldatud. Kuigi WT põhimehhanismi on hästi uuritud, jääb ebaselgeks, miks eritub patsientidel uriiniga rohkem vaske kui tervetel inimestel. Eelnevate uuringute käigus leiti, et vask esineb hiirte uriini proovides kompleksis madalmolekulaarse peptiidiga, mida nimetati "väikseks vase kandjaks" (SCC) (Gray et al., 2012). Teised uuringud on näidanud, et SCC esineb väikestes kogustes ka tervete inimeste veres, ning et SCC sünteesi indutseeritakse vastusena suurenenud vase kontsentratsioonile (Gioilli et al., 2022). Need avastused viitavad võimaliku täiendava raja olemasolule vase homöostaasi reguleerimisel.

Käesolevas töös teostati mõõtmisi kolme erineva genotüübiga hiire uriiniproovidega: *Atp7b<sup>+/+</sup>*, mis ei sisalda mutatsiooni *Atp7b* geenis ja säilitab normaalse vase homöostaasi; *Atp7b<sup>ΔHep</sup>*, milles *Atp7b* valk eemaldati täielikult ainult hepatotsüütides ja *Atp7b<sup>-/-</sup>* - *Atp7b* valgu täielik eemaldamine kogu organismis. Tundmatu vaske siduva peptiidi iseloomustamiseks kasutati SEC, LC-ICP MS ja MALDI MS meetodeid.

Varasemad uuringud on näidanud, et SCC osaleb ka normaalses vase ainevahetuses, kuid selle tase uriinis on väga madal. Selles töös *Atp7b<sup>+/+</sup>* hiire uriini proovide mõõtmisel MALDI MS meetodiga ei tuvastatud peptiide, mis on suuremad kui 1 kDa. Ühest küljest kinnitab see osaliselt tõsiasja, et SCC kontsentratsioon tervetel hiirtel on väike, teisest küljest viitab piigi puudumine sellele, et MALDI MS meetod ei suuda tuvastada selle esinemist madalatel kontsentratsioonidel või sellele, et peptiidi tegelik molekulmass on madalam kui 1 kDa. *Atp7b<sup>ΔHep</sup>* hiire uriini proovi mõõtmised tuvastati kaks piiki *m/z* suhtega 1001 ja 1642, mis on SCC-le oletatud massivahemikus. Võib oletada, et üks neist võib olla SCC molekulmass. *Atp7b<sup>-/-</sup>* hiire uriini proovi LC-ICP MS tulemus näitasid suurema molekulmassiga vaskesisaldava piigi esinemist retentsioonijaga 19 - 29 minutit. Vastavate fraktsioonide mõõtmisel MALDI MS meetodiga tuvastati kaks suure molekulmassiga piiki *m/z* suhtega 4684 ja 6249. Selline molekulmass on kõrgem kui kirjanduses väljapakutud mass SCC jaoks, millest võib oletada, et proovis sisaldub teine vask seov valk, mis moodustab vasega komplekse vastuseks vaba vase kontsentratsiooni suurenemisele rakus.

Edasised uuringud on vajalikud selleks, et iseloomustada leitud peptiide, näiteks kasutades ESI-MS meetodit. Samuti tuleb läbi viia katseid teiste hiirte uute uriiniproovidega kasutades samu meetodeid, et kontrollida, kas nendel esinevad samad piigid samades fraktsioonides, või mitte. Samuti tuleb kontrollida kas on erinevusi isas- ja emashiirte uriiniproovide vahel. Lisaks veel võib kontrollida, kas leiduvad samad piigid inimese uriini proovides.



## Kokkuvõte

Wilsoni tõbi on autosoomne retsessiivne haigus, mis on seotud *ATP7B* geeni mutatsioonidega, mis põhjustab P-tüüpi ATPaasi ATP7B düsfunktsiooni.

