

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

Keemia Instituut
Bioorgaanilise keemia õppetool

TÕNIS LAASFELD

Aparecium tarkvara arendamine ja kasutamine retseptorsüsteemide
biokeemilistes uuringutes

Magistritöö keemias 30 EAP

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

Tartu 2019

Sisukord

KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS.....	5
KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
Biokeemiliste süsteemide matemaatiline modelleerimine	6
Biokineetika andmeanalüüsi ja- halduse tarkvarad	6
Biopildiinformaatika	9
Fluorestsentsanisotroopia põhinevate meetodite põhimõte	9
Epifluorestsentsmikroskoopia	11
G-valk seotud retseptorite dimeriseerumine ja oligomeriseerumine.....	11
EKSPERIMENTAALNE JA PRAKTILINE OSA.....	12
HEK293 rakuliinide kasvatamine	12
Mikroskoopiakatsed HEK293 rakuliiniga.....	12
M ₁ MR sisaldava pungunud bakuloviiruse preparaadi tootmine.....	13
Fluorestsentsanisotroopia katsed M ₁ MR bakuloviiruse preparaadiga.....	13
Tarkvaraarendus	14
Andmehaldus ja statistiline analüüs	14
TULEMUSED JA ARUTELU.....	15
Aparecium tarkvara	15
Tarkvara ülesehitus	15
MIDASTools moodul ja MIDAS formaat.....	16
Impordimoodulid.....	16
Mikroplaadi simulatsiooni moodul	18
Ekspordimoodul	19
Konfiguratsioonifailid	20
Aparecium tarkvara kasutamine ja saadavus.....	21
Aparecium tarkvara rakendusnäited.....	21

Katseandmete haldamine ja töötlus.....	21
Retseptor-ligand interaktsioonide modelleerimine M_1 MR ja Y_1R näitel.....	22
Meetod dopamiin D_3 retseptor – ligand interaktsioonide uurimiseks elusrakkudes	27
Rakumembraani tuvastamise algoritm ja selle parameetrite optimeerimine.....	27
Membraanist lähtuva fluorestsentskiirguse kvantifitseerimine.....	30
<i>MembraneTools</i> pildianalüüsi moodul.....	31
Dopamiin D_3 retseptori ligandide sidumisomaduste iseloomustamine.....	31
Edasised sammud	34
KOKKUVÕTE.....	35
SUMMARY	36
KASUTATUD KIRJANDUS	37
INFOLEHT	41
LISAD	42

KASUTATUD LÜHENDID

ASCII – Ameerica Informatsioonivahetuse Standardkood (*ingl. k. American Standard Code for Information Interchange*)

BIBO3304 – arginiinamiid tüüpi Y_1R antagonist BIBO3304

cDNA – komplementaarne DNA

CSV – komaga eraldatud väärtused (*ingl. k. comma separated values*)

cTCAM – kuubiline kolmik-kompleksi aktivatsiooni mudel (*ingl. k. Cubic ternary complex activation model*)

D₃R – dopamiin D₃ retseptor

GPCR – G-valk seotud retseptor

IC₅₀ – poolmaksimaalne inhibeeriv kontsentratsioon

ICSE – pildianalüüsil põhinev raku suuruse hindamine (*ingl. k. Image-based cell-size estimation*)

M₁ MR – muskariinne atsetüülkoliini M₁ alatüüp

MR – muskariinne atsetüülkoliini retseptor

MC159 – Christoph Muelleri sünteesitud arginiinamiid tüüpi Y_1R antagonist 159

MIDAS – Minimaalse vajaliku informatsiooni formaat andmeanalüüsiks süsteemibioloogias (*ingl. k. Minimum Information for Data Analysis in Systems Biology*)

MK342 – TAMRA fluorestsentsmärgisega dibensodiasepinoonil põhinev MR antagonist

NAPS – N-(p-aminofenetüül)spiperoon

Y_1R – neuropeptiid Y Y_1 retseptor

OME-TIFF – Open Microscopy Environment sildistatud pildiformaat (*ingl. k. tagged image file format*)

SBML – Süsteemibioloogia märgistuskeel (*ingl. k. Systems Biology Markup Language*)

