

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

Keemia Instituut

Karl Rene Kõlvart

**LIGANDI JA RETSEPTORI VAHELISTE INTERAKTSIOONIDE  
ISELOOMUSTAMINE TIRF-MIKROSKOOPIA ABIL**

Magistritöö(30 EAP)

Juhendajad: teadur Sergei Kopantšuk, PhD  
professor Ago Rincken, MD, PhD

Tartu 2019

# SISUKORD

<b>SISUKORD</b> .....	<b>2</b>
<b>KASUTATUD LÜHENDID</b> .....	<b>4</b>
<b>SISSEJUHATUS</b> .....	<b>5</b>
<b>1 VALDKONNA ÜLEVAADE</b> .....	<b>6</b>
<b>1.1 Signaaliülekanne</b> .....	<b>6</b>
<b>1.2 G- Valk seotud retseptorid</b> .....	<b>6</b>
1.2.1 Neuropeptiid Y1 retseptor .....	7
1.2.2 Frizzled-6 retseptor .....	9
<b>1.3 Ligandi sidumiskatsed</b> .....	<b>10</b>
1.3.1 TIRF-mikroskoopiaal põhinevad sidumiskatsed .....	12
<b>1.4 Biomolekulide püüdmine pinnale</b> .....	<b>14</b>
<b>1.5 Pungunud bakuloviirused kui valkude ekspressioonisüsteem</b> .....	<b>15</b>
<b>2 EKSPERIMENTAALNE OSA</b> .....	<b>17</b>
<b>2.1 Töö eesmärgid</b> .....	<b>17</b>
<b>2.2 Klaasi pinna funktsionaliseerimine</b> .....	<b>17</b>
2.2.1 Puhastamine .....	17
2.2.2 Silaanimine .....	17
2.2.3 Pegüleerimine .....	18
<b>2.3 BBV-de töötlemine</b> .....	<b>18</b>
2.3.1 BBV-de keemiline töötlemine .....	18
2.3.2 BBV-de mehaaniline töötlemine .....	19
<b>2.4 Fluorestsentsanisotroopia katsed</b> .....	<b>19</b>
<b>2.5 TIRF-mikroskoopia</b> .....	<b>20</b>
2.5.1 Mikroskoop .....	20
2.5.2 Läbivoolu süsteem .....	20
2.5.3 Fikseeritud süvenditega süsteem .....	21
<b>2.6 Tarkvara ja andmeanalüüs</b> .....	<b>22</b>

<b>3</b>	<b>TULEMUSED JA ARUTELU.....</b>	<b>24</b>
<b>3.1</b>	<b>Funktsionaliseeritud pindade kvaliteet.....</b>	<b>24</b>
3.1.1	Klaaside pinnakeemia kontrollimine.....	24
3.1.2	BBV-de sidumine pinnale läbi biotiin-PEG-kolesterooli.....	24
<b>3.2</b>	<b>BBV-de agregatsioon ja selle vähendamine.....</b>	<b>26</b>
<b>3.3</b>	<b>TIRFM-I põhineva sidumismeetodi testimine.....</b>	<b>29</b>
3.3.1	Fluorestsentsligandi MC026 seostumise uurimine FA abil.....	29
3.3.2	Fluorestsentsligandi MC026 seostumise uurimine TIRFM abil.....	30
3.3.3	Fluorestsentsligandi CM139 seostumise uurimine FA abil.....	32
3.3.4	Fluorestsentsligandi CM139 seostumise uurimine TIRFM abil.....	33
	<b>KOKKUVÕTE.....</b>	<b>35</b>
	<b>SUMMARY.....</b>	<b>36</b>
	<b>KASUTATUD KIRJANDUS.....</b>	<b>37</b>
	<b>TÄNUAVALDUSED.....</b>	<b>41</b>
	<b>LISAD.....</b>	<b>42</b>
	<b>INFOLEHT.....</b>	<b>45</b>

## KASUTATUD LÜHENDID

AC – Adenülaadi tsüklaas

BBV – Pungunud bakuloviirus (ingl. k *budded baculovirus*)

BSA – Veise seerumi albumiin

BVSD – Pungunud bakuloviirustega pinnale kuvamine (ingl. k *budded baculovirus surface display*)

DPBS – Dulbecco fosfaatpuhverdatud soolalahus

FA – Fluorestsentsanisotroopia

FM – Fluorestsentsmikroskoopia

FZD – *Frizzled* retseptorid

FZD<sub>6</sub> – *Frizzled-6* retseptor

GDP – Guansiindifosfaat

GPCR – G-valk seotud retseptor

GTP – Guansiintrifosfaat

MQ – MilliQ vesi

NPY – Neuropeptiid Y

NPY<sub>1R</sub> – Neuropeptiid Y<sub>1</sub> retseptor

PEG – Polüetüleenglükool

PP – Pankrease polüpeptiid

PYY – Peptiid YY

SMO - *Smoothened* retseptor

TFI – Totaalne fluorestsentsi intensiivsus

TIRFM – Totaalne sisepeegeldumise fluorestsentsmikroskoopia

WNT - *Wingless/int1* perekonna lipoglükoproteiinid

## SISSEJUHATUS

Inimese normaalse funktsioneerimise üheks eelduseks on organismisisene kiire ja korrektne info liikumine. Info ehk signaalid, mida keharakud saavad, töötlevad ja tekitavad, liigub ringi erinevate molekulide vormis. Molekulid võivad olla väga pisikesed ja lihtsakoelised, nagu hapnik või tunduvalt suuremad ja komplekssemad, nagu hemoglobiin. Olenemata suuruselt ühendab neid võime läbi vastavate signaali püüdvate biomolekulide infot vahendada. Inimkehas on üheks selliseks biomolekuliks G-valguga seotud retseptorid (GPCR). GPCR-de perekond on membraanretseptorite seas suurim ning mitmekülgseim. Väga paljude haiguste puhul on nende retseptorite kaudu võimalik rakkude väärtalitlust korrigeerida. Seetõttu on valdav enamus retseptiravimeid suunatud just GPCR-de mõjutamisele (Gacasan *et al.* 2017)

Selleks, et lahendada probleeme retseptorite kaudu toimivas info vastuvõtmises ja töötada välja efektiivsemaid ravimeid, on vaja kõigepealt mõista normaalse signaaliülekanne mehhanisme. Antud töös keskendutakse signaaliülekanne esimesele etapile ehk infot edasi andva molekuli ja retseptori vahelistele interaktsioonidele. Klassikaline viis selle protsessi uurimiseks on ligandi/ravimimolekuli sidumiskatsed, mille läbi viimiseks on kasutusel mitmesuguseid meetodeid. Erinevad sidumiskatsed annavad tihtipeale sama protsessi erinevate aspektide kohta olulist infot, kuid kõigil neil on omad head ja halvad küljed. Seega uute sidumismeetodite väljatöötamine, mis aitaksid täpsemini või uue nurga alt neid interaktsioone mõista, on kriitilise olulisusega.

Käesoleva töö eesmärgiks oli töötada välja uudne totaalse sisepeegelduse fluorestsentsmikroskoopiaal (TIRFM) põhinev sidumiskatse meetod. Meetodi abil on võimalik iseloomustada membraanretseptori ja ravimimolekuli vaheliste interaktsioonide tugevust.

# 1 VALDKONNA ÜLEVAADE

## 1.1 Signaaliülekanne

Rakkude võime reageerida välisele stimulatsioonile on üks elu olulisemaid alustalasid. Tihti peale võib üksik rakk võtta vastu korraga väga erinevaid signaale. Signaali detekteerimisel käivituvad omavahel seotud keemiliste reaktsioonide ahelad, läbi mille toimub signaali võimendumine ja tulemuseks on rakupoolne vastus. Peale signaali vastuvõtmise, on rakkudel võime ka infot välja anda ja mõjutada nii läheduses olevaid kui ka kaugemal asuvaid rakke. Hulkraksetes organismides sõltub rakkudevaheline signaali edastamine suuresti rakutüübist. Nii on näiteks närvisüsteemi üheks olulisemaks infovahendiks neurotransmitterid ja immuunsüsteemi puhul antikehad. Seega enamik infost levib kehas läbi erinevate keemiliste ühendite. Mõned rakud reageerivad ka mehaanilistele mõjutustele või näiteks valgusele, kuid kõigil juhtudel on läbivaks jooneks info detekteerimine spetsiifiliste valkude, retseptorite abil. Käesoleva töö raames on fookus membraansetel G-valk seotud retseptoritel (GPCR), mis moodustavad ühtlasi ka suurima raku pinnal asetsevate retseptorite perekonna (Lehninger et al 2005; Adams 2010).

## 1.2 G-valk seotud retseptorid

GPCR-ide superperekond, mida tuntakse ka kui seitsme transmembraanse  $\alpha$ -heeliksiga retseptorid, koosneb ~ 800-st retseptorist, millest umbes 350 on potentsiaalsed ravimi märklaud ja umbes 100 puhul ei teata selle funktsiooni ega ka milline endogeenne molekul seda aktiveerib (Tautermann 2014). GPCR-de puhul on leitud seoseid väga levinud haigustega nagu depressioon, allergiad, diabeet ja erinevad südame- ja veresoonkonna probleemid (Nelson and Cox 2008). GPCR-de olulisus haiguste puhul ning võimalus neid väga väikeste ravimi molekulidega mõjutada, teeb neist kõige suurema ravimi märklaudade perekonna (Zhang and Xie 2012). Need retseptorid moodustavad umbes 50% hetkel turul olevate ravimiainete sihtmärkidest (Gacasan *et al.* 2017). Nende retseptorite uurimiseks erinevate sidumismeetodite ja ravimimolekulide välja töötamine, on jätkuvalt maailmas kõige olulisemal kohal olev ravimiarenduse suund. Peale selle näitab GPCR-de olulisust ka 2012. aastal nende retseptorite struktuuri, aktivatsioonimehhanismide ja vahendatud signaaliülekanne uurimise eest Brian Kobilka-le ja Robert Lefkowitz-le antud Nobeli preemia (Zhang and Xie 2012; Lefkowitz and Kobilka 2012).

Erinevate signaalmolekulide, nagu neurotransmitterid ja hormoonid, abil mõjutatakse GPCR-de kaudu erinevaid rakuprotsesse, ühtlasi vastutavad retseptorid ka nägemise, haistmise ja maitse tundmise eest. Enamusele GPCR-dele on omane 7-st  $\alpha$ -heeliksist koosnev transmembraanne polüpeptiidne ahel, mida ühendavad lühikesed ~20-st aminohappejärgist koosnevad membraanist välja ulatuvad aasad (Rosenbaum *et al.* 2009). Aasad pole mitte ainult olulised struktuurielemendid, vaid on nähtud, et nad avaldavad mõju ka retseptorite erinevatele funktsioonidele (Wheatley *et al.* 2012). GPCR-d jagunevad geenijärjestuste põhjal viide erinevasse perekonda: rodopsiinilaadsed (klass A), adhesiooni (klass B), sekretiinilaadsed (klass C), glutamaadilaadsed (klass D) ja *Frizzled/Taste2* (klass F) retseptorid (Krishnan *et al.* 2012) Olgugi, et retseptorite üldine struktuur on küllaltki sarnane ka eri perekondade vahel, siis see, millist signaalirada rakus mõjutatakse, võib olla väga erinev. Retseptorite rakuvälisel mõjutamisel aktiveeruvad enamjaolt rakusisesed spetsiaalsed valgud, mida nimetatakse G- Valkudeks (Rosenbaum *et al.* 2009; Neer 1995).

G-valgud koosnevad kolmest polüpeptiidsest alaühikust:  $\alpha$ -alaühik, mis on võimeline siduma ja hüdrolüüsima guanosiintrifosfaati (GTP) ning  $\beta$  ja  $\gamma$  alaühikutest.  $\beta$  ja  $\gamma$  alaühikud moodustavad dimeeri, mis dissotsieerub ainult denaturatsiooni teel (Neer 1995). Mitteaktiivses olekus on G-valguga seotud guanosiindifosfaat (GDP). G- Valkude aktivatsioon toimub, kui GTP seostub GDP asemele. Selle reaktsiooni toimumiseks on vajalik, et retseptor, millega G- valk on seotud, muudaks enda konformatsiooni. GTP seostumine põhjustab  $\alpha$ -alaühiku ja  $\beta\gamma$  alaühiku dissotsiatsiooni. Vabanenud alaühikud saavad edasi reageerida efektorvalkudega (näiteks adenülaadi tsüklaas (AC) ja fosfolipaasid), mis mõjutavad mitmeid erinevaid signaaliradasid. Aktiveeritud oleku kestvus on määratud  $\alpha$ -alaühiku GTP-d hüdrolüüsiva aktiivsusega, mille tõttu mõne aja möödudes pärast G-valgu dissotsiatsiooni toimub GDP taasteke ning mitteaktiivne G- valk saab uuesti retseptoriga liituda (Kleuss *et al.* 1994; Lefkowitz and Kobilka 2012).

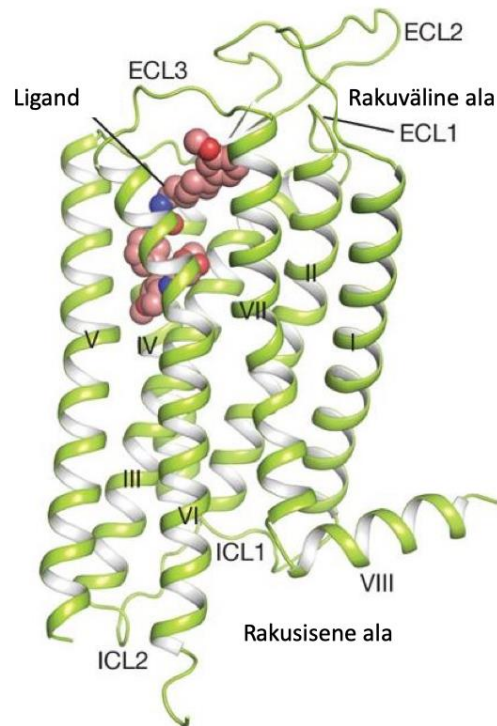
### 1.2.1 Neuropeptiid Y1 retseptor

Neuropeptiidid hõlmavad ühte väga suurt ja mitmekülgset põhiliselt kesknärvisüsteemis baseeruvat signaalmolekulide gruppi. Enamik neuropeptiidide töötavad ka hormoonidena või neil on evolutsiooniliselt sarnaseid peptiide, mis seda ülesannet täidavad. Neuropeptiidid koosnevad aminohappejääkidest ning on tüüpiliselt 3-36 jääki pikad (Panawala 2018). Üks

olulisimaid neuropeptiide on neuropeptiid Y (NPY). NPY avastati esmakordselt 1982. aastal ning avastajate seas oli ka eestlane Viktor Mutt (Tatemoto *et al.* 1982). NPY on 36 aminohappejäkki pikk peptiid, mida leidub kõige enam sümpaatilistes neuronites. NPY-1 on oluline roll erinevates füsioloogilistes protsessides, nagu tuju regulatsioon, veresoonekonna ja immuunsüsteemi homöostaas, angiogenees ja söögiisu kontroll (Tan *et al.* 2018). Need peptiidid seostuvad inimkehas vastavate GPCR-dega, mida kutsutakse NPY retseptoriteks (Yang *et al.* 2018).