ATP7B valk on üks peamisi osalejaid rangelt reguleeritud vase metabolismis. Selle funktsioonide rikkumine põhjustab kogu vase metabolismi häireid ja see hakkab kogunema organismi. Kuid patsientidel esineb ka suurenenud vase sisaldus uriinis, mis tähendab, et väike osa vases eritub kehast. Avastati, et uriinis leiduv vask ei esine vabas vormis, vaid on seotud väikese molekulmassiga molekuliga, mida nimetati väikeseks vase kandjaks (SCC). Nende leidude põhjal eeldatakse, et vase metabolismi reguleerimisel esineb ka täiendav rada. Täiendavad uuringud selles valdkonnas aitavad laiendada teadmisi Wilsoni tõve tekkemehhanismi ning vase homöostaasi kohta.

Käesoleva töö eesmärk oli leida SCC molekul Wilsoni tõve mudelhiirte uriini proovidest ning see iseloomustada. Katsed viidi läbi uriini proovidega, mis oli saadud kolmest erinevat tüüpi hiire mudelist: *Atp7b<sup>+/+</sup>*, *Atp7b<sup>ΔHep</sup>* ja *Atp7b<sup>-/-</sup>*. SCC iseloomustamise katsed viidi läbi kolme erineva meetodiga: SEC, LC-ICP MS ja MALDI MS.

Katsete tulemustest märgati, et *Atp7b<sup>-/-</sup>* hiire uriini proovis esines vask kompleksis suurema molekulmassiga peptiididega, mille m/z väärtused olid 4684 ja 6249. *Atp7b<sup>ΔHep</sup>* hiire uriini proovis, leiti vask kompleksis madalmolekulaarsete peptiididega, mille m/z väärtused olid 1001 ja 1642. *Atp7b<sup>+/+</sup>* hiirtel sarnaseid peptiide ei leitud, mis võib viidata sellele, et see SCC esineb ainult *Atp7b<sup>ΔHep</sup>* ja *Atp7b<sup>-/-</sup>* mudelhiirtel.

Täiendavateks uuringuteks on vajalik mõõta teiste hiirte uriini proove samade meetoditega, et mõista, kas nendel hiirtel on samades fraktsioonides samad piigid ning kas need on ainulaadsed isahiirtele või esinevad need ka emahiirtel. Samuti tuleb teha katseid ESI-MS meetodiga.

## Abstract

Wilson's disease is an autosomal recessive disorder caused by different mutations in the *ATP7B* gene which results in dysfunction of the P-type ATPase ATP7B.

The ATP7B protein is one of the main players in the strictly regulated copper metabolism. Violations of its functions cause disturbances in the entire copper metabolism, and it begins to accumulate in the body. Moreover, Wilson's disease patients have also increased levels of copper in their urine, which means that a small amount of copper is excreted from the body. It was discovered that copper in urine does not exist in free form but is bound to a low molecular weight molecule called the small copper carrier (SCC). Based on these findings, an additional pathway is hypothesized to regulate copper metabolism. Further research in this area will help to expand understanding of the mechanism of Wilson's disease pathology and copper homeostasis.

The current work aimed to find the SCC molecule in the urine samples of Wilson's disease model mice and to characterize it. Experiments were performed with urine samples obtained from three different types of mouse models: *Atp7b*<sup>+/+</sup>, *Atp7b* <sup>$\Delta$ Hep</sup> and *Atp7b*<sup>-/-</sup>. SCC characterization experiments were performed using three different methods: SEC, LC-ICP MS and MALDI MS.

From the results of the experiments, it was noticed that in the urine sample of the *Atp7b*<sup>-/-</sup> mouse, copper was present in a complex with higher molecular weight peptides with m/z values of 4684 and 6249. In the urine sample of *Atp7b* <sup>$\Delta$ Hep</sup> mice, copper was found in a complex with low molecular weight peptides with m/z values of 1001 and 1642. These peptides were not found in *Atp7b*<sup>+/+</sup> mice, which may indicate that this SCC is present only in *Atp7b* <sup>$\Delta$ Hep</sup> and *Atp7b*<sup>-/-</sup> mice.