TAMRA – Tetrametüül-rodamiin

UR-SK-III-59 – dibensodiasepinoonil põhinev MR antagonist

SISSEJUHATUS

Mikroitiiterplaatidele kohandatud spektrifluorimeetrid ja mikroskoobid on muutunud biokeemiliste mõõtmismeetodite jaoks laialdaselt kasutatavaks. Sellised mõõteaparaadid võimaldavad korraga mõõta suurt hulka erineva keemilise koostisega proove ning seda võrdlemisi suure sagedusega. Suur mõõtmisagedus lubab nende mõõtemetodite kasutamist reaktsioonikineetika jälgimiseks, kui reaktsiooni poolestusaeg on piisavalt pikk. Spektrofluorimeetrite kasutamisel on mõõtmiste tulemuseks on tüüpiliselt neelduvuste või fluorestsentsintensiivsuste andmemaatriks, mille veergudeks on vastavate süvendite indeksid ning ridadeks ajad, millal mõõtmine teostati. Mikroskoobi kasutamisel on mõõtetulemuseks mikroskoopiapilt. Arvutijuhitavate mõõtmiste teostamiseks ning andmete töötamiseks on mõõteaparaatide tootjad loonud spetsiaalsed tarkvarad. Olulisemad funktsioonid, mida tüüpiline mikroitiiteplaadile kohandatud tarkvara teostab, on mõõtmise juhtimine, mõõteparameetrite muutmine, andmete salvestamine, lihtsamad andmete grupeerimise ja analüüsi operatsioonid, lihtsamad statistilised operatsioonid, levinumad pilditötlusoperatsioonid ning tulemuste visualiseerimine. Samas on tihti uute meetodikate väljatöötamiseks tarvis rakendada estandardseid andmehaldus ja –tötlus võtteid nagu näiteks mikroskoopiapiltide kvantitatiivne analüüs või süsteemi matemaatiline modelleerimine. Kuigi nii andmehalduseks, pilditötluseks kui ka matemaatiliseks modelleerimiseks on loodud palju häid tarkvarapakette, siis nende omavaheline ühilduvus on kehv ning tihti tuleb andmeid liigutada ja transformeerida Excel tarkvaras käsitsi ning kasutada standardiseerimata andmeformaate. Andmete selline transformeerimine võib viia vigade tekkeni ning on suurte andmemahtude puhul ajakulukas.

Selle probleemi lahendamiseks on käesolevas töös välja töötatud Aparecium tarkvara, mis ühildub erinevate spektrofluorimeetri tootjate tarkvaradega, lubab mõõteandmete ja katse metaandmete ühendamist ja standardiseerimist ning andmete eksporti erinevatesse matemaatilise modelleerimise tarkvaradesse. Lisaks pakub Aparecium lahendusi ka pilditötlusel põhinevate meetodite arendamiseks.

Aparecium tarkvara toimimise näitlikustamiseks on matemaatilise modelleerimise abil uuritud muskariinse atsetüülkoliini retseptori M_1 alatüüpi ja neuropeptiid Y retseptori Y_1 alatüüpi. Mikroskoopiaal põhineva meetodi näitena on arendatud fluorestsents ja –heleväljamikroskoopia kombineerimisel ja digitaalsel pilditötlusel põhinev meetod retseptor-ligand interaktsioonide uurimiseks elusrakkudes dopamiin D_3 retseptori näitel.

KIRJANDUSE ÜLEVAADE

Biokeemiliste süsteemide matemaatiline modelleerimine

Bioloogilistes süsteemides toimuvad protsessid on väga sageli kompleksed ning seetõttu ei ole neid tavaliselt võimalik lihtsate võrranditega kirjeldada. Nende süsteemide kirjeldamiseks kasutatakse matemaatilise modelleerimise tehnikaid, mida biokeemilises kontekstis nimetatakse süsteemibioloogiaks. Keerukate biokeemiliste süsteemide modelleerimiseks kasutatakse tavaliselt harilike diferentsiaalvõrrandite süsteeme. Kuna alati ei ole sellised võrrandisüsteemid analüütiliselt lahenduvad, siis praktikas kasutatakse modelleerimiseks numbrilisi meetodeid ja spetsiaalseid tarkvarapakette. Kasutatavatest tarkvaradest parema ülevaate saamiseks on loodud nende kirjeldusi koondav andmebaas (sbml.org). Kuna mudelite loomise, optimeerimise ja haldamise tarkvarasid on palju, siis liiga paljude erinevate kuid samasisuliste failiformaatide tekkimise vältimiseks on loodud süsteemibioloogia mudelite kirjeldamiseks standardne SBML (*ingl. k. Systems biology markup language*) failiformaat (Hucka *et al.* 2004). Kuna biokeemia on küllaltki lai teadusharu, siis on tekkinud ka süsteemibioloogia alamharusid nagu näiteks süsteemifarmakoloogia, mille alla kuulub ka G-valk seotud retseptorite (GPCR) toimemehhanismide modelleerimine. Konkreetselt GPCR signaaliraja kirjeldamiseks on loodud mitmeid erinevad matemaatilisi mudeleid nagu näiteks cTACM ja allosteeriliselt sõltuvate kaksik sidumistaskute mudel (*ingl. k. Tandemly arranged interconnected mutually dependent binding sites model*) (Shea *et al.* 2000; Kopanchuk *et al.* 2006).