NPY retseptorid kuuluvad GPCR-de klass A perekonda ehk rodopsiinilaadsed retseptorid (Wraith *et al.* 2000). Imetajates on kindlaks tehtud neli erinevat NPY retseptorit: Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub>, Y<sub>4</sub> ja Y<sub>5</sub>. Peale NPY on veel olemas kaks sarnast endogeenset peptiidi (peptiid YY (PYY) ja pankrease polüpeptiid (PP)), mis aktiveerivad samuti NPY retseptoreid. Kuna kolmel peptiidil on väga erinevad afiinsused erinevate NPY retseptori vormide suhtes, on kompleksse NPY retseptorsüsteemi uurimine väga keeruline (Yang *et al.* 2018). Antud töös keskendutakse neuropeptiid Y<sub>1</sub> retseptorile (NPY1R), millele on hiljuti leitud ka seostunud ligandiga kompleksi kristallstruktuur (Joonis 1). NPY1R on postsünaptiline retseptor, mis paikneb aju erinevates piirkondades, kuid põhiliselt hüpotaalamuses (MacNeil 2007). Retseptorit seostatakse tugevalt toitumisvajaduse, hormoonide sekreteerimise, emotsioonide ja stressi mõjutamise ning alkoholismiga. On täheldatud, et NPY1R seob enda külge G<sub>i</sub>/G<sub>o</sub>-valku (Eva *et al.* 2006). Seega retseptori aktivatsioonil toimub ensüümi AC inhibeerimine, mille tõttu toimub sekundaarse virgatsaine (tsükliline adenosinmonofosfaat (cAMP)) kontsentratsiooni vähenemine (Jiang and Bajpayee 2009). Mitmeid retseptori aktivatsiooni blokeerivaid madalamolekulaarseid ühendeid on NPY1R puhul iseloomustatud ning nad on näidanud kliinilist potentsiaali, näiteks ülekaalulisuse vähendamisel (Antal-Zimanyi *et al.* 2008). Samas nende ühendite reaalsel kliinilisel kasutamisel takistavad teatud tegurid, nagu liiga madal afiinsus, selektiivsus ja nõrk vere-aju barjääri läbistamise võime. Seega aktiivne uute ühendite disain ja testimine on kriitilise tähtsusega, et NPY1R kaudu oleks võimalik haigusi paremini ravida (Yang *et al.* 2018).





**Joonis 1. NPY1R ja retseptorit mitte-aktiveeriva ligandi ehk antagonisti kompleksi kristallstruktuur.** ECL – rakuväline aas; ICL – rakusisene aas. Modifitseeritud (Yang *et al.* 2018).

### 1.2.2 Frizzled-6 retseptor

GPCR-de superperekonna üks kõige vähem uuritud retseptorite klass on F ehk *frizzled* retseptorid (FZD). Sinna klassi kuulub 10 FZD<sub>1-10</sub> retseptorit ja üks *Smoothened* retseptor (SMO) (Schulte and Kozielowicz 2019). FZD-sid aktiveerivad endogeensed *wingless/int1* perekonda kuuluvad lipoglükoproteiinid (WNT). FZD-te ja WNT-de kaudu toimuv rakkudevaheline suhtlus on oluline, et saaks toimuda loote normaalne areng. Lisaks on täheldatud, et täiskasvanud organismis toimub retseptorite kaudu ka kudede homöostaasi, regeneratsiooni, plastilisuse ja parandamise kontroll (Dijksterhuis *et al.* 2014). Olgugi, et FZD-de struktuur tundub esmajoonel väga sarnane tüüpiliste GPCR-dega, siis tegelikult on neil struktuurseid eripärasid, mille tõttu on nad ka eraldi klassi paigutatud. Näiteks N-terminaalsest otsast umbes 30 aminohappejäägi kaugusel paikneb FZD domeen, mida kutsutakse ka tsüsteiini rikkaks piirkonnaks. See piirkond on ~ 120 aminohappejääki pikk ja arvatakse, et tegemist on WNT-de sidumiskohaga. Lisaks on täheldatud, et osad FZD-d seovad enda C-terminaalsesse osasse fosfoproteiini *Disheveled* (DVL), millele on omistatud mitmeid funktsioone nagu G-valgu retseptorile sidumise osakaalu mõjutamine (Schulte 2010; Schulte and Kozielowicz

2019). Kuna DVL kattub G-valkude seostumise alaga, siis nende signaalsüsteemide koostöö mehhanismist arusaamine on väga vajalik antud retseptorsüsteemi funktsioneerimise mõistmisel (Schulte 2014; Kilander *et al.* 2014b).

FZD<sub>6</sub> on kümnest FZD-st kõige suurem valk. See koosneb 706-st aminohappejäägist. FZD<sub>6</sub> peetakse raku polaarsuse ja liikuvuse üheks mõjutajaks. Kuigi infot FZD<sub>6</sub> kohta on veel vähe, siis on täheldatud, et retseptor on seotud G<sub>i</sub>/G<sub>o</sub>-valguga (Kilander *et al.* 2014a). Seega sarnaselt NPY1R-le, kui FZD<sub>6</sub> aktiveerida, toimub cAMP-i kontsentratsiooni langus rakus.

### 1.3 Ligandi sidumiskatsed

Ravimimolekuli ehk ligandi ja sihtmärgi vaheliste interaktsioonide uurimine annab võimaluse seletada keerukaid bioloogilisi protsesse ja disainida uusi tugevama terapeutilise efektiga molekule (Fang 2012). Sidumiskatsetega on võimalik iseloomustada ligandi ja retseptori vaheliste interaktsioonide tugevust, seostumise ja dissotsiatsiooni kineetikat ning rakkudes või membraanpreparaadis olevat retseptorite kontsentratsiooni (Zhang and Xie 2012). Kasutatakse nii radioaktiivsusel põhinevaid kui ka mitte-radioaktiivseid meetodeid. Kuna retseptori afiinsus ligandi suhtes võib olla väga suur, siis tihti on vajalik kasutada väga madalaid retseptori või ligandi kontsentratsioone. Selle tõttu peavad olema sidumiskatsed piisava tundlikkusega. Varasemalt oli see saavutatav ainult radioaktiivsust ära kasutades, kuid nüüd tagavad seda ka fluorestsentsil põhinevad meetodid (Yakimchuk 2011). Fluorestsentsi tundlikkus põhineb sellel, et fluorestseeruv molekul neelab valgust madalamal lainepikkusel, kui ta lõpuks fluorestsentskiirgust välja kiirgab, mille tõttu taustamüra tekib vähe (Lakowicz 2006). Seega meetodite suurim erinevus seisneb ligandi või retseptori märgistamise viisis, milleks tüüpiliselt kasutatakse radioaktiivset või fluorestseeruvat molekuli. Kuna radioaktiivne isotoopmärgis, nagu triitium, on nii väikene, siis see ligandi afiinsusele mõju ei avalda. Samas olgugi, et radioligandi sidumine annab üsna puhta ja konkreetse signaali, siis ligandid on suhteliselt kallid, raskesti käideldavad ja mõnedel isotoopidel on ebamugavalt lühikesed poolestusajad (De Jong *et al.* 2005). Antud töös kasutati ainult fluorestsentsil põhinevaid meetodeid. Üldiselt nimetatakse märgistatud ligandi fluorestseeruvat osa fluorofooriks ning farmakoloogilist mõju avaldavat osa farmakofooriks. Viimasel ajal on biokeemia valdkonnas toimunud hüppeline fluorestsentsil põhinevate meetodite kasutuselevõtt, mille põhjus võib peituda uutes tugevama intensiivsusega fluorofoorides, millel on suurem fotostabiilsus ning paremad keemilised

omadused nagu lahustuvus ja pH-stabiilsus (Hertzberg and Pope 2007). Sidumiskatsete seisukohalt on ligandi märgistamiseks kasutatava fluorofoori valimine kriitilise tähtsusega. Eriti, kui on tegemist madalamolekulaarsete ligandidega. Väga suur fluorofoor võib oluliselt mõjutada ligandi sidumisomadusi. See on fluorestsentsil baseeruvate meetodite üks suurimaid kitsaskohti. Seega, kui sünteesitakse uus fluorestsentsmärgisega ligand, siis tuleks seda võtta, kui uudset molekuli, mille kohta katseline info puudub ja mida peaks täielikult iseloomustama (De Jong *et al.* 2005).

Fluorestsentsil põhinev mõõtmine annab molekulaartasandil toimuvaga seotud olulist infot, nagu solvendiefektid fluorofoorile, sidumiskohtade kaugused biomolekulide pinnal, biomolekulide konformatsiooni muutused ja sidumisomadused (Lakowicz 2006). Üks selline fluorestsentsmeetod tugineb fluorestsentsanisotroopia (FA) mõõtmisele ligandi ja retseptori interakteerumisel (Jameson and Mocz 2005). FA põhineb teadmisel, et madala molekulmassiga ligandi molekulidel on tunduvalt suurem rotatsiooniline vabadus, kui valkudel ja teistel kõrgmolekulaarsetel ühenditel. Fluorofoorid, mille elektriline dipool on lineaarselt polariseeritud valguse tasandiga paralleelne, ergastatakse fotoselektiivselt. Olenevalt roteerumise kiirusest ja fluorestsentsi eluea pikkusest võib molekulide elektriline dipool ergastatud oleku ajal roteeruda. Kuna emiteerunud kiirguse intensiivsuse mõõtmine toimub ergastava kiirguse tasandiga nii paralleelselt kui ka ristipidiselt tasandilt, siis seostumata ligandid, mis roteeruvad väga kiiresti, emiteerivad seega enamjaolt depolariseeritud valgust. Ligandi sidumise tulemuseks aga, on osaliselt polariseeritud valgus ja polariseerituse tase sõltub fluorofoori roteerumise ulatusest tema eluea jooksul (Lakowicz 2006). Seega madalamolekulaarse fluorestsentsligandi seostumisel suure retseptoriga toimub FA kasvamine. FA-d mingil konkreetsel ajahetkel saab arvutada valemiga (1) (Jabłoński 1960):

$$FA = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (1)$$

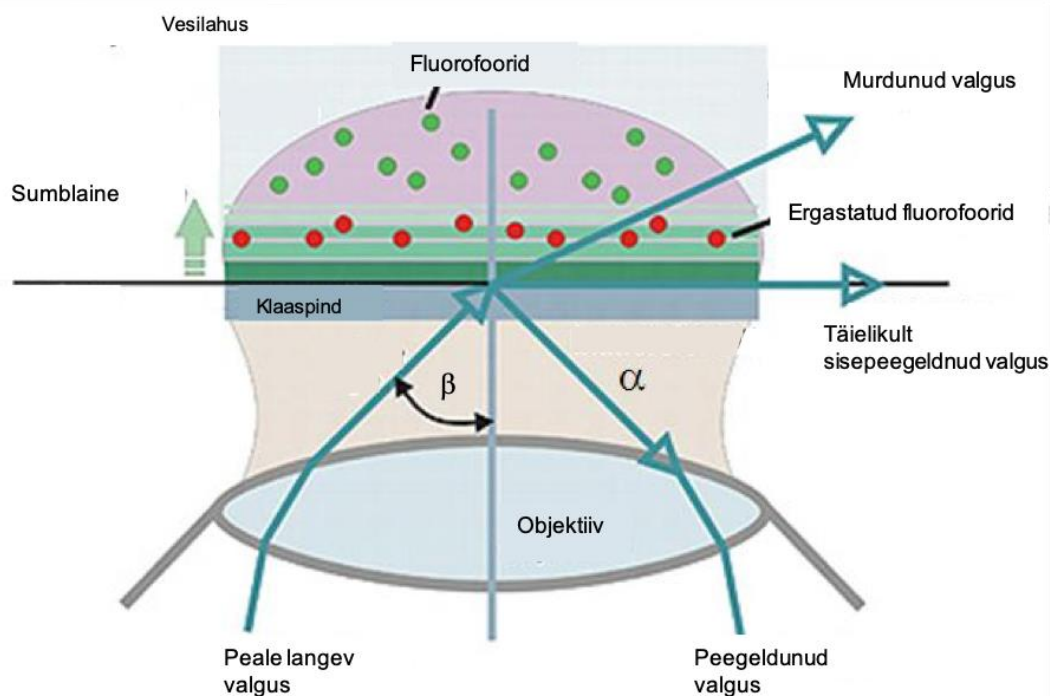
Anisotroopia (FA) on seega defineeritud kui paralleelselt ( $I_{\parallel}$ ) ja ristipidiselt ( $I_{\perp}$ ) polariseeritud fluorestsentsi intensiivsuste vahe jagatis totaalse fluorestsentsi intensiivsusega (TFI) ehk  $I_{\parallel} + 2I_{\perp}$ .

Kombineerides reaajas mõõdetud intensiivsuste erinevaid väärtuseid, on võimalik ligandi ja retseptori vahelisi interaktsioone erinevate nurkade alt analüüsida. FA ja TFI abil on võimalik

iseloomustada, näiteks ligandi sidumise afiinsust ja kvantsaagise muutuseid sidumise käigus. Selleks aga, et saavutada detekteeritavad FA/TFI signaali muutused, peavad olema teatud tingimused täidetud – retseptori sidumiskohtade kontsentratsioon ja reaktsiooni tasakaaluline dissotsiatsiooni konstant  $K_D$  peaksid olema samas suurusjärgus, mis ligandi kontsentratsioon. Sellisel juhul seostub märgatav osa ligandist retseptoriga ning reaktsioon toimub teist järku keemilise reaktsiooni tingimuste järgi. Seega analüüsil on oluline ka arvesse võtta reaktsiooni käigus toimuvat vaba ligandi kontsentratsiooni vähenemist (ingl. k *depletion*) (Veiksina *et al.* 2014). Kuna FA puhul on vajalik küllaltki kõrget valgus kontsentratsiooni, mis üldiselt looduslikus koes on liiga madal, siis kasutatakse tihtipeale üleekspresseeritud süsteeme nagu pungunud bakuloviiruse (BBV) osakesed (Rinken *et al.* 2018).

### **1.3.1 TIRF-mikroskoopia põhinevad sidumiskatsed**

FA puhul toimub mõõtmine küll reaajas, kuid süvendis toimuvaid protsesse selle abil visualiseerida on keeruline. Ligandi ja valgus interaktsioonide visualiseerimise jaoks on aga olemas eraldi mikroskoopia valdkond, fluorestsentsmikroskoopia (FM) (Lakowicz 2006). Üheks FM alaliigiks on täieliku sisepeegeldumise fluorestsentsmikroskoopia (TIRFM). TIRFM võimaldab vesilahuses väga selektiivselt visualiseerida fluorestseeruvaid molekule, mis asuvad kõrge murdumisnäitajaga pinnamaterjali lähedal (Axelrod 1981). Täielik sisepeegeldumine toimub siis, kui valguskiir kohtub pinnaga, mille välimise poole (vesi) murdumisnäitaja on väiksem, kui sisemise (klaas) poole oma ning valguse langemisnurk ületab teatud kriitilise nurga (Joonis 2). Kriitiline nurk sõltub materjalide, mida valguskiir läbib, murdumisnäitajatest ja valguse lainepikkusest (Lakowicz 2006).