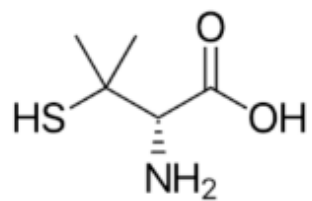
Further studies will require measuring urine samples from other mice using the same methods to understand whether these mice have the same peaks in the same fractions and whether they are unique to male mice or occur in female mice as well. Experiments with the ESI-MS method should also be performed.

## Tänuavaldused

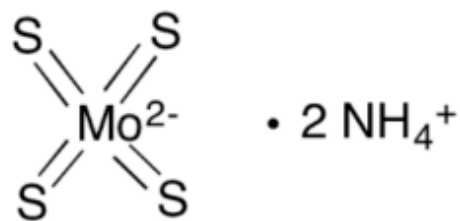
Tänan professor Peep Palumaad uurimistöö tegemise võimaluse andmise, töö käigus nõustamise ja grammatiliste vigade parandamise eest. Tänan oma juhendajaid Julia Smirnovat ja Ekaterina Kabinin teatud töö eest, abi eest tööriistadega, samuti abi eest töö kirjutamisel. Tänan kaasprofessor Vello Tõugut minu töös esinevate grammatiliste vigade parandamise ja heade märkuste eest. Tahaksin avaldada tänu kõigile teistele metalloproteoomika labori liikmetele nende valmisoleku eest aidata igas olukorras ja anda nõu.

Eriline tänu pereliikmetele ja sõpradele, kes mu muresid kuulasid, töö kirjutamisel toetasid ja motiveerisid. Tänan oma abikaasa, kes toetas mind kogu kirjutamisprotsessi vältel.