Biokineetika andmeanalüüsi ja- halduse tarkvarad

Lisaks katseandmete kogumisele ja haldamisele on väga oluline ka metaandmete (andmed andmete kohta) korrektne kogumine ja haldamine. Metaandmete biokeemilistele mõõteandmetele lisamiseks on loodud mitu tarkvaralahendust. Üks tarkvaradest on ISA-Tools, mis lubab eksperimentaalandmete, metaandmete ja katseprotokollide haldamist ja publitseerimist (Rocca-Serra *et al.* 2010). Samas ei ole ISA-Tools mõeldud otseselt biokineetiliste andmete analüüsiks ja seetõttu ei ole selle kasutamine biokineetikal põhinevate uurimuste jaoks kuigi intuitiivne ning programmi õppimine on pigem aeganõudev.

Katseandmete haldamiseks on võimalik kasutada ka e-laboripäevikuid, mis ei sisalda niivõrd rangeid andmesisestusnõudeid kui näiteks ISA-Tools ning põhineb pigem vabatekstil. See seab osaliselt piiranguid küll hilisemale suuremahulisele andmekaevandamisele, kuid sobib paremini dünaamiliste, harvem kasutatavate meetodite ja väiksemamahuliste andmehulkade

jaoks. Levinud e-laboripäevikute tarkvarad on näiteks eLabFTW (<https://www.elabftw.net/>), Scinote (<https://scinote.net/>) ja Labarchives (<https://www.labarchives.com/>).

Andmehalduseks ja töötluks on olemas ka kommertsiaalsed tarkvarad, mida arendavad tavaliselt spektrofluorimeetrite tootjad. Mõned levinud näited sellistest tarkvaradest on Tibco Spotfire (PerkinElmer), Gen5 (BioTek) ja MARS (BMG Labtech). Kommertsiaalsete tarkvarade eeliseks on vastava ettevõtte mõõteaparaatidega vahetu integreeritus ning tavakasutuseks küllaltki lai valik sisseehitatud funktsioone. Kuna nimetatud kommertsiaalsed tarkvarad ei ole avatud lähtekoodiga, siis on nende tarkvarade modifitseerimine ja teiste tarkvaralahendustega otsene integreerimine keeruline, kuigi Tibco Spotfire lubab kasutajatel tarkvaralaiendusi lisada. Nimetatud tarkvarade staatilisus seab üldiselt olulisi piiranguid uute andmetöötlusvõtete ja mõõtemetodite arendamisele. Seega sobib nende tarkvarade kasutamine pigem laboritele, kus andmeanalüüsi meetoodika on täielikult väljatöötatud, lihtne ja robustne.

Seni kõige sobivam platform spektrofluorimeetrite ja andmeanalüüsitarkvarade omavaheliseks sidumiseks on olnud *DataRail* tarkvara (Saez-Rodriguez *et al.* 2008; Hafner *et al.* 2017). *DataRail*i eelisenä viib kindlasti välja tuua tarkvara suure paindlikkuse ja hea avatud lähtekoodi tõttu hea ühildatavuse teiste analüüsitarkvaradega. *DataRail* tarkvara uuemad versioonid põhinevad täielikult käsureaal ning tarkvara kasutamine eeldab Python programmeerimiskeele tundmist. Kuigi *DataRail*i autorid on graafilisi kasutajaliideseid kirjeldanud kui eksperimentaalsid vabadust piiravate tegureid, siis on ilmne, et käsurea abil programmidega interakteerumine ei ole paljudele lõppkasutajatele intuiitiivne ja võib seega oluliselt piirata tarkvara rakendatavust (Hafner *et al.* 2017).

Andmeanalüüsi töövoogude loomiseks ja standardiseerimiseks on võimalik kasutada ka andmeanalüüsiplatforme, millel on suur hulk sisseehitatud andmeanalüüsi komponente ning kus töövooge esitatakse peamiselt graafilise mudeli abil. Sellist tüüpi tarkvara esindab näiteks KNIME® (*Konstanz Information Miner*). Kogu töövoogi esitamine ja ehitamine graafilise mudeli abil on küllaltki intuiitiivne ning ei nõua mõne programmeerimiskeele tundmist, mis muudab tarkvara lihtsamini õpitavaks. Samas ei sisalda ka KNIME® niivõrd spetsiifilisi biokineetiliste andmete importimiseks ja eksportimiseks disainitud mooduleid ning seega ei ole ka KNIME® ilma lisamoodulite arendamiseta rakendatav mikroplaadi mõõtmise võimekusega spektrofluorimeetrite andmete töötlemiseks.

Erinevalt tüüpilisest spektrofluorimeetrist mõõtmistest ei ole mikroskoopiaal põhinevate meetodite mõõtetulemuseks üksikud, proovi keskmist omadust kirjeldavad, andmepunktid vaid

biopildid, mis sisaldavad ruumilist informatsiooni. Seetõttu on piltide haldamiseks vaja spetsiaalset tarkvara. Üks tuntumaid biopiltide haldamiseks on loodud lahendusi on OMERO server (Allan *et al.* 2012). OMERO server on mõeldud esmajärgus OME-TIFF (*Open Microscopy Environment TIFF* pilt) formaadis piltide andmebaasina, kuid toetab hetkeseisuga kokku 154 erinevat pildiformaati. Lisaks andmebaasina toimimisele võimaldab OMERO teostada lihtsamaid piltidega teostatavaid töötlusoperatsioone, pilditöötluskriptide lisamist ning andmevahetust teiste arvutite või arvutiklastritega üle võrgu (Linkert *et al.* 2010; Goldberg *et al.* 2005). Kuigi OMERO suudab hallata multidimensionaalseid pilte ja videoid, siis puuduvad OMERO-s kineetiliste mudelite loomise ja testimise vahendid.