**Joonis 2. TIRFM põhimõtteline skeem.** Klaaspinnal on vesilahus, milles paiknevad huvipakkuvad biomolekulid ja ligandid. Kui läbi objektiivi suunata pinnale fluorofoori ergastava lainepikkusega valgust, siis kui langemisnurk ( $\beta$ ) ületab kriitilise nurga piiri, tekib täielikult sisepeegeldunud valguskiir, mis on pinnaga paralleelne. Sisepeegeldumisega kaasneb sumblaine, mis ergastab pinnale väga lähedal olevad fluorofoorid. Modifitseeritud (Silver 2013).

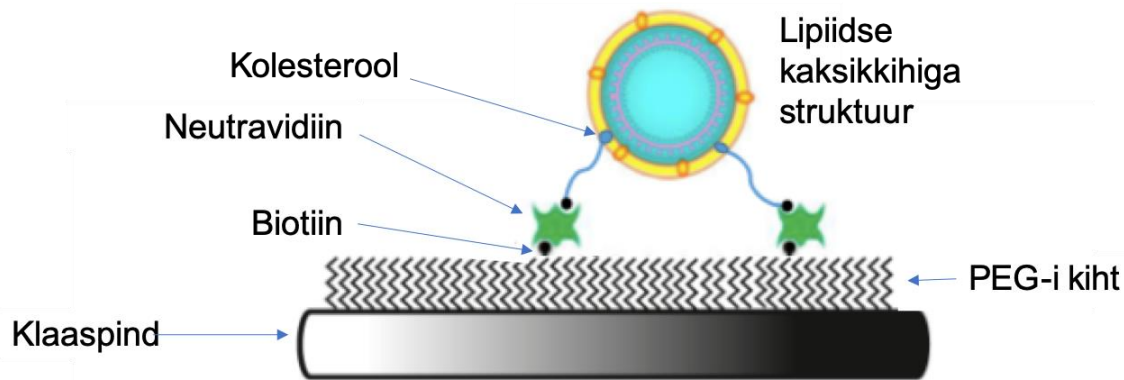
Peegeldumine tekitab väga õhukese elektromagnetilise sumblaine (ingl. k *evanescent field*), mis levib klaaspinna vesilahuse poolel ja millel on peegelduva valgusega sama sagedus. Sumblaine sügavus on funktsioon peale langeva valguse langemisnurgast, lainepikkusest ja murdumisnäitajate erinevusest kahe keskkonna vahel. Laine intensiivsus kahaneb klaaspinnalt kaugenedes eksponentsiaalselt. See tähendab, et ergastuvad ainult fluorofoorid, mis asuvad 100-200 nm kaugusel klaaspinnast (Fish 2009). Õhuke ergastamise kiht vähendab oluliselt taustamüra, mis tuleneb lahuses ringi difundeeruvast seostumata fluorofoorist ja seetõttu on TIRFM puhul väga hea signaali-müra suhe. Kõik see annab võimaluse pinnal toimuvaid protsesse väga kõrge aksiaalse resolutsiooniga uurida. Seetõttu on TIRFM-ga võimalik uurida biomolekuli ja ligandi vahelisi interaktsioone isegi ühe molekuli tundlikkusega (Axelrod 2003). See seab aga pinnatöötamise kvaliteedile kõrged normid. Pinnad peavad suutma hoida ära ligandide mittespetsiifilist seostumist ning olema ise mitte-fluorestseeruvad, et pinnast tulenev autofluorestsents huvipakkuvat signaali segama ei hakkaks.

## 1.4 Biomolekulide püüdmine pinnale

Selleks, et vaadelda sidumisprotsesse üksikmolekuli tundlikkusega TIRFM-ga, on vaja huvipakkuvad molekulid tavaliselt klaaspinna külge kinnitada. Pinna, kuhu saab spetsiifiliselt biomolekule siduda, ettevalmistamine on selliste mikroskoopia katsete juures üks kõige kriitilisema tähtsusega ja ajakulukaim osa (Gust *et al.* 2014). Ebapuhtale pinnale jäänud mustusosakesed võivad tugevalt fluorestseeruda, eriti kui ergastada madalamatel lainepikkustel. Tulemuseks on kõrge mittespetsiifiline taustasignaali, mis pärsib spetsiifilise signaali tuvastamist. Levinumad töötamise protokollid sisaldavad intensiivset klaaside pesu, millele järgneb tavaliselt pinna kaitsva kihiga katmine ehk passiveerimine, mis takistab mittespetsiifilist biomolekulide adhesiooni (Kuhn *et al.* 2012; Jain *et al.* 2012). Paljud orgaanilised fluorofloorid ja valgud on hüdrofoobsete omadustega, mille tõttu võivad need kaitsmata klaaspinnaga seostuda. Lisaks võib töötlemata klaaspind mõjutada valkude stabiilsust. Seega pinna passiveerimine tekitab biomolekulide suhtes inertse keskkonna (Gust *et al.* 2014). Passiveerimiseks on laialdaselt kasutatud veise seerumi albumiini (BSA) adsorbeerimist pinnale, kuid on nähtud, et keerulisemate biomolekulide puhul BSA piisavalt head toimet ei anna (Jain *et al.* 2012). Parema passiveerimise tagab hüdrofiilisel polüetüleenglükoolil (PEG) põhineva kihi loomine. Tihedalt koosnevatest PEG-i molekulidest koosneva pinnakatte saamiseks klaas kõigepealt silaniseeritakse aminosilaanidega, et tekiksivad vabad aminorühmad. Aminorühmade külge kinnitatakse PEG-i molekulid, mille üks ots on aminorühma reaktiivne ja teine ots on biotiin või metoksürühm. Biotiini lisamine kaitsvale kihile annab võimaluse sinna soovitud molekulide spetsiifiliselt kinnitada. Enne reaalseid mõõtmisi inkubeeritakse reaktsioonisegu streptavidiini või neutravidiiniga valkudega, millel on neli biotiinile spetsiifilist sidumistaskut. Seega saab pinnale kinnitada erinevaid biotinüleeritud bioloogilisi struktuure, mis tänu tugevatele interaktsioonidele võivad püsida pinna küljes isegi tunde (Gust *et al.* 2014).

Liposoomide, rakkude, bakterite ja viiruste biotinüleerimine ja märgistamine on tülikas ja võib membraansete valkude funktsioone mõjutada. Selle asemel on Kuhn *et al.* välja pakkunud kasutada lipiidset kaksikkihti omavate osakeste püüdmisel hoopis kolesteroolil põhinevaid derivaate (Kuhn *et al.* 2012). Arvestades kolesterooli lipofiilseid omadusi, mis võimaldab teda haarata membraani koostisesse, kasutatakse kolesterooli derivaate, et huvipakkuv membraaniga kaetud struktuur, näiteks bakter või viirus pinnale kinnitada. Kolesterooli

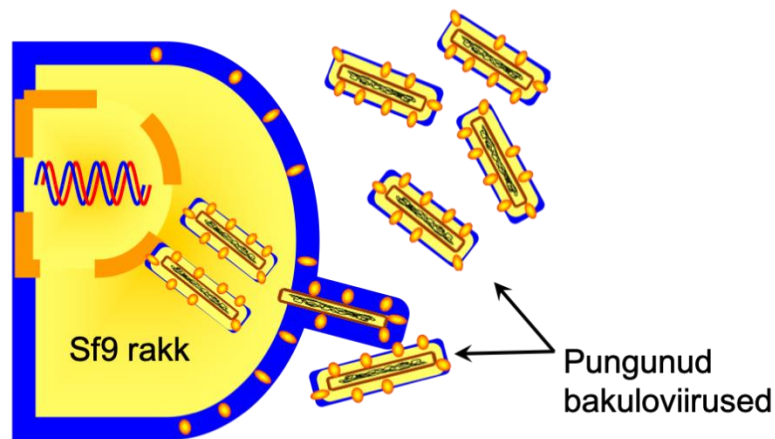
molekuli küljes on tavaliselt veel PEG, mille kaudu on teise otsa küljes biotiin (Joonis 3). Kolesterool-PEG-biotiin kompleksis suurendab hüdrofiilne PEG vees lahustumist. Biotiin on vajalik, et läbi neutravidiini silla seotud kompleks oleks pinnale tugevalt kinitatud (Kuhn *et al.* 2012). Antud töö raames seoti pinnale pungunud bakuloviiruseid (BBV).



**Joonis 3. Passiveeritud klaaspinnale lipiidse kaksikkihiga struktuuri sidumine.** Pind on passiveeritud PEG-i kihiga, milles paiknevate biotiini jääkide külge on seotud neutravidiin. Neutravidiini küljes on biotiin-PEG-kolesterool kompleks, mis on omakorda ankurdund lipiidse kaksikkihti.

## 1.5 Pungunud bakuloviirused kui valkude ekspresioonisüsteem

Paljud farmakoloogilised märklauad esinevad organismis väga madalates kontsentratsioonides. Seega, et uurida valkude nagu GPCR-d struktuuri ja funktsionaalsust, on tihti vajalik valkude üle-ekspresseerimine, milleks kasutatakse rekombinantseid valgu ekspresioonisüsteeme (Makela and Oker-Blom 2008). Levinud on pärmide, viirustega nakatatud putuka- ja imetajarakkude ja bakterite kasutamine ekspresioonisüsteemina (Massotte 2003). Käesolevas töös kasutati retseptorite ekspresseerimiseks pungunud bakuloviirustega pinnale kuvamist (ingl. k *budded baculovirus surface display* (BVSD)).



**Joonis 4. Bakuloviiruste pungumine Sf9 rakust.** Rekombinantset DNA-d sisaldavad viirused nakatavad peremeesraku ning põhjustavad huvipakkuva GPCR-i viimise raku pinnale. Teatud aja möödudes replitseerunud viiruse DNA pungub rakust välja, ümbritsedes ennast peremeesraku membraaniga.

BVSD põhineb bakuloviiruste võimel ekspresseerida võõraid valke nakatunud putukarakkude pinnale. Putukarakkudena kasutatakse laialdaselt uitöölaste sugukonda kuuluva rööviku *Spodoptera frugiperda* ehk Sf9 rakke (Loisel *et al.* 1997). BBV-d tekivad putukarakkude nakatustsükli tulemusena, kui viiruse kapsiidid punguvad Sf9 rakkude pinnalt välja (Joonis 4). BBV-d on kepikujulised lipiidse kaksikkihiga ümbritsetud viirused, mis on umbes 40-50 nm-se läbimõõduga ja ~ 250 nm-se pikkusega. Lipiidne kaksikkiht pärineb Sf9 rakkudelt ning sisaldab membraanvalke, mis on peremeesraku pinnale eelnevalt ekspresseeritud. Nende eriliste omaduste tõttu on BBV-d väga mugav rakuvaba GPCR-de uurimise süsteem, sest viirused on vees lahustuvad ning pinnal olevad retseptorid säilitavad algse konformatsiooni (Veiksina *et al.* 2014).

BBV-d on võimelised nakatama väga mitmeid putukarakkude liike, kuid selgroogsetes peremeesorganismides need ei paljune. Mugav ja ohutu käsitlemine (Bioohutuse tase 1 – ohutud nii inimesele kui keskkonnale) ning kuluefektiivne suurel skaalal tootmine teeb BBV-dest väga kasuliku tööriista ligandi ja retseptori vaheliste interaktsioonide uurimisel (Braun 2006). Sellegipoolest ei tohi BBV-de kasutamisel unustada, et tegemist on putukarakkudel põhineva süsteemiga. Võrreldes kõrgema keerukusega eukarüootidega, võib putukarakkude puhul esineda post-translatoorsete muudatuste erinevusi, nagu glükosüleerimise muster ning erineda võib ka lipiidse kaksikkihi koostis (Makela and Oker-Blom 2008).



## 2 EKSPERIMENTAALNE OSA

### 2.1 Töö eesmärgid

Antud töö eesmärgiks oli töötada välja totaalse sisepeegelduse fluorestsentsmikroskoopiaal (TIRFM) põhinev sidumiskatse meetod.

Töö jaotati järgmisteks alametappideks:

1. BBV-de spetsiifiline kinnitamine pinnale ja selle tõestamine
2. Funktsionaliseeritud klaasidega süvendisüsteemi disain ja testimine
3. BBV-de külmutamisest tuleneva agregatsiooni vähendamine
4. FA mõõtmised NPY1R-le spetsiifiliste fluorestsentsligandidega
5. TIRFM katsed uue meetodiga, kasutades samu ligande, mis FA katsetes

### 2.2 Klaasi pinna funktsionaliseerimine

#### 2.2.1 Puhastamine

Puhastati 22x22 mm-seid ja 12 mm diameetriga mikroskoobi katteklase, mille paksus oli  $170 \pm 5 \mu\text{m}$  (Marienfield). Enne klaaside puhastamist pesti nii klaasist kui ka metallist loputusanumaid esmalt deioniseeritud veega ning seejärel metanooliga (Naxo). Orgaanilise mustuse jääkide eemaldamiseks ja anumate kuivatamiseks hoiti neid plasma puhastis (ATTO Plasma Cleaner, Diener Electronics) 20 minutit võimsusel 200W. Klaasid viidi vastavatesse puhastatud anumatesse ning loputati Milli-Q (MQ) veega ja metanooliga. Pestud klaase sonikeeriti ultrahelivannis (Wiseclean) 15 minutit MQ-s ning 15 minutit metanoolis. Klaase kuivatati 5 minutit plasma puhasti vaakumrežiimil ning töödeldi 15 minutit võimsusel 200W.

#### 2.2.2 Silaanimine

Silaanimiseks kasutati 2 mM aminosilaani (N-[3- Trimetoksüsülüül]propüül]etüleendiamiin) (Sigma Aldrich) segu metanoolis, mis sisaldas 5% äädikhapet (Naxo). Puhastatud klaasid viidi teflonhoidjale, mis asetati valmistatud silaanimise segusse. Klaase inkubeeriti pimedas kapis toatemperatuuril 10 minutit, sonikeeriti 1 minut ja inkubeeriti uuesti pimedas 10 minutit. Silaanimisreaktsioon peatati viies teflonhoidja metanooliga täidetud keeduklaasi. 1 minuti möödumisel viidi klaasid järgmisesse metanooliga täidetud klaasi ning korrati sammu veel ühe

korra. Klaase kuivatati 5 minutit plasma puhasti vaakumrežiimil ning jäeti vaakumi alla kuni pegüleerimiseni.

### 2.2.3 Pegüleerimine

1 h enne kasutamist võeti toatemperatuurile stabiliseeruma metoksü-PEG-NHS (Iris Biotech) ja biotin-PEG-NHS (Iris Biotech), mida säilitatakse -20 °C juures. Pegüleerimisreaktsioon viidi läbi plastikkambris, mille põhja lisati deioniseeritud vett, et kambris oleks niiske keskkond. Reaktsioonipuhvriks valmistati 100 mM NaHCO<sub>3</sub> (Naxo) lahus. Valmistati 460 mg/mL metoksü-PEG-NHS ja 9,5 mg/mL biotiin-PEG-NHS lahused reaktsioonipuhvris. Mõlemast lahusest võeti 90 µL ja segati kokku üheks pegüleerimise seguks. Plasma puhastist võeti 4 klaasi ning asetati plastikkambrisse. Olenevalt klaasi suuruselt lisati igale klaasile 20-30 µL valmistatud pegüleerimise segu. 4 silaanitud klaasi asetati plastikambris olevatele klaasidele peale ehk pegüleerimise segu jäi kahe klaase vahele. Kambri kaas suleti ja klaase inkubeeriti ~ 24 h toatemperatuuril pimedas. Inkubatsioonile järgnes klaaside pesu, et eemaldada üleliigne pegüleerimise segu. Klaase loputati rohke MQ veega, kuivatati lämmastiku gaasivoolus ning säilitati lämmastiku keskkonnas -20 °C juures.