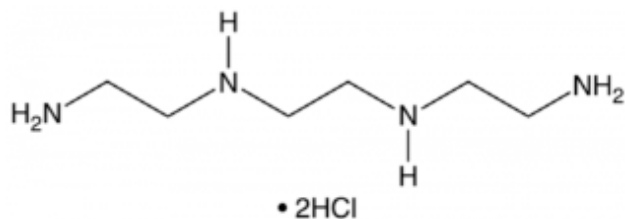
## Lisad



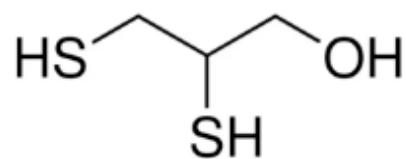
D-penitsillamiin



Ammooniumtetratiomolübdaat



Trietüleentetramiindivesinikkloriid



Dimerkaptopropanool

**Lisa 1.** Kelaatorite struktuuri joonised. Kohandatud allikast .

## Kasutatud kirjandus

- Aggarwal, A., & Bhatt, M. (2014). The Pragmatic Treatment of Wilson's Disease. *Movement Disorders Clinical Practice*, 1(1), 14–23. <https://doi.org/10.1002/mdc3.12003>
- Aggarwal, A., & Bhatt, M. (2018). Advances in treatment of Wilson disease. *Tremor and Other Hyperkinetic Movements*, 8, 1–13. <https://doi.org/10.7916/D841881D>
- Ala, A., Walker, A. P., Ashkan, K., Dooley, J. S., & Schilsky, M. L. (2007). Wilson's disease. *Www.TheLancet.Com*, 369(9559), 397–408. <http://www>.
- Banci, L., Bertini, I., Cantini, F., Ciofi-Baffoni, S., Gonnelli, L., & Mangani, S. (2004). Solution structure of Cox11, a novel type of  $\beta$ -immunoglobulin-like fold involved in CuB site formation of cytochrome c oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 279(33), 34833–34839. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403655200>
- Beavis, R. C., Chait, B. T., & Fales, H. M. (1989). Cinnamic acid derivatives as matrices for ultraviolet laser desorption mass spectrometry of proteins. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 3(12), 432–435. <https://doi.org/10.1002/rcm.1290031207>
- Beavis, R. C., Chaudhary, T., & Chait, B. T. (1992).  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic Acid as a Matrix for Matrixassisted Laser Desorption Mass Spectrometry. *Organic Mass Spectrometry*, 27(2), 156–158.
- Brewer, G. J. (1999). Treatment of Wilson's disease with zinc. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 134(3), 322–324.
- Buiakova, O. I., Xu, J., Lutsenko, S., Zeitlin, S., Das, K., Das, S., Ross, B. M., Mekios, C., Scheinberg, I. H., & Gilliam, T. C. (1999). Null mutation of the murine ATP7B (Wilson disease) gene results in intracellular copper accumulation and late-onset hepatic nodular transformation. *Human Molecular Genetics*, 8(9), 1665–1671.
- Calderón-Celis, F., & Encinar, J. R. (2019). A reflection on the role of ICP-MS in proteomics: Update and future perspective. *Journal of Proteomics*, 198, 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.11.010>
- Chen, J., Jiang, Y., Shi, H., Peng, Y., Fan, X., & Li, C. (2020). The molecular mechanisms of copper metabolism and its roles in human diseases. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 472, 1415–1429. <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02412-2/Published>
- Cobine, P. A., Moore, S. A., & Leary, S. C. (2021). Getting out what you put in: Copper in mitochondria and its impacts on human disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1868(1). <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118867>
- Coronado, V., Nanji, M., & Cox, D. W. (2001). The Jackson toxic milk mouse as a model for copper loading. *Mammalian Genome*, 12(10), 793–795. <https://doi.org/10.1007/s00335-001-3021-y>
- Coyle, P., Philcox, J. C., Carey, L. C., & Rofe, A. M. (2002). Review Metallothionein: The multipurpose protein. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci*, 59, 627–647.
- Członkowska, A., Litwin, T., Dusek, P., Ferenci, P., Lutsenko, S., Medici, V., Rybakowski, J. K., Weiss, K. H., & Schilsky, M. L. (2018). Wilson disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(1). <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0018-3>
- De Fabregues, O., Viñas, J., Palasí, A., Quintana, M., Cardona, I., Auger, C., & Vargas, V. (2020). Ammonium tetrathiomolybdate in the decoppering phase treatment of Wilson's disease with neurological symptoms: A case series. *Brain and Behavior*, 10(5). <https://doi.org/10.1002/brb3.1596>