Tarkvarasid, mille abil on võimalik luua, simuleerida ja optimeerida biokeemilisi süsteeme kirjeldavaid kineetilisi mudeleid on mitu, kuid üldjoontes on nende ülesehitus küllaltki sarnane. Levinumad sellised tarkvarad on näiteks IQMTools (varasemalt SBToolbox2), GraphPad Prism, COPASI, Potters Wheel, DynaFit, AMIGO2 ja Data2Dynamics (Hoops *et al.* 2006; Balsa-Canto *et al.* 2016; Schmidt and Jirstrand 2006; Kuzmič 1996; Raue *et al.* 2015). Tavaliselt defineeritakse mudel kasutades kolme eri tüüpi andmeplokke. Esimene andmeplokk kirjeldab mudelis esinevate ainete kontsentratsioone ajahetkel $t=0$. Teine andmeplokk kirjeldab reaktsioonivõrrandeid, milles nimetatud ained osalevad, ning vastavate reaktsioonivõrrandite kiiruskonstante. Olenevalt tarkvarast võib see plokk olla jaotatud ka mitmesse alamplokki. Kolmas andmeplokk kirjeldab protsessi käigus toimuvaid sündmusi, nagu näiteks mõne aine reaktsioonisegusse lisamine või reaktsioonisegu ruumala muutmine. Lisaks võivad esineda lisablokid mudeli kirjeldamiseks ja matemaatiliste funktsioonide lisamiseks. Osad tarkvarad lubavad mudelite koostamist ka graafiliste kasutajaliideste abil. Enamik tarkvarasid toetab mudelite salvestamist SBML formaadis, mis lihtsustab loodud mudelite jagamist ja taaskasutamist. Simulatsioonide loomiseks kirjeldatakse süsteemi parameetrite ning konstantide algväärtused ja limiidid ning tarkvara arvutab numbriliste meetodite abil kogu süsteemi progresseerumise etteantud aja vältel. Süsteemi parameetrite optimeerimiseks viib tarkvara läbi vaheldumisi simulatsioone erinevate parameetrite väärtustega ning analüüsib andmete ja simulatsiooni omavahelist vastavust etteantud optimeeritava parameetri väärtuse järgi. Vastavalt optimeeritava parameetri muutumisele arvutatakse süsteemi parameetritele parandid. Parameetrite parandite arvutamiseks kasutatavaid algoritme on palju ning igas tarkvaras ei pruugi kõik algoritmid olla saadaval.

Kuigi tarkvarasid, mis sobiks teatud aspekti poolest biokineetiliste andmete analüüsiks ja halduseks, on palju, ei ole enamus neist vastavaks otstarbeks loodud. See tähendab, et andmete

standardiseerimine ning tarkvarade riskasutamine on praktikas olnud küllaltki keeruline. Seetõttu on vajadus andmete standardiseerimist ja andmeformaate konverteerimist võimaldava tarkvara järele märkmisväärne.

Biopildiinformaatika

Biopildiinformaatika on küllaltki uus interdistsiplinaarne ala, mis toetub bioinformaatikale, arvutuslikule bioloogiale ning masinõppimisele (Peng *et al.* 2012). Biopildiinformaatika uurimisobjektiks on biopildid ehk pildid bioloogilistest proovidest. Biokeemiliste ning molekulaarbioloogiliste protsesside uurimiseks on sobiv biopiltide vorm mikroskoopiapilt. Mikroskoopiatehnikatest on biopiltide mõõtmiseks enimlevinud fluorestsentsmikroskoopia, elektronmikroskoopia ja heleväljamikroskoopia. Sobiv mikroskoopiatehnika valitakse enamasti vastavalt rakendusele ning kasutades spetsiaalselt disainitud mikroskoope on võimalik sama proovi mõõtmiseks kasutada järjestikku mitut eelnevalt mainitud tehnikat (De Boer *et al.* 2015). Mikroskoopiale järgneb biopiltide töötlus ja analüüs, mille eesmärgiks on mõõta biopildilt huvipakkuvate parameetrite arvulised väärtused võimalikult täpselt ja usaldusväärselt. Biopiltide analüüsiks kasutatakse kas klassikalistel algoritmidel põhinevaid pildianalüüsitehnikaid, masinõpet või klassikaliste algoritmide ja masinaõppe kombinatsiooni. Biopildianalüüsi tulemuseks võib olla kas uus pilt, näiteks rakkude segmentatsioon, või arvulised parameetrid, nagu näiteks rakkude suurus. Viimase etapina kombineeritakse mõõdetud parameetrite väärtused ja pildi metainfo pildi mõõtmise füüsikaliste, keemiliste või bioloogiliste tingimuste kohta. Selliselt organiseeritud informatsiooni kaeveks saab juba rakendada sobivaid statistilisi meetodeid. Biopiltide analüüsimiseks on loodud suur hulk nii vabavarilisi kui ka kommertsiaalseid tarkvarapakette nagu näiteks Fiji (<https://fiji.sc/>), Icy (<http://icy.bioimageanalysis.org/>), Matlab (<https://se.mathworks.com/products/matlab.html>) ja Imaris (<https://imaris.oxinst.com/>).