## 2.3 BBV-de töötlemine

Rekombinantsed BBV-de preparaadid, mis sisaldavad NPY1R-t, toodeti Santa Veikšina poolt, mille valmistamise kirjeldus on varasemalt publitseeritud (Veiksina *et al.* 2014). FZD<sub>6</sub>-mCherry retseptorit sisaldavad BBV-de preparaadid valmistati samuti S. Veikšina poolt sama meetodikaga nagu NPY1R-t sisaldavad BBV-d. Nende BBV-de valmistamiseks vajaliku V5-FZD<sub>6</sub>-mCherry DNA-fragmendi andis Prof. Gunnar Schulte Karolinska Instituudist (Rootsi) ja selle vektori valmistamise meetodika on varasemalt kirjeldatud (Petersen *et al.* 2017). Saadud preparaatide lahused alikvooditi ja säilitati valguse eest kaitstult -80 °C juures.

### 2.3.1 BBV-de keemiline töötlemine

Pikemaajalisel säilimisel ja külmutamisel moodustasid BBV-d agregate. Agregaatide likvideerimiseks töödeldi BBV-de preparaati enne katses kasutamist 30 min 4 °C juures

võrdses koguses 100% AccuMax (Sigma-Aldrich), 50 mM trehaloosi (AppliChem) või 50 mM L-arginiini (AppliChem) lahustega.

### 2.3.2 BBV-de mehaaniline töötlemine

Külmumise tõttu tekkinud BBV-de agregaatide lagundamiseks kasutati ka mehaanilist töötlemist ekstruuderiga (ingl. k *extruder*) (Mini Extruder, Avanti). 150 µL-l NPY1R-t sisaldaval BBV-de emalahusel lasti sulada ning lahjendati modifitseeritud Krebs-Ringeri katsepuhvriga 300-500 µL-ni. Katsepuhver (pH = 7,4) sisaldas: 20 mM Na-Hepes (Amresco), 1 mM CaCl<sub>2</sub> (AppliChem), 135mM NaCl (AppliChem) ja 0.1% Pluronic F-127 (Invitrogen) Ekstruuderi sisse asetati 0,4 µm suuruse pooriavaga polükarbonaatmembraan (Whatman), mis oli omakorda kahe eelniisutatud toetusfiltri (Avanti) vahel. Viiruste lahus võeti gaasikindlasse 1 mL-sse süstlasse (Hamilton) ja kinnitati ekstruuderi ühte otsa. Teise otsa kinnitati puhas samasugune süstal. Kasutades mõlemat süstalt, suruti lahus läbi ekstruuderi 11 korda.

## 2.4 Fluorestsentsanisotroopia katsed

NPY1R spetsiifiliste fluorestsentsligandide TAMRA-MC026 (sünteesitud Max Kelleri poolt Regensburgi Ülikoolis) ja Cy5-CM139 (sünteesitud Christoph Muelleri poolt Regensburgi Ülikoolis) ning märgistamata madalamolekulaarse ligandi BIBP3226 emalahuseid DMSO-s säilitati -20 °C juures ja katsepäeval lahjendati soovitud kontsentratsioonini Krebs-Ringeri katsepuhvriga. Kõik fluorestsentsanisotroopia (FA) mõõtmised sooritati, kasutades musti 96-süvendiga NBS mikroplaate (Corning Prod. Nr. 3993), millel on täheldatud madalat autofluorestsentsi ja ligandide adsorptsiooni plastiku külge.

Mõõtmiseks kasutati SynergyNeo (BioTek) plaadilugejat optilise mooduliga, mis sisaldas polarisaatoriga ergastusfiltreid 530 (pilulaius 25 nm) või 620 nm (pilulaius 40 nm) lainepikkuse juures ja emissioonifiltreid 590 (pilulaius 35 nm) või 680 nm (pilulaius 30 nm) juures. MC026 ligandi puhul kasutati filtrite paari 530/590 ja CM139 puhul filtrite paari 620/680. Mõõtmised viidi läbi kineetilises režiimis 100 µL-is lahuses 27 °C juures. Plaadilugeja mõõtis ergastustasandile nii paralleelset ( $I_{\parallel}$ ) kui ristipidist ( $I_{\perp}$ ) fluorestsentsi intensiivsust.

Mittespetsiifilise seostumise tase mõõdeti 3 µM BIBP3226 (Lisa 3) juuresolekul. Intensiivsuseid korrigeeriti, arvestades ainult BBV-sid sisaldavast lahusest pärinevat

autofluorestsentsi. Ligandi sidumisomaduste määramiseks varieeriti lisatavate BBV-de kogust. TAMRA-MC026-ga tehtud katsetes oli lisatud fluorestsentsligandi lõppkontsentratsioon süvendis 0,0625 või 0,25 nM ning Cy5-CM139-ga oli lõppkontsentratsioon süvendis 0,22 või 0,89 nM. Süvenditesse lisati ka 100 nM kontsentratsiooniga neutravidini (Thermo Fisher) ja biotiin-PEG-kolesterooli (Nanocs).

## **2.5 TIRF-mikroskoopia**

### **2.5.1 Mikroskoop**

Kõik mikroskoopiakatsed viidi läbi, kasutades TIRF mikroskoopi (iMic, Till Photonics GmbH), mis oli ühenduses H101 motoriseeritud platvormiga (Prior). Objektiiviks oli 60x APON TIRF õliobjektiiv (Olympus), mille apertuurarv on 1,49. mCherry fluorestsentsmärgise ergastamiseks kasutati 561 nm DPSS (ingl. k. *diode-pumped solid-state*) laserit Cobolt Jive (Cobolt). Laseri valgus suunati T570LP dikromaatselt peeglilt peegeldades objektiivile ja tagasitulev valgus filtreeriti läbi ET 620 filtri. TAMRA fluorestsentsmärgise ergastamiseks kasutati 515 nm PhoxX laserit (Omicron). Laseri valgus suunati Zt 532rdcxt (Chroma) dikromaatselt peeglilt peegeldades objektiivile ja tagasitulev valgus filtreeriti läbi ET 605 (Chroma). Cy5 fluorestsentsmärgise ergastamiseks kasutati 638 nm PhoxX laserit (Omicron). Laseri valgus suunati Zt 532/640rpc (Chroma) dikromaatselt peeglilt peegeldades objektiivile ja tagasitulev valgus filtreeriti läbi EM 577/690 filtri (Semrock). Kõigi filtrite paksused olid 2 mm. Laskerkiire nurka varieeriti Yanus II skaneerimisseade ja polütroobi abil. Objektiivilt tagasitulev filtreeritud kiirus läbis TuCam adapteri (Andor), mis andis 2X lisasuurenduse ja detekteeriti kasutades iXON Ultra 897 EMCCD kaamerat (Andor).

### **2.5.2 Läbivoolu süsteem**

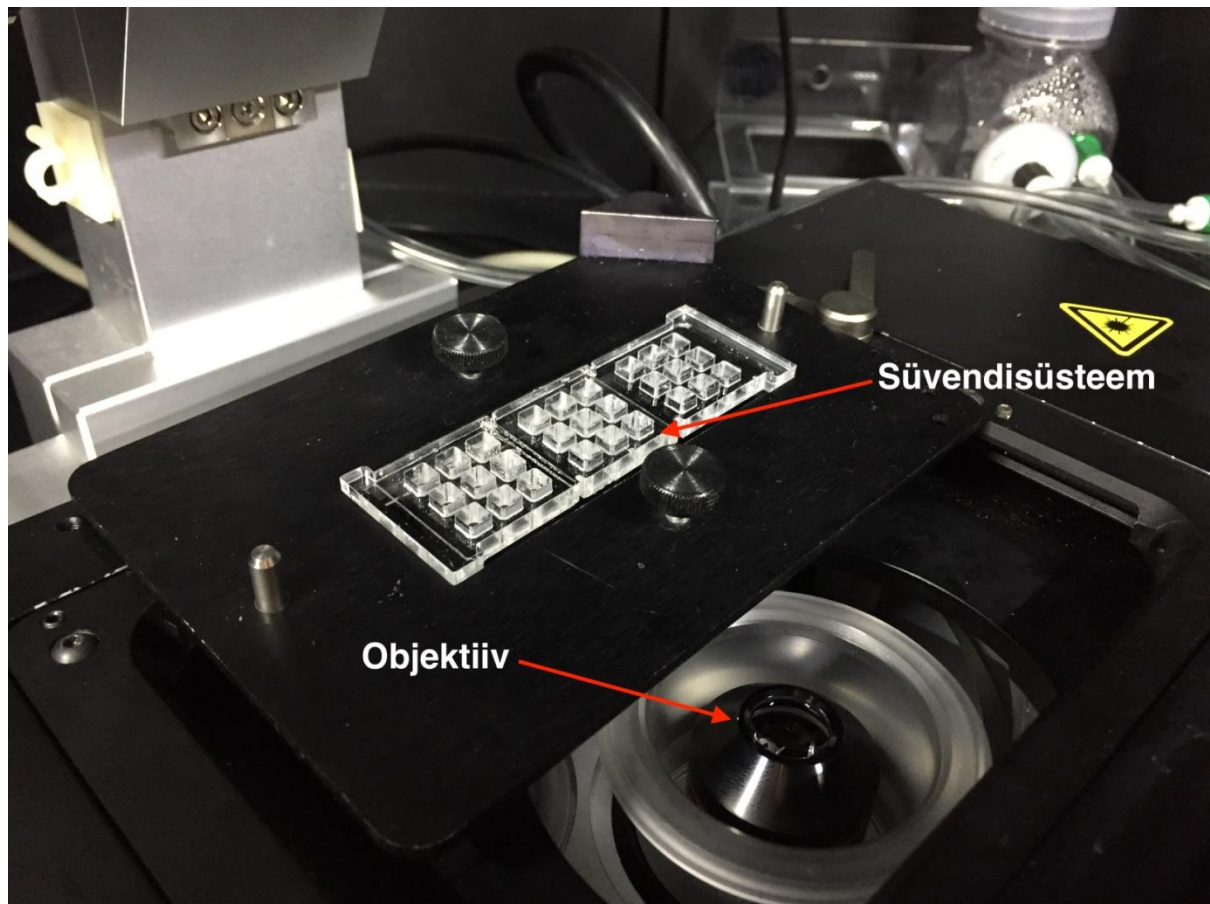
Reaktsioonide jälgimiseks reaaliajas kasutati TIRFM proovikambrina läbivoolusüsteemi CF-T (Chamlide). Süsteem koosnes metallist hoidjast, kuhu asetati kaks 12 mm diameetriga eelnevalt funktsionaliseeritud klaasi ning hoidjaga ühendatud voolikutest. Voolikud olid ühendatud rõhukontrolleriga OB1 (Elveflow) ja kanalite jagajaga MUX (Elveflow), mida sai kontrollida peaarvutist.

Reaktsioonilahused valmistati Dulbecco fosfaatpuhverdatud soolalahuses (DPBS) (Naxo). Valmistati kaks reaktsioonilahust, mille üks lahus koosnes 10 nM neutravidiinist, 10 nM biotiin-PEG-kolesteroolist ja 14x lahjenduskordsusega FZD<sub>6</sub>-mCherry retseptoriga BBV-de emalahusest ja teine lahus 10nM neutravidiinist ja 14x lahjenduskordsusega FZD<sub>6</sub>-mCherry retseptoriga BBV-de emalahusest. Rõhul 8 mbar toodi ühe vooliku kaudu biotiin-PEG-kolesterooli sisaldavat reaktsioonilahust klaasidele ning teise kaudu väljus lahus jääkidesse. Pinda ergastati 561 nm laseriga ja tehti juhuslikult valitud piirkondadest pilte. Klaasid vahetati värskete vastu ning rõhul 8 mbar toodi ilma biotiin-PEG-kolesterooliga reaktsioonilahust klaasidele. Pinda ergastati 561 nm laseriga ja tehti juhuslikult valitud piirkondadest pilte

### **2.5.3 Fikseeritud süvenditega süsteem**

NPY1R-t sisaldavate BBV-de uurimiseks kasutati fikseeritud süvenditega katseplaati. Süsteem koosnes polümetüülmetakrülaadist (PMMA) raamist, mille külge, kasutades spetsiaalset kahepoolset teipi (3M), kinnitati 22x22 mm funktsionaliseeritud klaas. Raam lõigati sobivaks laserlõikuse teel (Eccom). Üks klaas hõlmas 9 süvendit ning ühele raamile mahtus 3 klaasi (Joonis 5).

Enne klaasi kinnitamist puhastati raami 10 minutit metanoolis ja sonikeeriti 1 minut ultrahelivannis (WiseClean). Tekitatud süvenditesse lisati 30 µL igat BBV-de seerialahjendust (Peatükk 2.4), kus oli fikseeritud kontsentratsiooniga fluorestsentsligand ja BIBP3226 või ainult fluorestsentsligand. Lahuseid inkubeeriti klaasidel pimedas 27 °C juures 1 h. Pinnale seostunud osakesed määrati TIRF mikroskoobiga



Joonis 5. 27-süvendiline funktsionaliseeritud klaaspindadega katseplaat TIRFM katsete jaoks.

## 2.6 Tarkvara ja andmeanalüüs

FA tulemuste haldamiseks ja konverteerimiseks kasutati Apareciumit (Laasfeld 2019) ning andmete statistiliseks analüüsiks ja graafiliseks esitamiseks kasutati programmi GraphPad Prism 5.04 (GraphPad Software Inc.). Saadud andmed töödeldi vastavalt FA sidumiskatsete jaoks välja töötatud globaalsele analüüsimeetodikale, mis on meie töörühmas varasemalt publitseeritud (Veiksina *et al.* 2014)

Mikroskoopia tulemused analüüsiti kasutades vabavarana kasutatavat PointSourceDetection algoritmi (Aguet *et al.* 2013). Algoritmi töö koosneb kahest osast: 1) kõigepealt filtreerib algoritm pildil olevate pikslite intensiivsuste põhjal välja kõige intensiivsemad piirkonnad ja müra jäetakse välja 2) leitud piirkondade lokaalsete intensiivsuste väärtuste põhjal leiab algoritm pildil olevate fluorestseerivate täppide paiknemise ja arvu. Mikroskoopia piltidelt

leiti keskmised fluorestseeruvate täppide arvud, mille põhjal konstrueeriti sidumiskõverad. Saadud kõveraid analüüsiti esimest järku reaktsioonile vastava sidumise hüperbooli võrrandiga.

Lisaks kasutati piltide analüüsiks vabavara programmi ImageJ ning andmete statistiliseks analüüsiks ja graafiliseks esitamiseks kasutati programme GraphPad Prism 5.04 ja ImageJ.

## **3 TULEMUSED JA ARUTELU**

### **3.1 Funktsionaliseeritud pindade kvaliteet**

Käesoleva magistritöö raames töötati välja funktsionaliseeritud klaaspinnad, TIRFM katsete jaoks, mida saab kasutada nii läbivoolu süsteemis kui ka mitme süvendiga katseplaadis. Kvaliteetne pinnatöötlus tagab katse jaoks vajaliku sidumismahtuvuse ja pinnale spetsiifilise sidumise.