- Denny-Brown, D., & Porter, H. (1951). The effect of BAL (2,3-dimercaptopropanol) on hepatolenticular degeneration (Wilson's disease). *New England Journal of Medicine*, 245(24), 917–925.
- Doguer, C., Ha, J. H., & Collins, J. F. (2018). Intersection of Iron and Copper Metabolism in the Mammalian Intestine and Liver. *Comprehensive Physiology*, 8(4), 1433–1461. <https://doi.org/10.1002/cphy.c170045>
- Falcone, E., Okafor, M., Vitale, N., Raibaut, L., Sour, A., & Faller, P. (2021). Extracellular Cu<sup>2+</sup> pools and their detection: From current knowledge to next-generation probes. *Coordination Chemistry Reviews*, 433. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2020.213727>
- Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F., & Whitehouse, C. M. (1989). Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules. *New Series*, 246(4926), 64–71.
- Ferenci, P., Czlonkowska, A., Stremmel, W., Houwen, R., Rosenberg, W., Schilsky, M., Jansen, P., Moradpour, D., & Gitlin, J. (2012). EASL Clinical Practice Guidelines: Wilson's disease. *Journal of Hepatology*, 56(3), 671–685. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.11.007>
- Gaetke, L. M., & Chow, C. K. (2003). Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology*, 189(1–2), 147–163. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(03\)00159-8](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(03)00159-8)
- Gioilli, B. D., Kidane, T. Z., Fieten, H., Tellez, M., Dalphin, M., Nguyen, A., Nguyen, K., & Linder, M. C. (2022). Secretion and uptake of copper via a small copper carrier in blood fluid. *Metallomics*, 14(3). <https://doi.org/10.1093/mtomcs/mfac006>
- Giral, M., Armengol, C., & Gavaldà, A. (2022). Physiologic Effects of Housing Rats in Metabolic Cages. *Comparative Medicine*, 72(5), 298–305. <https://doi.org/10.30802/AALAS-CM-22-000026>
- Goel, S., Sahay, P., Maharana, P. K., & Titiyal, J. S. (2019). Ocular manifestations of Wilson's disease. *BMJ Case Reports*, 12(3). <https://doi.org/10.1136/bcr-2019-229662>
- Gray, L. W., Peng, F., Molloy, S. A., Pendyala, V. S., Muchenditsi, A., Muzik, O., Lee, J., Kaplan, J. H., & Lutsenko, S. (2012). Urinary copper elevation in a mouse model of Wilson's disease is a regulated process to specifically decrease the hepatic copper load. *PLoS ONE*, 7(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038327>
- Haag, A. M. (2016). Mass analyzers and mass spectrometers. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 919, pp. 157–169). Springer New York LLC. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-41448-5\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-41448-5_7)
- Hatori, Y., & Lutsenko, S. (2016). The role of copper chaperone atox1 in coupling redox homeostasis to intracellular copper distribution. *Antioxidants*, 5(3). <https://doi.org/10.3390/antiox5030025>
- Hayashi, M., Fuse, S., Endoh, D., Horiguchi, N., Nakayama, K., Kon, Y., & Okui, T. (2006). Accumulation of Copper Induces DNA Strand Breaks in Brain Cells of Long-Evans Cinnamon (LEC) Rats, An Animal Model for Human Wilson Disease. *Experimental Animals*, 55(5), 419–426.
- Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N., Mathew, B. B., & Beeregowda, K. N. (2014). Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdisciplinary Toxicology*, 7(2), 60–72. <https://doi.org/10.2478/intox-2014-0009>
- Juárez-Rebollar, D., Rios, C., Nava-Ruíz, C., & Méndez-Armenta, M. (2017). Metallothionein in Brain Disorders. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/5828056>
- Kaler, S. G. (2013). Inborn errors of copper metabolism. In *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 113, pp. 1745–1754). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59565-2.00045-9>