Fluorestsentsanisotroopia põhinevate meetodite põhimõte

Fluorestsentsanisotroopia (FA) meetod on üks paljudest fluorestsentsil põhinevatest biokeemilistest meetoditest, mida saab rakendada biomolekulidevaheliste interaktsioonide mõõtmiseks. Fluorestsentsanisotroopia iseloomustab fluorestsentskiirguse polarisatsiooni ulatust ning seost kirjeldab **võrrand (1)**:

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

Kus $I_{||}$ on ergastustasandiga paralleelne ning $I_{\perp}$ sellega risti oleva polarisatsioonitasandiga fluorestantsintensiivsus ja FA on mõõdetud fluorestantsanisotroopia (Jabłoński 1960).

Kui fluorofoore ergastada lineaarselt polariseeritud valgusega, siis toimub ergastamisel rotatsiooniline selektsioon – ergastatakse vaid need fluorofoorid, mille dipooli orientatsioon on valguse polarisatsioonitasandiga vastavuses. Ergastatud olekus molekul võib seejärel kiirata uuesti footoni, mille polarisatsioonitasand on samuti vastavuses molekuli dipooli orientatsiooniga. Fluorofoori relakseerumine on eksponentisaalse kahanemisena kirjeldatav tõenäosuslik protsess, kus keskmist ergastatud olekus veedetud aega kirjeldab fluorestantseluga τ . Kuna enne relakseerumist ja footoni kiirgamist võib fluorofoor rotatsioonilise difusiooni tõttu orientatsiooni muuta, siis fluorestantskiirguse anisotroopia väheneb. Vähenemise ulatus sõltub fluorestantseluea ja rotatsioonilise difusiooni ajakonstandi omavahelisest vahekorrast ning seda kirjeldab Perrini **võrrand (2)**.

$$FA_i = \frac{FA_0}{1 + \tau/\phi} \quad (2)$$

Kus FA_i on vastavas vormis esineva fluorofoori fluorestantsanisotroopia, τ on fluorestantseluga, ϕ on rotatsiooniline difusiooni ajakonstant ning FA_0 on fluorofoori anisotroopia täiesti statsionaarses olekus (*ingl. k. intrinsic anisotropy*), ühefootonilise fluorestantseni jaoks $FA_0=0,4$ (Perrin 1926).

Kui farmakofooriga seostunud fluorofoor moodustab kompleksi farmakofoori märklaudvalguga, siis suureneb fluorofoori rotatsiooniline ajakonstant märgatavalt, mis viib omakorda vastava vormi FA_i kõrgema väärtuseni võrreldes vaba fluorofoori FA_i väärtusega. Kuna mõõdetav FA on kõigi fluorofoori vormide FA_i väärtuste kontsentratsiooniga kaalutud keskmine, siis **võrrandeid (1) ja (3)** kasutades on võimalik FA mõõtmise abil kindlaks teha ka vaba ja valguga seotud fluorofoori vormide hetkkontsentratsioonid.

$$FA(t) = \frac{\sum_{i=1}^n \{FL_i\}_t * FA_i}{\sum_{i=1}^n \{FL_i\}_t} \quad (3)$$

Kus t tähistab mõõtmise aega, i tähistab vastavat fluorofoori vormi, $FA(t)$ on mõõdetud fluorestantsanisotroopia ajahetkel t ja $\{FL_i\}_t$ on vastavas vormis esineva fluorofoori hetkkontsentratsioon ajahetkel t .

Kuna FA_i väärtused eri vormide jaoks ei ole üldiselt teada, siis on neid võimalik määrata mõõtmiste matemaatilise modelleerimise abil (Otto *et al.* 1994; Rinken *et al.* 2018).