#### **3.1.1 Klaaside pinnakeemia kontrollimine**

Klaaspinna pegüleerimise tulemusena oli biotiinotsaga ja metoksüotsaga PEG-ide suhe 1:50. Selline vahekord annab funktsionaalsete rühmade optimaalse tiheduse. Metoksürühmade ülekaal on vajalik, et klaasi pind oleks passiviseeritud ning seega mittespetsiifiliste interaktsioonide osakaal minimaliseeritud (Rasnik *et al.* 2005).

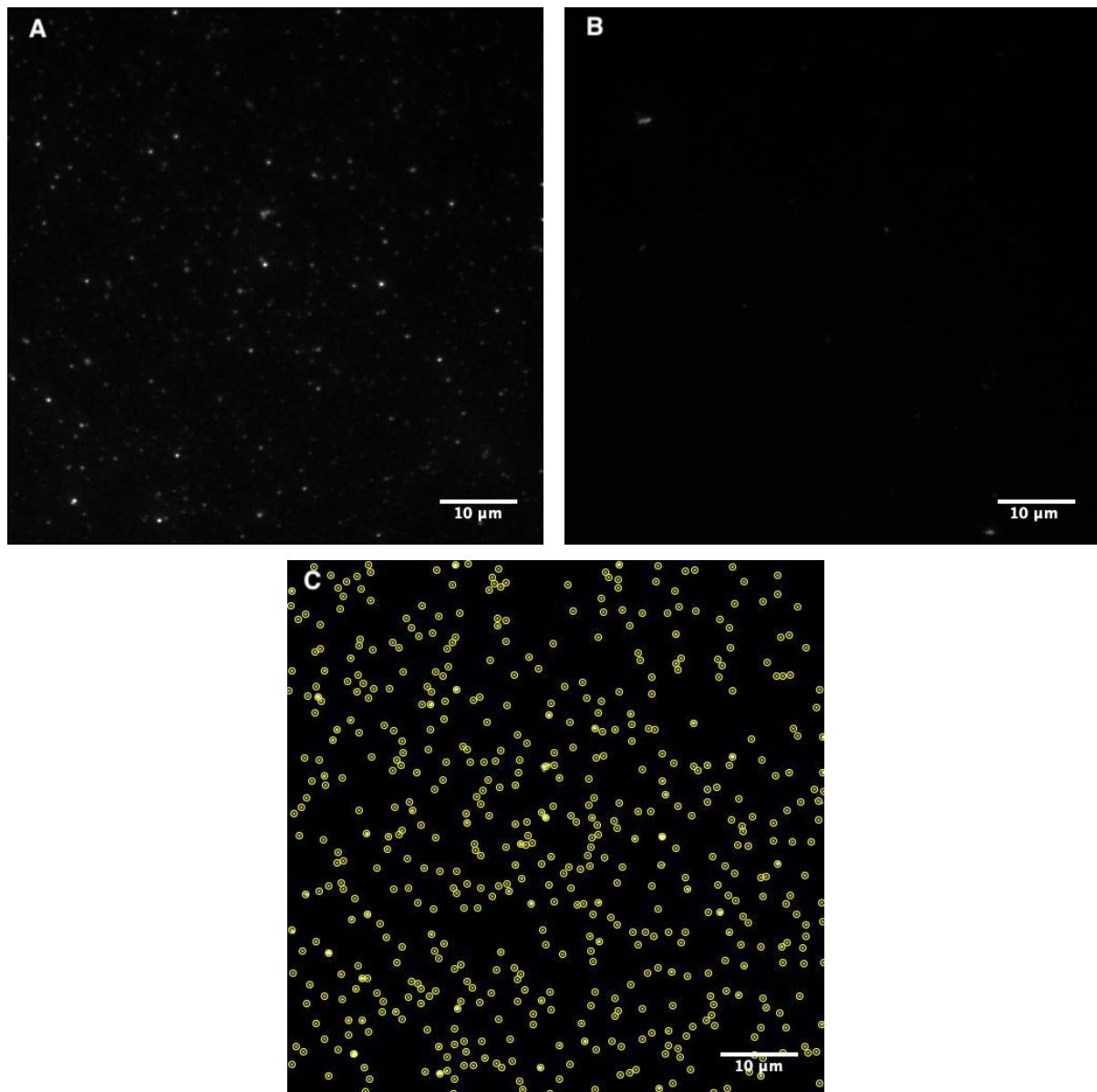
Töö raames kasutatud klaaside funktsionaliseerimise protokoll, mis sisaldab silaanimise ja pegüleerimise etappe, on juba varasemalt välja töötatud ja pinnatöötuse kvaliteedi kirjeldamine publitseeritud Kairi Tõnsau magistritöös (Tõnsau, 2014). Seetõttu oli võimalik pinnatöötuse kvaliteedi kirjeldamine antud töös vahele jätta. K. Tõnsau töös kontrolliti biotiini spetsiifilist sidumist streptavidiiniga, mille küljes oli fluorestseeruv fukoerütriin. Lisades lahusele märgistamata neutravidiini kasvavas kontsentratsioonis, oli võimalik näha, kuidas fluorestseeruvate täppide arv langes ~ 950-lt nulli lähedale.

#### **3.1.2 BBV-de sidumine pinnale läbi biotiin-PEG-kolesterooli**

BBV-de puhul on teada, et nende pungumisel peremeesrakust ümbritsevad nad ennast peremeesraku plasmamembraaniga (Veiksina *et al.* 2014). On täheldatud, et vesilahuses võib kolesterooli molekul lipiidse kaksikkihi hüdrofoobsesse keskkonda liikuda (Peatükk 1.4). Seda teadmist arvesse võttes, viidi BBV-de lahusesse biotiin-PEG-kolesterooli, mille kolesterooli osa võib ühineda BBV membraaniga jättes selle pinnale vaba biotiini. Märgistatud osakesed seoti pinnale üle neutravidiini silla, mis lisati reaktsioonisegule ja mis võib siduda kuni 4 biotiini molekuli. BBV-de pinnale olid ekspresseeritud FZD<sub>6</sub> retseptorid mCherry

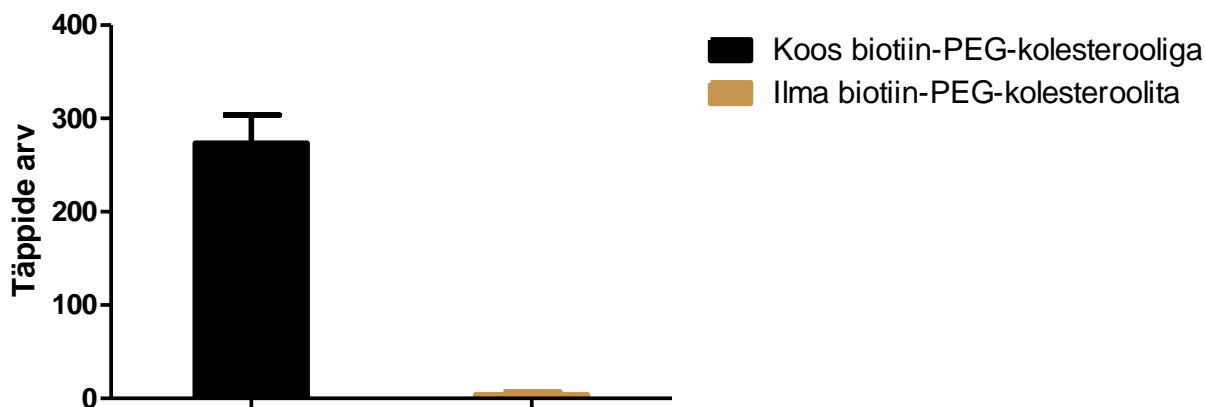


fluorestsentsmärgisega C-terminaalses otsas. Seega biotiin-PEG-kolesterooli mõju oli võimalik hinnata TIRFM abil (Joonis 6).



**Joonis 6. Pinnaga seostunud BBV-de visualiseerimine ja registreerimine.** Pinnale lisati läbivoolu süsteemi kasutades (A) 10 nM neutravidiin + 10 nM biotiin-PEG-kolesterool + 14x lahjenduskordsusega BBV-de emalahus (B) 10 nM neutravidiin + 14x lahjenduskordsusega BBV-de emalahus (C) Algoritmi poolt detekteeritud täpid pildil A, mis on märgitud kollaste ringidega.

Kui BBV-sid inkubeeriti koos biotiin-PEG-kolesterooliga, registreeriti pinnale seostunud viirusosakesi ~ 70 korda rohkem, kui ilma kolesterooli sisaldava molekulita (Joonis 7).



**Joonis 7. Pinnaga seostunud BBV-de arv sõltuvalt biotiin-PEG-kolesterooli olemasolust.**

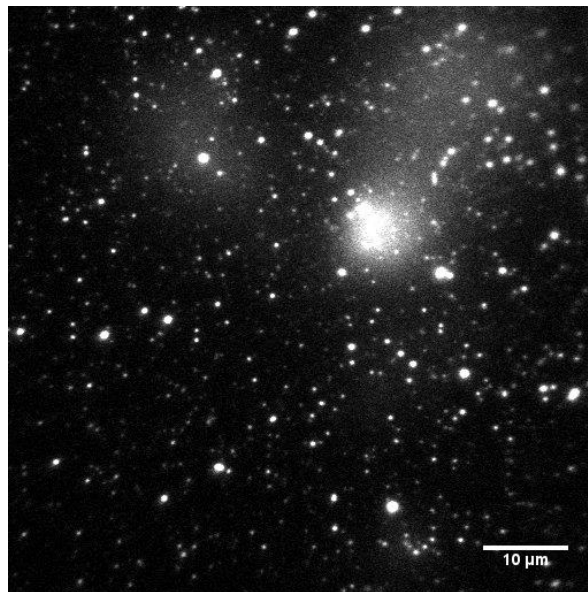
Tulpadele vastavad fluorestseerivate täppide arvud koos standardhälbega vasakult paremale –  $273 \pm 30$ ;  $4 \pm 3$

See näitab, et läbi biotiin-PEG-kolesterooli toimub väga spetsiifiline BBV-de kinnitamine pinnale. Lisaks võib sellest järeldada, et klaaside eelnev töötlus ja passiveerimine on olnud edukas. Kuna katse sooritati läbivoolu süsteemi kasutades, siis uuriti ka, kuidas mõjub BBV-de kinnitumisele süsteemi puhvriga voolutamine. Isegi suurtel rõhkudel kuni 1000 mbar-i fluorestseerivate täppide arv märgatavalt ei kahanenud (andmeid ei ole esitatud). See annab võimaluse pesta lahusesse lisatud ligande välja ilma BBV-sid häirimata.

### 3.2 BBV-de agregatsioon ja selle vähendamine

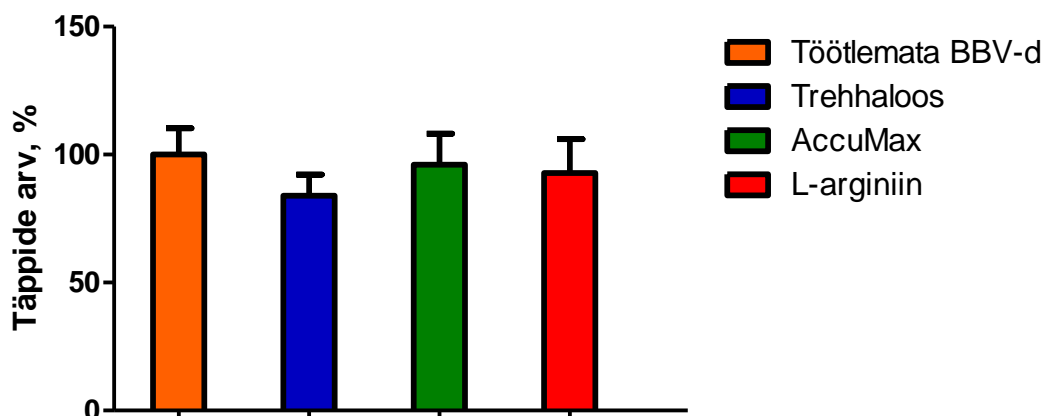
Olles veendunud funktsionaliseeritud klaaside kvaliteedis, kasutades FZD<sub>6</sub> fluorestsentsmärgisega retseptoreid, sooviti järgmisena uurida meetodi võimekust iseloomustada pinnale kinnitatud BBV-de ja fluorestsentsligandi vahelisi interaktsioone. Hea võimaluse annavad selleks NPY1R-d, millele on saadaval kõrge afiinsusega fluorestsentsligandid. Eelkatsetes selgus, et BBV-d mida on hoitud pikka aega -80°C juures on tihti agregeerunud ja annavad mittehomogeense mikroskoopia pildi. On täheldatud, et emalahuste madalatelt temperatuuridelt üles soojendamisel ja kui viiruspreparaadid on üsna kontsentreeritud, võivad moodustuda mitmest viirusosakesest koosnevad agregaadid (Jorio *et al.* 2006; Gerba and Betancourt 2017). Viirusosakeste agregeerumine võib viia erinevate probleemideni, näiteks suured viiruste agregaadid ei kinnitu korralikult pinnale või kinnituvad

küll pinnale, aga nende detekteerimine ja loendamine on häiritud üleküllastunud fluorestsentsi signaalist, mida nad tekitavad. Seda täheldati ka antud töö raames (Joonis 8).



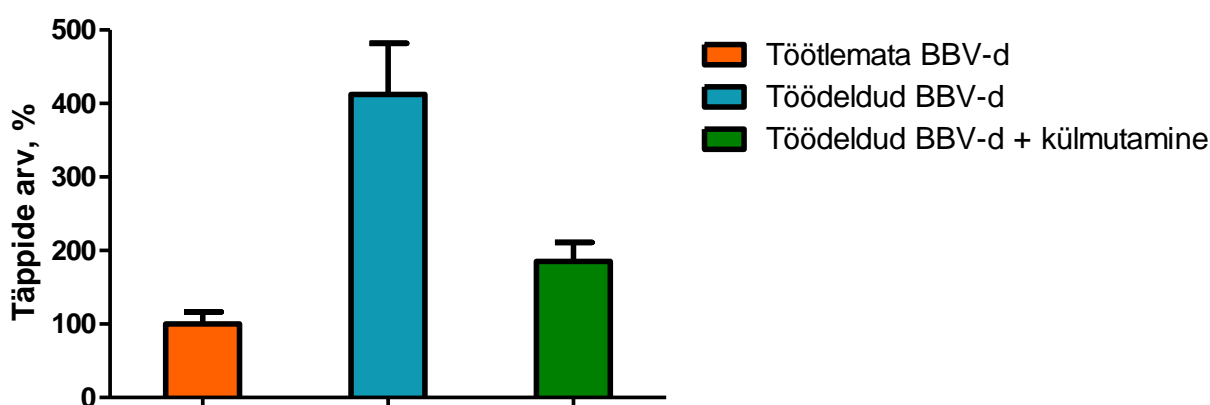
**Joonis 8.** NPY1R-ga BBV-de ja TAMRA-MC026 kompleksi seostumine pinnale. 125x lahjenduskordsusega töötlemata BBV-de emalahusele lisati 1 nM TAMRA-MC026 fluorestsentsligandi.