- Kalita, J., Kumar, V., Chandra, S., Kumar, B., & Misra, U. K. (2014). Worsening of Wilson disease following penicillamine therapy. *European Neurology*, *71*(3–4), 126–131. <https://doi.org/10.1159/000355276>
- Knochenmuss, R. (2006). Ion formation mechanisms in UV-MALDI. *Analyst*, *131*(9), 966–986. <https://doi.org/10.1039/b605646f>
- Kojimahara, N., Nakabayashi, H., Shikata, T., & Esumi, M. (1995). Defective copper binding to apo-ceruloplasmin in a rat model and patients with Wilson's disease. *Liver*, *15*(3), 135–142.
- Košler, J., & Sylvester, P. J. (2003). Present Trends and the Future of Zircon in Geochronology: Laser Ablation ICPMS. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, *53*(1), 243–275.
- Krishnamoorthy, L., Cotruvo, J. A., Chan, J., Kaluarachchi, H., Muchenditsi, A., Pendyala, V. S., Jia, S., Aron, A. T., Ackerman, C. M., Wal, M. N. V., Guan, T., Smaga, L. P., Farhi, S. L., New, E. J., Lutsenko, S., & Chang, C. J. (2016). Copper regulates cyclic-AMP-dependent lipolysis. *Nature Chemical Biology*, *12*(8), 586–592. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2098>
- Laur, N., Kinscherf, R., Pomytkin, K., Kaiser, L., Knes, O., & Deigner, H. P. (2020). ICP-MS trace element analysis in serum and whole blood. *PLoS ONE*, *15*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233357>
- Litwin, T., Dziezyc, K., Karliński, M., Chabik, G., Czepiel, W., & Członkowska, A. (2015). Early neurological worsening in patients with Wilson's disease. *Journal of the Neurological Sciences*, *355*(1–2), 162–167. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2015.06.010>
- Lutsenko, S. (2008). Atp7b<sup>-/-</sup> mice as a model for studies of Wilson's disease. *Biochemical Society Transactions*, *36*(6), 1233–1238. <https://doi.org/10.1042/BST0361233>
- Marnett, L. J. (2000). Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, *21*(3), 361–370.
- Maryon, E. B., Molloy, S. A., & Kaplan, J. H. (2013). Cellular glutathione plays a key role in copper uptake mediated by human copper transporter 1. *Am J Physiol Cell Physiol*, *304*, 768–779. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00417.2012.-Copper>
- Mccurdy, E., Yamada, T., & Wilbur, S. (2015). New! Solution-ready Agilent 7800 ICP-MS. *Agilent ICP-MS Journal*, *62*. [www.agilent.com/chem/7800icpms](http://www.agilent.com/chem/7800icpms)
- Michalczyk, A. A., Rieger, J., Allen, K. J., Mercer, J. F. B., & Leigh Ackland, M. (2000). Defective localization of the Wilson disease protein (ATP7B) in the mammary gland of the toxic milk mouse and the effects of copper supplementation. *Biochemical Journal*, *352*(2), 565–571.
- Miller, P. E., & Denton, M. B. (1986). The Quadrupole Mass Filter: Basic Operating Concepts. *Journal of Chemical Education*, *63*(7), 555–650. <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
- Muchenditsi, A., Talbot, C. C., Gottlieb, A., Yang, H., Kang, B., Boronina, T., Cole, R., Wang, L., Dev, S., Hamilton, J. P., & Lutsenko, S. (2021). Systemic deletion of Atp7b modifies the hepatocytes' response to copper overload in the mouse models of Wilson disease. *Scientific Reports*, *11*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84894-3>
- Muchenditsi, A., Yang, H., Hamilton, J. P., Koganti, L., Housseau, F., Aronov, L., Fan, H., Pierson, H., Bhattacharjee, A., Murphy, R., Sears, C., Potter, J., Wooton-Kee, C. R., & Lutsenko, S. (2017). Targeted inactivation of copper transporter Atp7b in hepatocytes causes liver steatosis and obesity in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, *313*(1), 39–49. <https://doi.org/10.1152/ajpgi>
- Mzhel'skaya, T. I. (2000). Biological Functions of Ceruloplasmin and Their Deficiency Caused by Mutation in Genes Regulating Copper and Iron Metabolism. *Translated from Bvulleten' Ek;Perimental'noi Biologii i Meditsiny*, *130*(8), 124–133.