Epifluorestsentsmikroskoopia

Epifluorestsentsmikroskoopia on üks kõige lihtsamaid ning odavamaid fluorestsentsmikroskoopia meetodeid, mis on välja arendatud eelmise sajandi kuuekümnendatel aastatel (Ploem 1967). Kõrge kvaliteediga piltide mõõtmiseks tuleb mikroskoopias vältida mitmeid müraallikaid. Epifluorestsentsmikroskoobi ülesehituse seisukohalt on oluline müraallikas proovilt peegelduv ja objektiivini jõudev valgus. Kuna tüüpiliselt esineb fluorestsentsmäärgistel Stokes'i nihe, mille korral fluorofoori kiirgusspekter on võrreldes ergastusspektriga nihkunud suuremate lainepikkuste poole, siis on võimalik ergastus- ja kiirgusfiltritega müra vähendada. Selleks selekteeritakse ergastusfiltriga välja kindel ja suhteliselt kitsas lainepikkuste vahemik, mis kattub fluorofoori ergastusspektriga. Objektiivi jõudev valgus filtreeritakse kiirgusfiltriga, mida saab läbida fluorofoori kiirgusspektriga kattuv kitsas valguse lainepikkuste vahemik. Sellise ülesehituse korral on eristuvad taustast objektid, kuhu on koondunud fluorofoor. Kuna rakubioloogilistes katsetes on fluorofooridega määrgistatud mõne bioloogilise molekuli suhtes selektiivsed ained nagu näiteks antikehad või ligandid, siis on epifluorestsentsmikroskoopiat võimalik rakendada paljude bioloogiliste struktuuride visualiseerimiseks biopiltidena.

G-valk seotud retseptorite dimeriseerumine ja oligomeriseerumine

GPCR-id on membraansed retseptorvalgud, mis on tänapäeval olulised ravimimärklauad. Nende hulka kuulub palju alamklasse, näiteks dopaminergilised ja muskariinsed atsetüülkoliini retseptorid (MR), mis on olulised näiteks Parkinsoni tõve ravimimärklauadena, ning neuropeptiid Y Y₁ retseptor (Y₁R), mis on oluline ülekaalulisuse ravimimärklauad (Leggio *et al.* 2016; Xiang *et al.* 2012; Martin *et al.* 2015).

Kui algselt arvati, et GPCR-id toimivad monomeersete ühikutena, siis viimastel kümnenditel on leitud hulgaliselt tõendeid paljude retseptori klasside dimeriseerumisest ja oligomeriseerumisest. MR alatüüpide esinemist dimeeride või kõrgemate oligomeeridena on näidatud mitmel eri meetodil (Marsango *et al.* 2018; Hern *et al.* 2010). Samuti on näidatud dopamiin D₃ retseptorite (D₃R) oligomeriseerumist (Nimchinsky *et al.* 1997).

Dimeersete struktuuride uurimine on ravimiarenduse seisukohalt väga oluline, kuna pakub uusi võimalusi nii alatüüpspetsiifiliste kui ka funktsionaalselektiivsete ligandide disainiks. Näiteks on bivalentseid ligande kasutatud melanokortiin 4 retseptori funktsionaalselektiivsete ligandidena (Lensing *et al.* 2019).

EKSPERIMENTAALNE JA PRAKTIILINE OSA

HEK293 rakuliinide kasvatamine

Dopamiin D₃ retseptorit ekspresseeriv rakuliin on loodud Dr. Reet Reinart-Okugbeni poolt (Reinart-Okugbeni 2012). Inimese embrüonaalsest neerukoest aretatud rakuliini HEK293 kasvatati nagu on kirjeldatud Anni Allikalt doktoritöös (Allikalt 2018). Katsed viidi läbi koostöös Dr. Anni Allikaltiga. Rakke kasvatati ühekihilise kinnitatud rakukultuurina Petri tassidel (Thermo Scientific, BioLite) kõrge glükoosisisaldusega Dulbecco Modifitseeritud Eagle söötmes (DMEM) (Sigma-Aldrich), millesse on lisatud 10% veise loote seerumit (Sigma-Aldrich), 100 µg/ml streptomütsiini (Smart Media), 400 µg/ml genetitsiini (PAA Laboratories) ja 100 U/ml penitsiliini (NAXO) (edaspidi sööde). Rakke kasvatati vesivanniga inkubaatoris 5% CO₂ sisaldusega atmosfääris temperatuuril 37 °C. Rakkude tõstmiseks ja rakuagregaatide vähendamiseks kasutati Trüpsiin-EDTA lahust (0,005/0,002%, NAXO, Smart Media). Rakkude loendamiseks ja elumuse määramiseks lisati rakkudele 0,2% trüpaansinist (BioTop) ning mõõdeti rakuloenduriga Automated Cell Counter TC20™ (Bio-Rad Laboratories).