Et saavutada homogeenne BBV-de preparaat, üritati üles sulatatud emalahuseid mõjutada nii keemiliselt kui mehaaniliselt. Teatud ainete puhul nagu trehaloos ja L-arginiin on viirusosakeste agregatsiooni vastast toimet eelnevalt täheldatud (Bosch *et al.* 2016; Lange and Rudolph 2009). Lisaks trehaloosile ja L-arginiinile prooviti agregate vähendada kommertsiaalselt saadaval oleva agregeerumise vastase reagentiga AccuMax. Agregaatide vähenemist on võimalik registreerida fluorestseeruvate täppide arvu suurenemisega. Tulemustest selgus, et erinevate reagentidega keemiline töötlus soovitud efekti ei andnud (Joonis 9). Täppide arvud jäid samasse suurusjärku, kui töötlemata kontroll-proovil.



Joonis 9. Reagentidega töötlemise mõju fluorestseerivate täppide arvule. Andmed on normaliseeritud töötlemata BBV-dest tuleneva täppide arvu suhtes ja toodud on süvenditest tehtud piltide (n = 10) keskmistatud tulemused  $\pm$  SD.

Teise sammuna agregatsiooni vähendamiseks, prooviti viirusepreparaatide mehaanilist töötlemist, kasutades ekstruuderit (ingl. k *extruder*). Tavapärase filtreerimise puhul eraldatakse pooriavast suuremad komponendid filtrile, kuid ekstrusiooni puhul surutakse rõhuga kõik komponendid pooridest läbi. Kuna on teada, et bakuloviiruste kapsiidi pikkus on umbes 250 nm ja diameeter 40-50 nm (Harrap 1972), siis oli võimalik kasutada 0,4  $\mu$ m poori suurusega polükarbonaatmembraani, et viiruste agregaadid mehaaniliselt lahutada. Mehaaniline töötlemine osutus väga edukaks, sest võrreldes töötlemata BBV-dega toimus peaaegu 4x täppide arvu kasv (Joonis 10).



Joonis 10. Mehaanilise töötlemise mõju fluorestseerivate täppide arvule. Andmed on normaliseeritud töötlemata BBV-dest tuleneva täppide arvu suhtes ja toodud on süvenditest tehtud piltide (n = 10) keskmistatud tulemused  $\pm$  SD.

Töödeldud BBV-de proovist võeti alikvoot ning säilitati -80 °C juures nädala aega ning analüüsiti täppide arv. Täppide arv oli nädalaga rohkem kui 2x langenud (Joonis 10). Tulemustest saab järeldada, et isegi kui mehaaniline töötlemine vähendab oluliselt BBV-de agregatsiooni, siis kui proov taaskülmutada, toimub uus agregaatide teke. Seega edaspidi sooritati enne igat katset BBV-dele ekstrusioon.

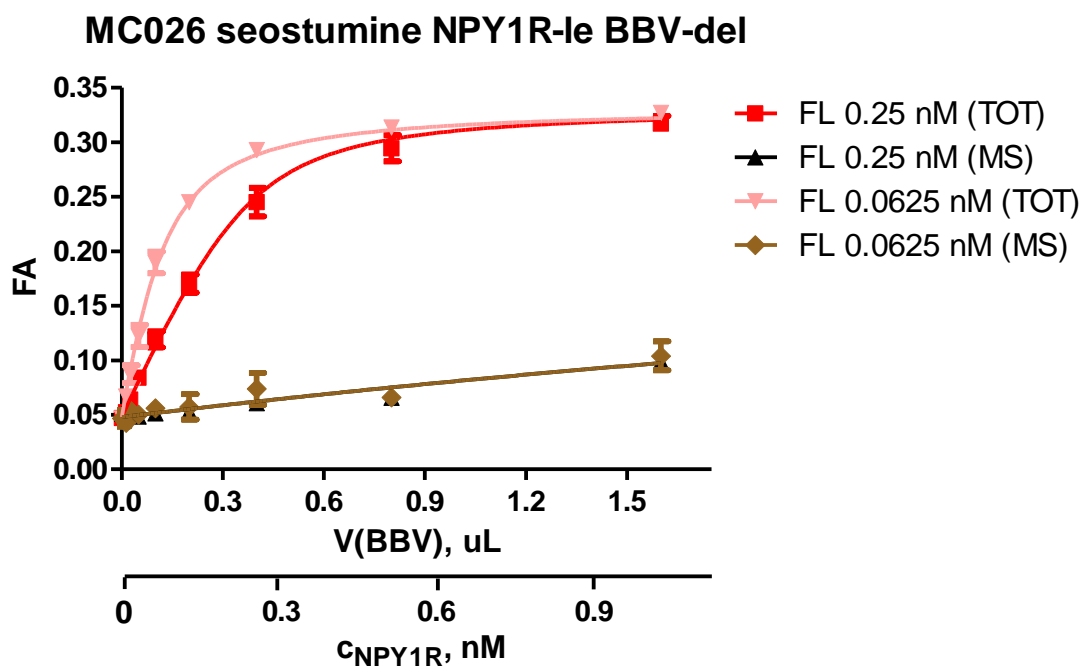
### **3.3 TIRFM-l põhineva sidumismeetodi testimine**

#### **3.3.1 Fluorestsentsligandi MC026 seostumise uurimine FA abil**

Selleks, et TIRFM-l põhineva meetodi toimimist oleks võimalik hinnata, sooritati ligandi sidumiskatsed kõigepealt valideeritud FA meetodiga. Esmalt uuriti Regensburgi Ülikoolis sünteesitud TAMRA fluorestsentsmärgisega MC026-e seostumist BBV-de pinnal olevate NPY1R-tega. MC026-e puhul on teada, et selle farmakofoorne osa omab NPY1R-le antagonistliku mõju. See tähendab, et ligandi seostumine sidumistaskusse, ei põhjusta retseptori aktivatsiooni.

FA meetodiga sooviti hinnata retseptorite ekspresioonitaset BBV-de preparaadis ning leida sidumise afiinsuskonstant, mida saaks TIRFM meetodiga võrrelda. Selleks tiitriti MC026-te BBV-de erinevate kontsentratsioonidega nii märgistamata madalamolekulaarse NPY1R-i antagonistiga BIBP3226 juuresolekul kui puudumisel ja mõõdeti FA intensiivsused (Joonis 11)

Katseandmete globaalsel analüüsil arvutati  $K_d$  väärtuseks  $39 \pm 10$  pM. Leitud afiinsus näitab, et MC026 seostub NPY1R-le väga tugevalt. Lisaks leiti retseptorite kontsentratsioon viiruse emalahuses, mida oli võimalik TIRFM meetodi analüüsil rakendada. Tulemused langesid hästi kokku Dr. Kadri Ligi poolt varasemalt sooritatud sidumiskatsetega, mis olid tehtud sama ligand-retseptor süsteemiga. Tema katsetes saadi  $K_d$  väärtuseks  $32 \pm 10$  pM. Peale selle iseloomustas ta MC026-e spetsiifilisust NPY1R-le. Nii melanokortiin-4 kui ka FZD<sub>6</sub> retseptoreid sisaldavate BBV-de preparaatide puhul MC026 spetsiifilist seostumist ei fikseeritud (andmeid pole esitatud).

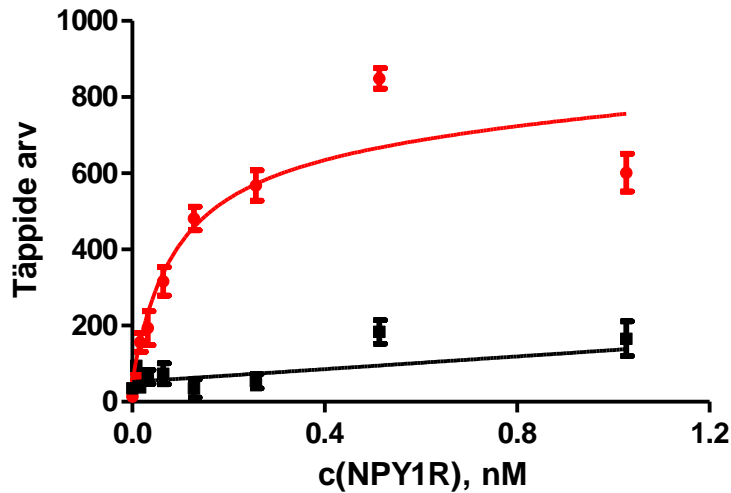


**Joonis 11.** 0,25 nM ja 0,0625 nM MC026 seostumisele vastava FA signaali sõltuvus NPY1R-i kontsentratsioonist. Toodud on totaalsele (TOT) ja mittespetsiifilisele (MS) sidumisele vastavad kõverad. Katseandmetest leiti  $K_d$ , mille väärtuseks arvutati  $39 \pm 10$  pM. Kõverate kaudu leiti ka kasutatud viiruse emalahuse retseptorite kontsentratsioon, milleks oli  $64 \pm 5$  nM. Joonisel on kahe sõltumatu katse keskmised tulemused  $\pm$  SEM.

### 3.3.2 Fluorestsentsligandi MC026 seostumise uurimine TIRFM abil

Ühendades BBV-sid kinnitavad pinnad ning TIRFM, oli võimalik luua alternatiivne ligandi sidumist iseloomustav meetod. Meetodika eripära seisneb õhukese pinnakihi kõrge resolutsiooniga visualiseerimises. Valguse totaalse sisepeegeldumise tulemusena tekki sumblaine ergastab pinnast kuni  $\sim 200$  nm kaugusel paiknevad fluorofoorid. Selle tõttu on võimalik optiliselt filtreerida retseptoriga seostunud ja lahuses paiknevad seostumata fluorestsentsligandid. Kuna ergastatakse ainult pinna lähedased fluorofoorid, siis ei pea ligandi kontsentratsioon retseptoriga samas suurusjärgus olema, mis on, näiteks FA meetodi toimimise üks eeldusi.

MC026-le lisati erineva kontsentratsiooniga BBV-de preparaati nii BIBP3226 juuresolekul kui puudumisel ning registreeriti pinnale tekkinud fluorestseerivate täppide arvud (Joonis 12). Teades retseptorite kontsentratsiooni emalahuses, oli võimalik välja arvutada ka retseptorite kontsentratsioon kindlas süvendis.



**Joonis 12.** 0,25 nM MC026 seostumisele vastavate fluorestseerivate täppide arvu sõltuvus NPY1R-i kontsentratsioonist. Toodud on totaalsele (●) ja mittespetsiifilisele seostumisele (■) vastavad kõverad. Süvenditest tehti kindel arv pilte ( $n = 10$ ) ja leiti keskmine fluorestseerivate täppide arv  $\pm$  SEM. Punktide põhjal konstrueeriti sidumiskõverad, mille alusel arvatati  $K_d^{näiline} = 90 \pm 40$  pM.

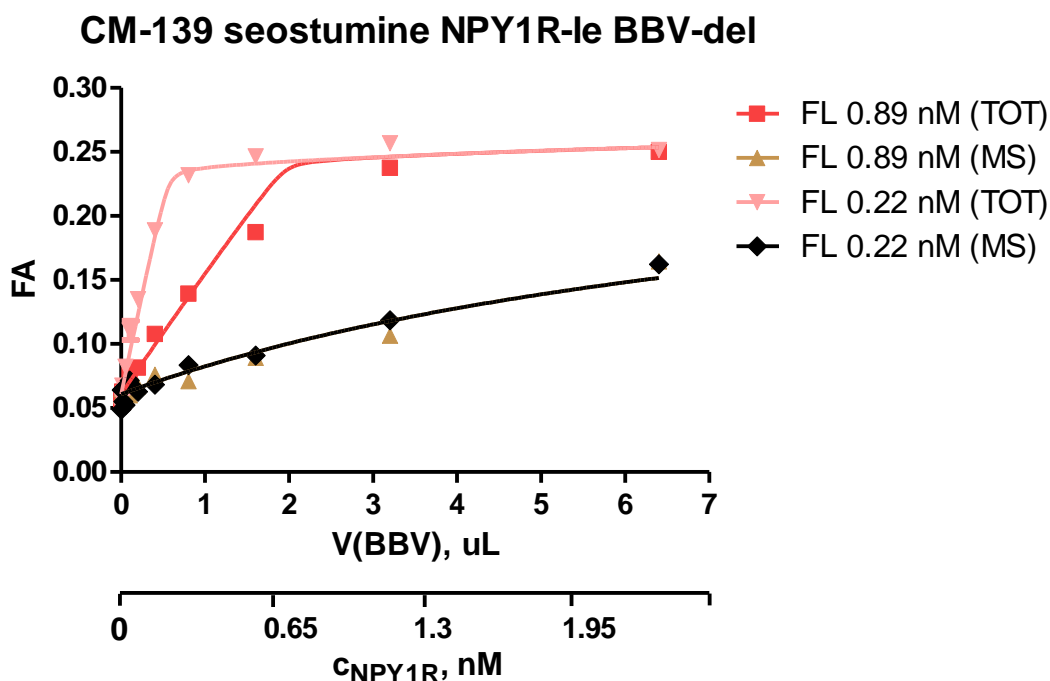
Inkubeerides pinda suureneva BBV-de kontsentratsiooniga, suurenes ka fluorestseerivate täppide arv. Süvendites, kuhu oli lisatud nii märgistamata ligandi kui MC026-te, toimus täppide arvu lineaarne tõus. Süvendites, kuhu oli lisatud ainult MC026-te, toimus esialgu järsk täppide arvu tõus, mis saavutas platoo. Seega oli katsetulemusi võimalik analüüsida spetsiifilisele sidumisele vastava hüperbooli võrrandiga. Võrrand eeldab, et tegemist on homogeenselt jaotunud molekulidega 3D-süsteemiga, kus reaktsiooni käigus toimuvat vaba ligandi kontsentratsiooni kahanemist (ingl. k *depletion*) pole vaja arvesse võtta. Lisaks eeldab võrrand, et kõigile retseptoritele sidumine on ühesugune protsess.

Sidumiskõverate analüüsil leiti  $K_d^{näiline} = 90 \pm 40$  pM. Näiline on konstant seetõttu, et TIRFM meetodi puhul kõik eelnevalt loetletud eeldused täielikult täidetud pole. See peegeldub ka kerges erinevuses FA meetodiga leitud afiinsusega ( $39 \pm 10$  pM). Sellegipoolest on TIRFM meetodi abil leitud  $K_d^{näiline}$  väga madal ehk mõlema meetodi tulemused näitavad, et MC026 seostub NPY1R-le väga tugevalt. Katsetulemuste täpsemaks analüüsiks on tulevikus plaanis andmeid analüüsida algoritmiga, mis võtab arvesse ka fluorestsentsi intensiivsuste jaotust erinevate täppide vahel, sest BBV-des on retseptorid üldiselt üle ekspresseeritud ehk ühele

fluorestseeruvale täpile võib reaalselt vastata mitmeid retseptoreid. Niiviisi on võimalik välja arvutada ka reaalne retseptorite arv, mis ühele konkreetsele täpile vastab. Retseptorite arvu teades, saab modelleerida sidumismudeli, mis antud süsteemi kõige paremini kirjeldab

### 3.3.3 Fluorestsentsligandi CM139 seostumise uurimine FA abil

Lisaks MC026-le uuriti ka Regensburgi Ülikoolis sünteesitud Cy5 fluorestsentsmärgisega CM139 seostumist BBV-de pinnal olevate NPY1R-tega. Ligandide farmakofoorid on küll samasugused, kuid fluorofoorid on erinevate omadustega. Võrreldes TAMRA märgisega, on Cy5 ergastusmaksimum kõrgema lainepikkuse juures. Lisaks on Cy5 puhul teada, et fluorofooril on väga lühike fluorestsentsi eluiga  $\sim 1$  ns (Yu *et al.* 2009). Lühikese eluea tõttu eeldati, et vastavat ligandi pole FA mõõtmistega võimalik iseloomustada, sest fluorofoori dipool ei jõua piisavalt roteeruda selle aja jooksul. Selle kontrollimiseks sooritati CM139-ga tiitrimine erinevate BBV-de kontsentratsioonidega (Joonis 13).