- Nurm, M., Reigo, A., Annilo, T., Toomsoo, T., Nõukas, M., Nikopensius, T., Pankratov, V., Reisberg, T., Hudjašov, G., & Haller, T. (2024). Use of Estonian Biobank Data and Participant Recall to Improve Wilson's Disease Management. *European Journal of Human Genetics*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-4136207/v1>
- Ohgami, R. S., Campagna, D. R., McDonald, A., & Fleming, M. D. (2006). The Steap proteins are metalloreductases. *Blood*, *108*(4), 1388–1394. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-02-003681>
- Okayasu, T., Tochimaru, H., Takahashi, T., Takekoshi, Y., Li, Y., Togashi, Y., Takeichi, N., Kasai, N., & Arashima, S. (1992). Inherited Copper Toxicity in Long-Evans Cinnamon Rats Exhibiting Spontaneous Hepatitis: A Model of Wilson's Disease. *Pediatric Research*, *31*(3), 253–257.
- Palumaa, P. (2013). Copper chaperones. the concept of conformational control in the metabolism of copper. *FEBS Letters*, *587*(13), 1902–1910. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.05.019>
- Pfeiffenberger, J., Mogler, C., Gotthardt, D. N., Schulze-Bergkamen, H., Litwin, T., Reuner, U., Hefter, H., Huster, D., Schemmer, P., Członkowska, A., Schirmacher, P., Stremmel, W., Cassiman, D., & Weiss, K. H. (2015). Hepatobiliary malignancies in Wilson disease. *Liver International*, *35*(5), 1615–1622. <https://doi.org/10.1111/liv.12727>
- 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>
- Przybyłkowski, A., Gromadzka, G., Wawer, A., Bulska, E., Jabłonka-Salach, K., Grygorowicz, T., Schnejder-Pacholek, A., & Członkowski, A. (2013). Neurochemical and behavioral characteristics of toxic milk mice: An animal model of wilson's disease. *Neurochemical Research*, *38*(10), 2037–2045. <https://doi.org/10.1007/s11064-013-1111-3>
- Rauch, H., Lennartz, M., Water-man, K., & Kindy, M. (1983). Toxic milk, a new mutation affecting copper metabolism in the mouse. *The Journal of Heredity*, *74*(3), 141–144. <https://academic.oup.com/jhered/article-abstract/74/3/141/788192>
- Reed, E., Lutsenko, S., & Bandmann, O. (2018). Animal models of Wilson disease. *Journal of Neurochemistry*, *146*(4), 356–373. <https://doi.org/10.1111/jnc.14323>
- Roberts, E. A., & Schilsky, M. L. (2008). Diagnosis and treatment of Wilson disease: An update. *Hepatology*, *47*(6), 2089–2111. <https://doi.org/10.1002/hep.22261>
- Schmitz, O. (2016). LC/MS Coupling. In *The HPLC Expert* (pp. 1–60).
- Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P. K., & Viridi, J. S. (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology*, *6*(791). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00791>
- 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). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19873-2>
- Stadtman, E. R., & Levine, R. L. (2000). Protein oxidation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *899*, 191–208. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06187.x>
- Striegel, A. M. (2022). Size-Exclusion Chromatography: A Twenty-First Century Perspective. *Chromatographia*, *85*(4), 307–313. <https://doi.org/10.1007/s10337-022-04143-1>
- Strupat, K., Karas, M., & Hillenkamp, F. (1991). 2,5-Dihydroxybenzoic acid: a new matrix for laser desorption-ionization mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, *111*, 89–102.