Mikroskoopiakatsed HEK293 rakuliiniga

HEK293 rakuliini kasvatati katseks nagu kirjeldatud eelmises lõigus. Eksperimendipäeval viidi rakud mikroskoopiaks sobilikku mustale 96 süvendiga Ibidi µ-plate plaadile (Ibidi) tihedusega $2 \cdot 10^4$ rakku/süvendis söötme ruumalas 150 µl, kui ei ole öeldud teisiti. Rakuplaati inkubeeriti temperatuuril 37 °C viis tundi. Seejärel asendati sööde 150 µl Dulbecco fosfaatpuhverdatud soolalahusega, millele oli lisatud Ca²⁺ ja Mg²⁺ (Sigma-Aldrich). Seejärel lisati süvendisse ligandid. Konkureerimiskatsete puhul lisati fluorestsentsligandi NAPS-Cy3B (sünteesinud Dr. Mihkel Ilisson) nii, et lõppkontsentratsioon igas süvendis oli 1 nM, ning eri süvenditesse lisati seerialahjendusena konkureerivat ligandi. Mittespetsiifilise seostumise mõõtmiseks lisati süvendisse 1 µM butaklamool. Helevälja- ning fluorestsentskanalite piltide mõõtmiseks kasutati mikroskoopi Cytation 5 (BioTek) ning LUCPLFLN 20x (WD 6.6, NA 0.45) (Olympus) objektiivi. Fluorestsentskanali mõõtmisel kasutati ergastamiseks 523 nm lainepikkusega LED valgusallikat ning optilist filtrit lainepikkusega 531 nm ribalaiusega (*ingl. k. bandwidth*) 40 nm ning fluorestsentsemissiooni mõõtmiseks optilist filtrit lainepikkusega 593 nm ribalaiusega 40 nm. Mõõteprotokollide loomiseks ja mikroskoobi kontrollimiseks kasutati tarkvara Gen5 v 2.07.17 (BioTek). Helevälja- ja fluorestsentspiltide mõõtmisel kasutati sobiva intensiivsusega pildi saavutamiseks parameetrite komplekte vastavalt (kaamera võimendus=16, säriaeg=109 ms, LED intensiivsus=10; kaamera võimendus=24, säriaeg=557 ms, LED intensiivsus=5).

Parameetrite valikul lähtuti fluorestsentsligandi fotopleekumise minimeerimisest ja fluorestsentskiirguse intensiivsuse jäämisest kaamera dünaamilisse alasse (16 bitine OME-TIFF failiformaat).

M₁ MR sisaldava pungunud bakuloviiruse preparaadi tootmine

Viiruse tootmise alustamiseks paljundati Sf9 rakke ruumalani 900 ml ning rakutiheduseni $2,0 \cdot 10^6$ rakku/ml. Eelnevalt toodetud M₁ MR kodeeriva geeniga bakuloviirus tiitriti kasutades ICSE meetodit (Laasfeld *et al.* 2017). Rakkudele lisati 100 ml eelnevalt toodetud bakuloviiruse suspensiooni nii, et nakatuskordsus kolvis oli 3,5. Rakkude elumust jälgiti nagu varasemalt kirjeldatud ning elumuse langemisel alla 20% koguti rakususpensiooni supernatant tsentrifuugimisel kiirendusega 1300 g 10 minuti vältel. Saadud viiruse suspensiooni 50-kordseks kontsentreerimiseks tsentrifuugiti seda kiirendusega 48 000 g 40 minutit temperatuuril 4 °C. Selle tulemusel sadenesid bakuloviiruseosakesed tsentrifuugituubi põhja. Supernatant eemaldati, sadet pesti supernatandi jääkide eemaldamiseks 500 µl puhverlahusega üks kord ning seejärel resuspendeeriti sade 500 µl modifitseeritud Krebs-Ringer puhvris. Modifitseeritud Krebs-Ringeri puhvri komponendid on 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 11 mM Na-HEPES (pH=7,4), 0,1% Pluronic F-127 (Invitrogen) ja EDTA-vaba proteaasi inhibiitori kokteil (Sigma-Aldrich). Igast tuubist kogutud kontsentreeritud bakuloviiruse suspensioonid segati ning suspendeeriti uuesti kasutades 1 ml Neoject süstalt (Neomedic Ltd.).

Fluorestsentsanisotroopia katsed M₁ MR bakuloviiruse preparaadiga

Fluorestsentsanisotroopia katsed teostati vastavalt varem avaldatud protokollidele (Veiksina *et al.* 2014) viies sisse süsteemispetsiifilised parameetrid. Töös kirjeldatud fluorestsentsanisotroopia meetodi katsed on teostatud koostöös Hana Dankovaga (Karli Ülikool Prahas). Konkureerivast ligandist UR-SK-III-59 valmistati sõltuvalt kuuekordsed seerialahjendused (alustades 10 µM kontsentratsioonist) modifitseeritud Krebs-Ringer puhvris 96 süvendiga läbipaistmatul lamedapõhjalisel mikrotiiterplaadil (Corning). Fluorestsentsligandi MK342 (sünteesitud Dr. Max Kelleri töörühmas Regensburgi Ülikoolis) emalahusest valmistati vahetult enne katset lahjendus modifitseeritud Krebs-Ringeri puhvris ning viidi see katseplaadile, et saavutada 5 nM lõppkontsentratsioon. Viimase komponendina viidi süvenditesse bakuloviiruse suspensioon saavutades igas süvendis lõppruumala 100 µl. Tühiproovi sisaldavatesse süvenditesse (*ingl. k. Blank*) fluorestsentsligandi ei lisatud. Vahetult pärast plaadile bakuloviiruse suspensiooni viimist asetati plaadile isevalmistatud