**Joonis 13.** 0,22 nM ja 0,89 nM CM139 seostumisele vastava FA signaali sõltuvus NPY1R-i kontsentratsioonist. Toodud on totaalsele (TOT) ja mittespetsiifilisele (MS) sidumisele vastavad kõverad. Katseandmetest leiti  $K_d$ , mille väärtuseks arvutati  $2 \pm 5$  pM. Kõverate kaudu leiti ka kasutatud viiruse emalahuse retseptorite kontsentratsioon, milleks oli  $37 \pm 2$  nM. Joonisel on duplikaatide keskmised tulemused  $\pm$  SEM.

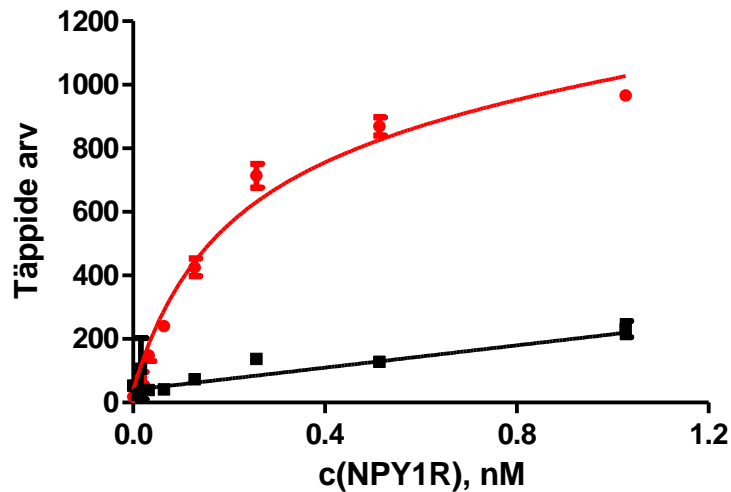


Tulemustest selgus, et totaalse ja mittespetsiifilise sidumise suhe on tunduvalt väiksem, kui MC026 puhul, kuid piisav, et sidumise spetsiifilisust eristada. Seega tekib küsimus, et kuidas nii madala fluorestsentsi elueaga fluorofoori puhul see võimalik on. Üks võimalik seletus on, et ligandi sünteesil, kui liidetakse farmakofoori külge fluorofoor, muutuvad kompleksi fotofüüsikalised omadused ja eluaeg näiteks pikeneb. Andmete globaalsel analüüsil arvatati  $K_d$  väärtuseks  $2 \pm 5$  pM. Selline mitteusaldusväärne väärtus vihjab probleemidele määramise meetodikas või süsteemi mõjutab mingi faktor, mida kasutatud analüüsil pole sisse arvestatud. Kuna ligandide puhul on erinevuseks fluorofoori struktuur, siis võib üheks selliseks faktoriks olla muutused fluorofoori kvantsaagises (Sun *et al.* 2009). CM139 sidumisel toimub tõenäoliselt kvantsaagise muutus, mis kajastub TFI muutusena totaalse ja mittespetsiifilise sidumise vahel (Lisa 1). Mudel millega MC026-te analüüsiti kvantsaagise muutuseid arvesse ei võta ja MC026 puhul polnudki seda vaja, sest olulist TFI muutust ei toimunud (Lisa 2). Seega saadud  $K_d$  väärtus ei pruugi kirjeldada ligandi afiinsust korrektselt ning andmeid tuleks uuesti analüüsida juba keerulisema mudeliga, mis võtab arvesse ka kvantsaagise muutust.

### **3.3.4 Fluorestsentsligandi CM139 seostumise uurimine TIRFM abil**

Pärast CM139 seostumise uurimist FA meetodiga, analüüsiti ligandi ja NPY1R-te sidumist TIRFM sidumismeetodiga. CM139-le lisati erineva kontsentratsiooniga BBV-de preparaati nii märgistamata antagonistiga BIBP3226 juuresolekul kui puudumisel ning registreeriti pinnale tekkinud fluorestseerivate täppide arvud (Joonis 12). Retseptorite kontsentratsioon süvendis arvatati välja MC026-e FA mõõtmistest leitud BBV-de emalahuses olevate retseptorite kontsentratsiooni (64 nM) põhjal.

Sarnaselt MC026-e sidumiskatsega, inkubeerides pinda suureneva BBV-de kontsentratsiooniga, suurenes ka fluorestseerivate täppide arv. Süvendites, kuhu oli lisatud nii märgistamata ligandi kui MC026-te, toimus täppide arvu lineaarne tõus. Süvendites, kuhu oli lisatud ainult MC026-te, toimus esialgu järsk täppide arvu tõus, mis jõudis platoole.



**Joonis 14.** 0,89 nM CM139 seostumisele vastavate fluorestseerivate täppide arvu sõltuvus NPY1R-i kontsentratsioonist. Toodud on totaalsele (●) ja mittespetsiifilisele seostumisele (■) vastavad kõverad. Süvenditest tehti kindel arv pilte ( $n = 10$ ) ja leiti keskmine fluorestseerivate täppide arv  $\pm$  SEM. Punktide põhjal konstrueeriti sidumiskõverad, mille alusel arvutati  $K_d^{\text{näiline}} = 195 \pm 47$  pM.

Katseandmete analüüsil spetsiifilise sidumise hüperbooli võrrandiga, leiti  $K_d^{\text{näiline}} = 195 \pm 47$  pM. Leitud näiline afiinsus on küllaltki sarnane MC026-ga leitud näilise afiinsusega ( $90 \pm 40$  pM). See võib viidata sellele, et kahe fluorestsentsligandi reaalsed afiinsused on tegelikult küllaltki sarnased ja CM139 analüüs FA-ga hetkeseisuga omab kitsaskohti, mida TIRFM meetodiga on võimalik vältida. Sellegipoolest ei tohi unustada, et täppidega saadud afiinsuskonstandid on saadud tehes analüüsil mitmeid lihtsustusi ja ei pruugi reaalse afiinsuse väärtustega päris kooskõlas olla.

Antud töö raames tõestati TIRFM põhineva sidumismeetodi printsiibi töötamist kahe erineva fluorestsentsligandi sidumisomaduste iseloomustamisel. Järgmise sammuna on plaanis andmeid analüüsida juba keerulisema algoritmiga. Peale selle on plaan proovida sama meetodit rakendada ka mõne teise retseptor-ligand süsteemi peal, et näidata meetodi universaalsust ja robustsust.

## KOKKUVÕTE

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli töötada välja meetodika, millega spetsiifiliselt klaaspinnale kinnitatud BBV-de membraanis olevate retseptorite ja ligandi vahelisi interaktsioone oleks võimalik TIRFM-ga uurida. Meetodi toimimist iseloomustati kahte uudet NPY1R-i spetsiifilist fluorestsentsmolekuli kasutades.

Teoreetilises osas avati GPCR-de tausta ning arutleti miks nende uurimine on vajalik. Lähemalt räägiti NPY1 ja FZD<sub>6</sub> retseptoritest, mida ka antud töös uuriti või kasutati. Edasi keskenduti ligandi sidumiskatsete olulisusele ning arutleti sügavamalt FA ja TIRFM printsiipe. Viimaks kirjeldati kuidas oleks võimalik biomolekule ja viiruseid TIRFM jaoks kõige parem pinnale püüda ning kuidas luua viiruseid, mille pinnale on pungunud soovitud GPCR-d.

Töö käigus valmistati funktsionaliseeritud klaaspinnad, mille pinnale on võimalik spetsiifiliselt siduda BBV-sid. Pindasid rakendati TIRFM-s. Spetsiifilist sidumist kontrolliti FZD<sub>6</sub>-te sisaldavate BBV-dega ja nähti, et läbi biotiin-PEG-kolesterooli toimub väga madala mittespetsiifikaga viiruste pinnale püüdmine. Töö jooksul lahendati ka viiruste külmutamisel tekkivate agregaatide probleem. Prooviti nii keemilist kui mehaanilist töötlemist ja kõige parema efekti andis viiruse preparaate mehaaniline ekstrusioon. Ligandi ja retseptori vahelisi interaktsioone iseloomustati uudse TIRFM meetodiga. Kasutades valideeritud FA meetodit võrdlusena, leiti, et TIRFM meetodiga on võimalik signaaliülekanne esimest etappi teatud täpsusega iseloomustada.

## SUMMARY

### **Novel method for studying ligand-receptor interactions using TIRF microscopy**

The aim of this thesis was to develop a method for studying receptor-ligand interactions, which utilizes multiwell systems with functionalized glass coverslips together with total internal reflection microscopy (TIRFM).

In the literature overview background of GPCR-s and importance to study them was opened. 2 types of GPCR-s that were also used and studied in the thesis, NPYR and FZD, were discussed in more detail. Furthermore the importance and types of ligand binding assays were addressed. Lastly, ways to immobilize viruses onto surface for TIRFM were discussed and also how to create virus preparations that have GPCR-s on their lipid bilayer.

The work led to the creation of a novel multiwell system with functionalized coverslips, which allows specific immobilization of BBV-s. Multiwell system is applicable to TIRFM. Specific immobilization was proven with FZD<sub>6</sub> containing BBV-s that were anchored to the coverslips through biotin-PEG-cholesterol. During the work, a problem with aggregation of viruses when stored in -80 °C was also solved. After developing the multiwell system and optimizing reagent concentrations, two NPY1R specific fluorescent ligands were studied with the new TIRFM method and FA method as a reference. The results provided proof that in addition to specific immobilization of viruses, the created method enables to study receptor-ligand interactions that happen on the surface of viral particles.

## KASUTATUD KIRJANDUS

- Adams, J. U & O'Connor, C. M. Essentials of Cell Biology. Cambridge; <https://www.nature.com/scitable/topicpage/cell-signaling-14047077> viimati uuendatud 17.01.2014
- Aguet F., Antonescu C. N., Mettlen M., Schmid S. L., Danuser G. (2013) Advances in analysis of low signal-to-noise images link dynamin and AP2 to the functions of an endocytic checkpoint. *Dev. Cell* **26**, 279–291.
- Antal-Zimanyi I., Bruce M. A., LeBoulluec K. L., Iben L. G., Mattson G. K., McGovern R. T., Hogan J. B., et al. (2008) Pharmacological characterization and appetite suppressive properties of BMS-193885, a novel and selective neuropeptide Y 1 receptor antagonist. *Eur. J. Pharmacol.* **590**, 224–232.
- Axelrod D. (1981) Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence. *J. Cell Biol.* **89**, 141–145.
- Axelrod D. (2003) Total internal reflection microscopy in cell biology. *Methods Enzymol.* **361**, 1–33.
- B. Gacasan S., L. Baker D., L. Parrill A. (2017) G protein-coupled receptors: the evolution of structural insight. *AIMS Biophys.* **4**, 491–527.
- Bosch S., Beaupaire L. De, Allard M., Mosser M., Heichette C., Chrétien D., Jegou D., Bach J. M. (2016) Trehalose prevents aggregation of exosomes and cryodamage. *Sci. Rep.* **6**, 1–11.
- Braun A. (2006) Biosafety in Handling Gene. *Hum. Genet.*
- Dijksterhuis J. P., Petersen J., Schulte G. (2014) WNT/Frizzled signalling: receptor-ligand selectivity with focus on FZD-G protein signalling and its physiological relevance: IUPHAR Review 3. *Br. J. Pharmacol.* **171**, 1195–209.
- Eva C., Serra M., Mele P., Panzica G. C., Oberto A. (2006) Physiology and gene regulation of the brain NPY Y1 receptor. *Front. Neuroendocrinol.* **27**, 308–339.
- Fang Y. (2012) Ligand–receptor interaction platforms and their applications for drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **7**, 969–988.
- Fish K. N. (2009) Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) Microscopy. *Curr Protoc Cytom* **Vol.22**, 273–275.
- Gerba C. P., Betancourt W. Q. (2017) Viral Aggregation: Impact on Virus Behavior in the Environment. *Environ. Sci. Technol.* **51**, 7318–7325.
- Gust A., Zander A., Gietl A., Holzmeister P., Schulz S., Lalkens B., Tinnefeld P., Grohmann D. (2014) A starting point for fluorescence-based single-molecule measurements in biomolecular research. *Molecules* **19**, 15824–15865.
- Harrap K. A. (1972) The structure of nuclear polyhedrosis viruses. II. The virus particle. *Virology*

50, 124–132.

Hertzberg R. P., Pope A. J. (2007) High-throughput screening: Update on practices and success. *J. Biomol. Screen.* **1**, 26–46.

Jabłoński A. (1898-1980) (1960) On the Notion of Emission Anisotropy. *Bull. Acad. Pol. Sci., Ser. sci. math. astr. phys.*, **8**, 259-264.

Jain A., Barve A., Zhao Z., Jin W., Cheng K. (2017) Comparison of Avidin, Neutravidin, and Streptavidin as Nanocarriers for Efficient siRNA Delivery. *Mol. Pharm.* **14**, 1517–1527.

Jain A., Liu R., Xiang Y. K., Ha T. (2012) Single-molecule pull-down for studying protein interactions. *Nat. Protoc.* **7**, 445–452.

Jameson D. M., Mocz G. (2005) Fluorescence polarization/anisotropy approaches to study protein-ligand interactions: effects of errors and uncertainties. *Methods Mol. Biol.* **305**, 301–22.

Jiang M., Bajpayee N. S. (2009) Molecular mechanisms of Go signaling. *NeuroSignals* **17**, 23–41.

Jong L. A. A. De, Uges D. R. A., Franke J. P., Bischoff R. (2005) Receptor-ligand binding assays: Technologies and applications. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **829**, 1–25.

Jorio H., Tran R., Meghrou J., Bourget L., Kamen A. (2006) Analysis of baculovirus aggregates using flow cytometry. *J. Virol. Methods* **134**, 8–14.

Kilander M. B. C., Dahlström J., Schulte G. (2014a) Assessment of Frizzled 6 membrane mobility by FRAP supports G protein coupling and reveals WNT-Frizzled selectivity. *Cell. Signal.* **26**, 1943–1949.

Kilander M. B. C., Petersen J., Andressen K. W., Ganji R. S., Levy F. O., Schuster J., Dahl N., Bryja V., Schulte G. (2014b) Disheveled regulates precoupling of heterotrimeric G proteins to Frizzled 6. *FASEB J.* **28**, 2293–2305.

Kleuss C., Raw A. S., Lee E., Sprang S. R., Gilman A. G. (1994) Mechanism of GTP hydrolysis by G-protein alpha subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 9828–31.