- Sutton, K. L., & Caruso, J. A. (1999). Liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 856(1–2), 243–258. [www.elsevier.com/locate/chroma](http://www.elsevier.com/locate/chroma)
- Terada, K., Aiba, N., Yang, X.-L., Iida, M., Nakai, M., Miura, N., & Sugiyama, T. (1999). Biliary excretion of copper in LEC rat after introduction of copper transporting P-type ATPase, ATP7B. *FEBS Letters*, 448(1), 53–56.
- Terada, K., Nakako, T., Yang, X.-L., Iida, M., Aiba, N., Minamiya, Y., Nakai, M., Sakaki, T., Miura, N., & Sugiyama, T. (1998). Restoration of Holoceruloplasmin Synthesis in LEC Rat after Infusion of Recombinant Adenovirus Bearing WND cDNA\*. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(3), 1815–1820. <http://www.jbc.org/>
- Thirumoorthy, N., Shyam Sunder, A., Manisenthil Kumar, K. T., Senthil kumar, M., Ganesh, G. N. K., & Chatterjee, M. (2011). A review of metallothionein isoforms and their role in pathophysiology. *World Journal of Surgical Oncology*, 9(54). <https://doi.org/10.1186/1477-7819-9-54>
- Tsuchida, S., Umemura, H., & Nakayama, T. (2020). Current status of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical diagnostic microbiology. *Molecules*, 25(20). <https://doi.org/10.3390/molecules25204775>
- Turski, M. L., Brady, D. C., Kim, H. J., Kim, B.-E., Nose, Y., Counter, C. M., Winge, D. R., & Thiele, D. J. (2012). A Novel Role for Copper in Ras/Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling. *Molecular and Cellular Biology*, 32(7), 1284–1295. <https://doi.org/10.1128/mcb.05722-11>
- Uriu-Adams, J. Y., & Keen, C. L. (2005). Copper, oxidative stress, and human health. *Molecular Aspects of Medicine*, 26(4–5), 268–298. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.07.015>
- Vandenbroucke, A. M. (2017). *Abatement of volatile organic compounds by combined use of non-thermal plasma and heterogeneous catalysis*. <https://www.researchgate.net/publication/312493700>
- Vicario-Feliciano, R., Hernández-Hernández, C. I., Camacho-Pastor, I. C., & Martínez-Cruzado, J. C. (2022). A Custom-Made Newborn Screening Test for Wilson’s Disease in Puerto Rico. *Cureus*, 14(4). <https://doi.org/10.7759/cureus.24446>
- Walshe, J. M. (1956). Penicillamine, a New Oral Therapy for Wilson’s Disease. *The American Journal of Medicine*, 21(4), 487–495.
- Walshe, J. M. (1982). Treatment of Wilson’s disease with trientine (triethylene tetramine) dihydrochloride. *The Lancet*, 319(8273), 643–647.
- Walshe, J. M. (1999). Penicillamine: The Treatment of First Choice for Patients With Wilson’s Disease. *Movement Disorders*, 14(4), 545–550.
- Weiss, K. H., Thurik, F., Gotthardt, D. N., Schäfer, M., Teufel, U., Wiegand, F., Merle, U., Ferenci-Foerster, D., Maieron, A., Stauber, R., Zoller, H., Schmidt, H. H., Reuner, U., Hefter, H., Trocello, J. M., Houwen, R. H. J., Ferenci, P., & Stremmel, W. (2013). Efficacy and safety of oral chelators in treatment of patients with wilson disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 11(8), 1028-1035.e2. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2013.03.012>
- Wilschefska, S. C., & Baxter, M. R. (2019). Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Introduction to Analytical Aspects. *Clinical Biochemist Reviews*, 40(3), 115–133. <https://doi.org/10.33176/AACB-19-00024>
- Woimant, F., Djebrani-Oussedik, N., & Poujois, A. (2019). New tools for Wilson’s disease diagnosis: exchangeable copper fraction. *Annals of Translational Medicine*, 7(S2), S70–S70. <https://doi.org/10.21037/atm.2019.03.02>

- Wolf, M. (2015). *Effective interactions in liquid-liquid phase separated protein solutions induced by multivalent ions*.
- Wong, P. C., Waggoner, D., Subramaniam, J. R., Tessarollo, L., Bartnikas, T. B., Culotta, V. C., Price, D. L., Rothstein, J., & Gitlin, J. D. (2000). Copper chaperone for superoxide dismutase is essential to activate mammalian CuZn superoxide dismutase. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*, *97*(6), 2886–2891. [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.040461197](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.040461197)
- Wu, J., Forbes, J. R., Chen, H. S., & Cox, D. W. (1994). The LEC rat has a deletion in the copper transporting ATPase gene homologous to the Wilson disease gene. *Nature Genetics*, *7*(4), 541–545.
- Yamada, T., Agui, T., Suzuki, Y., Sato, M., & Matsumoto, K. (1993). Inhibition of the copper incorporation into ceruloplasmin leads to the deficiency in serum ceruloplasmin activity in Long-Evans Cinnamon mutant rat. *Journal of Biological Chemistry*, *268*(12), 8965–8971. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)52966-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)52966-5)
- Ylä-Herttuala, S. (1999). Oxidized LDL and atherogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *874*, 134–137. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb09231.x>

## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks<sup>1</sup>**

Mina, Andrei Jepifanov

1. Annan Tallinna Tehnikaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Madalmolekulaarne vase kandja hiirte uriini proovidest“, mille juhendajad on Julia Smirnova ja Ekaterina Kabin
  - 1.1 reprodutseerimiseks lõputöö säilitamise ja elektroonse avaldamise eesmärgil, sh Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogusse lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
  - 1.2 üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tallinna Tehnikaülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogu kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
  2. Olen teadlik, et käesoleva lihtlitsentsi punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
  3. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest ning muudest õigusaktidest tulenevaid õigusi.
- 

28.05.2024

---

<sup>1</sup> 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 loomingulise 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.