Krishnan A., Almén M. S., Fredriksson R., Schiöth H. B. (2012) The origin of GPCRs: Identification of mammalian like rhodopsin, adhesion, glutamate and frizzled GPCRs in fungi. *PLoS One* **7**, 1–15.

Kuhn P., Eyer K., Robinson T., Schmidt F. I., Mercer J., Dittrich P. S. (2012) A facile protocol for the immobilisation of vesicles, virus particles, bacteria, and yeast cells. *Integr. Biol. (United Kingdom)* **4**, 1550–1555.

Lakowicz J. R. (2006) *Principles of fluorescence spectroscopy*. Third edition, Springer US.

Laasfeld T. (2019) Magistritöö - Aparecium tarkvara arendamine ja kasutamine retseptorüsteemide biokeemilistes uuringutes. University of Tartu

Lange C., Rudolph R. (2009) Suppression of Protein Aggregation by L-Arginine. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **10**, 408–414.

Lefkowitz R., Kobilka B. (2012) Studies of G-Protein Coupled Receptor: Scientific Background on the Nobel Prize in Chemistry. *R. Swedish Acad. Sci.* **50005**, 549–557.

Loisel T. P., Ansanay H., St-onge S., Gay B., Boulanger P., Donny A., Marullo S., Bouvier M. (1997) Recovery of homogeneous and functional beta 2-adrenergic receptors from extracellular baculovirus particles. **15**, 1–5.

MacNeil D. (2007) NPY Y1 and Y5 Receptor Selective Antagonists as Anti-Obesity Drugs. *Curr. Top. Med. Chem.* **7**, 1721–1733.

Makela A., Oker-Blom C. (2008) The Baculovirus Display Technology - An Evolving Instrument for Molecular Screening and Drug Delivery. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **11**, 86–98.

Malatesta F. (2005) The study of bimolecular reactions under non-pseudo-first order conditions. *Biophys. Chem.* **116**, 251–256.

Massotte D. (2003) G protein-coupled receptor overexpression with the baculovirus-insect cell system: A tool for structural and functional studies. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1610**, 77–89.

Neer E. J. (1995) Heterotrimeric G proteins: Organizers of transmembrane signals. *Cell* **80**, 249–257.

Nelson D. L., Cox M. M. (2008) *Principles of Biochemistry*. W. H. Freeman and Company, New York.

Panawala L. (2018) Difference Between Neuropeptides and Neurotransmitters Main Difference – Neuropeptides vs Neurotransmitters. June 2017.

Petersen J., Wright S. C., Rodríguez D., Matricon P., Lahav N., Vromen A., Friedler A., et al. (2017) Agonist-induced dimer dissociation as a macromolecular step in G protein-coupled receptor signaling. *Nat. Commun.* **8**.

Rasnik I., McKinney S. A., Ha T. (2005) Surfaces and Orientations: Much to FRET about? *Acc. Chem. Res.* **38**, 542–548.

Rinken A., Lavogina D., Kopanchuk S. (2018) Assays with Detection of Fluorescence Anisotropy: Challenges and Possibilities for Characterizing Ligand Binding to GPCRs. *Trends Pharmacol. Sci.* **39**, 187–199.

Rosenbaum D. M., Rasmussen S. G. F., Kobilka B. K. (2009) The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* **459**, 356–363.

Silver, J. MAE 6291 Lecture 06: Single-Molecule Fluorescence, TIRF, FRET; <https://nanohub.org/resources/18850> viimati uuendatud 06.06.2013

Schulte G. (2010) International Union of Basic and Clinical. *Pharmacol. Rev.* **62**, 632–667.

Schulte G. (2014) Frizzleds as G Protein-Coupled Receptors. *Wnt Signal. Dev. Dis. Mol. Mech. Biol. Funct.*, 195–206.

- Schulte G., Kozielowicz P. (2019) Structural insight into Class F receptors – what have we learnt regarding agonist-induced activation? *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **1**, bcpt.13235.
- Sun Y. ., Landry J. ., Lam K. . (2009) Effect of Fluorescently Labeling Protein Probes on Kinetics of Protein-Ligand Reactions. **377**, 364–377.
- Tan C. M. J., Green P., Tapoulal N., Lewandowski A. J., Leeson P., Herring N. (2018) The role of neuropeptide Y in cardiovascular health and disease. *Front. Physiol.* **9**, 1–13.
- Tatemoto K., Carlquist M., Mutt V. (1982) Neuropeptide Y - A novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature* **296**, 659–660.
- Tautermann C. S. (2014) GPCR structures in drug design, emerging opportunities with new structures. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **24**, 4073–4079.
- Veiksina S., Kopanchuk S., Rinken A. (2014) Budded baculoviruses as a tool for a homogeneous fluorescence anisotropy-based assay of ligand binding to G protein-coupled receptors: The case of melanocortin 4 receptors. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1838**, 372–381.
- Tõnsau K. (2014) Magistritöö - TIRF-mikroskoopial põhinev biosensor süsteem HLA-G määramiseks. University of Tartu
- Weber P. C., Ohlendorf D. H., Wendoloski J. J., Salemme F. R. (1989) Structural Origins of High-Affinity Biotin Binding To Streptavidin. *Science (80-. )*. **243**, 85–88.
- Wheatley M., Wootten D., Conner M. T., Simms J., Kendrick R., Logan R. T., Poyner D. R., Barwell J. (2012) Lifting the lid on GPCRs: the role of extracellular loops. *Br. J. Pharmacol.* **165**, 1688–1703.
- Wraith A., Törnsten A., Chardon P., Harbitz I., Chowdhary B. P., Andersson L., Lundin L. G., Larhammar D. (2000) Evolution of the neuropeptide Y receptor family: Gene and chromosome duplications deduced from the cloning and mapping of the five receptor subtype genes in pig. *Genome Res.* **10**, 302–310.
- Yang Z., Han S., Keller M., Kaiser A., Bender B. J., Bosse M., Burkert K., et al. (2018) Structural basis of ligand binding modes at the neuropeptide y Y 1 receptor. *Nature* **556**, 520–524.
- Yakimchuk, K. Receptor-Ligand binding assays; <https://www.labome.com/method/Protein-Receptor-Ligand-Interaction-Binding-Assays.html> viimati uuendatud 12.11.2018
- Yu Z., Gonciarz M. D., Sundquist W. I., Hill C. P., Jensen J. (2009) Fluorescence spectral properties of cyanine dye-labeled DNA oligomers on surfaces coated with silver particles. **377**, 364–377.
- Zhang R., Xie X. (2012) Tools for GPCR drug discovery. *Acta Pharmacol. Sin.* **33**, 372–84.



## TÄNUAVALDUSED

Sügav kummardus ja tänusõnad lähevad loomulikult minu juhendajatele Sergei Kopantšukile ja Ago Rinckenile. Sergeiga oleme kahe viimase aasta jooksul veetnud koos lugematul arvul tunde pimedas mikroskoopia ruumis, kus kõik need imelised eksperimendid sündinud on. Tema kohati isegi uskumatult laiad teadmised mikroskoopia ja GPCR-de valdkonnas on mind inspireerinud ja magistritöö valmimisel tugevalt aidanud. Katseid läbiviies unustasin ma tihti peale Sergei poolt antud korraldused või näpunäited ära ja nii mõndagi katset tuli selle tõttu korrata. Selle tõttu kulus tal ilmselt päris palju närvirakke, aga luban, et see oli väärt investeering, sest läbi selle õppisin, kui oluline on teadustöö tegemise juures korrektsus ja pisisidetailid.

Agot tänan selle eest, et ta hoidis mu fookust paigas ja jagas väärtusliku nõu, kui oli vaja mingist suuremast takistusest läbi murda.

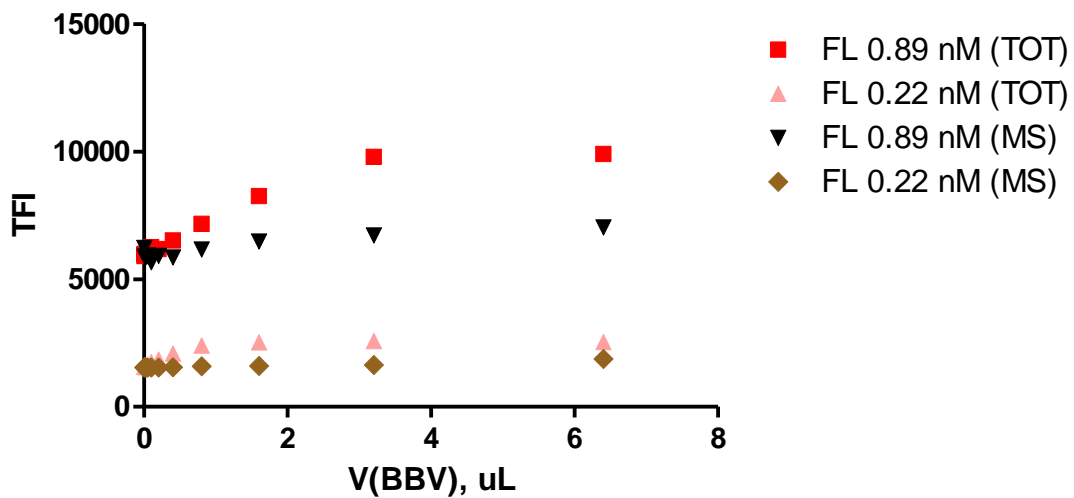
Suureks abiks töö valmimisel oli ka minu töörühmas töötav Tõnis Laasfeld. Tõnise nutikad lahendused ja teadmised pilditöötlusvaldkonnas aitasid mul mikroskoopia pilte paremini hallata ja analüüsida.

Lisaks Tõnisele väärivad kindlasti tänuavaldust ka kõik teised minu töörühma liikmed, kes andsid mingites aspektides reaalse panuse antud töö valmimisse või olid abiks nõu ja motiveerimisega.

## **LISAD**

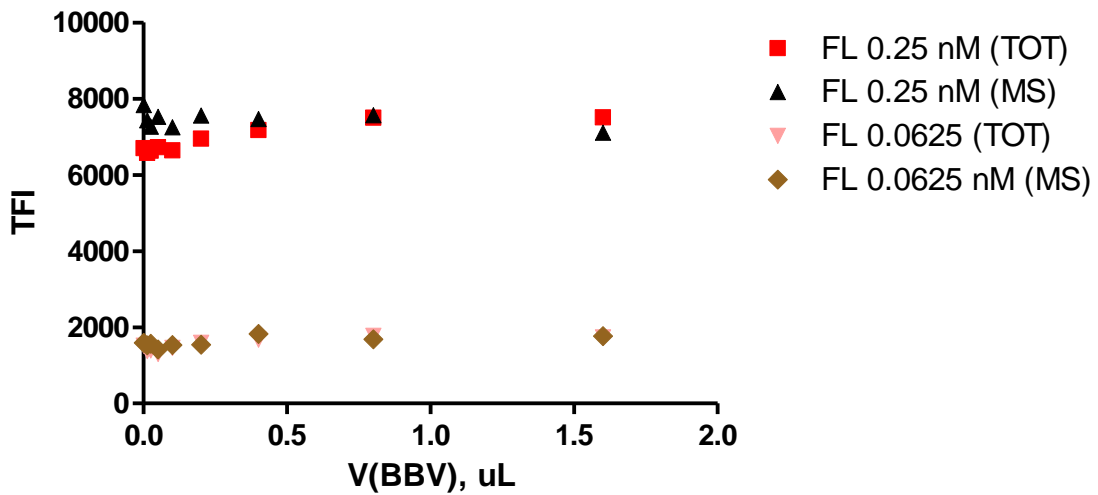
Lisa 1 TFI muutus varieerides BBV-de kontsentratsiooni (CM139).....	43
Lisa 2 TFI muutus varieerides BBV-de kontsentratsiooni (MC026).....	43
Lisa 3 NPY1R-i antagonisti BIBP3226 struktuur.....	44

### CM139 seostumine NPY1R-le BBV-del

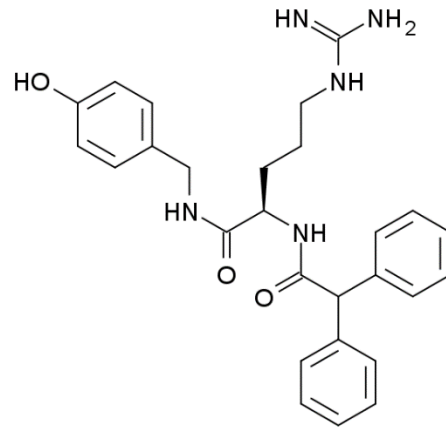


Lisa 1. TFI muutus varieerides BBV-de kontsentratsiooni. Toodud on totaalsele (TOT) ja mittespetsiifilisele (MS) sidumisele vastavad kõverad.

### MC026 seostumine NPY1R-le BBV-del



Lisa 2. TFI muutus varieerides BBV-de kontsentratsiooni. Toodud on totaalsele (TOT) ja mittespetsiifilisele (MS) sidumisele vastavad kõverad.



**Lisa 3. NPY1R-i antagonisti BIBP3226 struktuur**

## **INFOLEHT**

### **Ligandi ja retseptori vaheliste interaktsioonide iseloomustamine TIRF-mikroskoopia abil**

Töö käigus loodi uudne TIRFM-l põhinev sidumismeetod, millega on võimalik ligandi ja retseptori vahelisi interaktsioone iseloomustada. Pinnale kinnitati viirusosakesed, mille membraanis paiknesid NPY1R-d. Kasutades fluorestsentsligande visualiseeriti sidumisprotsessi retseptoritega. Andmete põhjal leiti vastavate ligandide afiinsuskonstandid, mida võrreldi FA meetodiga saadud väärtustega. Afiinsused olid sarnases suurusjärgus ning tõestasid, et uue meetodiga on võimalik retseptori ja ligandi seostumist teatud täpsusega iseloomustada.

Märksõnad: TIRFM, biomolekulide kinnitamine, FA, ligandi sidumiskatsed

CERCS koodid ja nimetused: P310 Valgud ja ensüümoloogia; B352 Pinna- ja piirpindade keemia; B740 Farmakoloogia, farmakognoosia, farmaatsia, toksikoloogia.

### **Novel method for studying ligand-receptor interactions using TIRF microscopy**

The work led to the creation of novel TIRFM based binding method, which allows to characterize ligand-receptor interactions. Viral particles, that contained NPY1R-s in their membrane, were attached to the surface. Binding to receptors was visualized with fluorescent ligands. Experimental data was used to find binding affinities to these ligands, which were compared to affinity constants obtained from FA measurements. The affinity values were in similar order and proved that new method could be used for characterizing ligand binding to receptor with certain degree of accuracy.

Keywords: TIRFM, biomolecule immobilization, FA, ligand binding assays

CERCS codes and names: P310 proteins, enzymes; B352 Surface and boundary layer chemistry; B740 Pharmacological sciences, pharmacognosy, pharmacy, toxicology.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, \_\_\_\_\_ Karl Rene Kõlvart \_\_\_\_\_,  
(autori nimi)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose  
\_\_\_\_\_ Ligandi ja retseptori vaheliste interaktsioonide iseloomustamine TIRF-mikroskoopia abil  
\_\_\_\_\_,  
(lõputöö pealkiri)

mille juhendajad on \_\_\_\_\_ Sergei Kopantšuk ja Ago Rinke \_\_\_\_\_,  
(juhendaja nimi)

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates 03.06.2022 kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 27.05.2019