aurustumisvastane katteklaasidega kaas. Paralleelse ja risti polarisatsioonitasandiga fluorestsentsintensiivsuse mõõtmiseks kasutati spektrofluorimeetrit Synergy Neo Microplate Reader (BioTek). Mõõtmisel kasutati ergastamiseks polariseerivat filtrit ja valgusfiltrit (530 nm, ribalaius 30 nm) ning emissiooni mõõtmisel valgusfiltrit (590 nm, ribalaius 35 nm) ning polariseerivat kiirelõhestit (*ingl. k. beamsplitter*). Detektoritena kasutati kahte fotoelektronkordistit vastavalt ergastustasandiga paralleel -ja ristpolariseeritud fluorestsentskiirguse intensiivsuse mõõtmiseks. Fotoelektronkordistite dünoodide pinge kalibreeriti eelnevalt kasutades standardainena fluorofoori erütrosiin B (Thompson *et al.* 2002). Mikrotiiterplaati mõõdeti kineetilises žiimis kuni signaali stabiliseerumiseni või kuni üheksa tundi.

Tarkvaraarendus

Aparecium tarkvara loomiseks kasutati programmeerimiskeeli Matlab ja Java. Matlab-i koodi kirjutamiseks kasutati samanimelist Matlab keskkonda (R2016a) (MathWorks). Java programmeerimiseks kasutati integreeritud programmeerimiskeskkonda Eclipse neon.2 (Eclipse Foundation, Inc.) ning Java versiooni Java SE 6 (Oracle Corporation), et tagada ühilduvus vanemate Matlab versioonidega. Tarkvara on testitud Windowsi operatsioonisüsteemidel (Microsoft Corporation) Windows 10, Windows 8.1 ja Windows 7. Javat kasutati mikroplaadi simulatsiooni mooduli arendamiseks, teised töös nimetatud moodulid on loodud Matlab keeles.

Andmehaldus ja statistiline analüüs

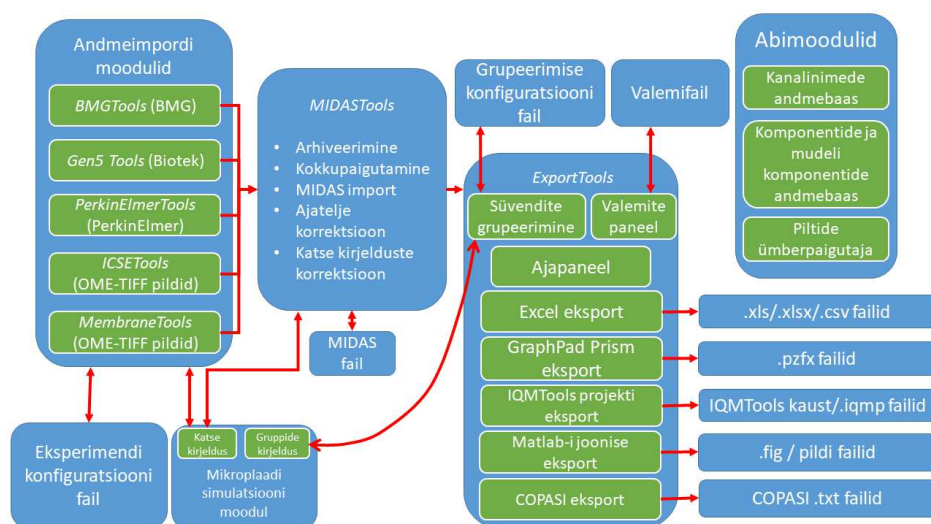
Piltide statistilise analüüsi jaoks kasutati Aparecium tarkvara mooduleid *ICSETools* ja *MembraneTools*. Fluorestsentsanisotroopia katseteandmete impordiks kasutati Apareciumi *Gen5Tools* moodulit. Metaandmete lisamiseks kasutati Apareciumi mikroplaadi simulatsiooni moodulit. Andmehalduseks ja eksportimiseks kasutati mooduleid Apareciumi *MIDASTools*, *ExportTools* ning mikroplaadi simulatsiooni moodulit ning eLabFTW keskkonda (<https://www.elabftw.net/>). Matemaatiliste mudelite loomiseks kasutati IQMTools (V1.2.2.2) (IntiQuan) ja GraphPad Prism (v5.00.288) (GraphPad Software Inc.) tarkvara. Mudelite andmetele sobivuse hindamiseks kasutati Akaike informatsiooni kriteeriumit (Akaike 1974). Akaike informatsiooni kriteerimi tõenäosusfunktsioonina kasutati märgitesti (*ingl. k. sign test*) ja Wald-Wolfowitzi seeriatesti (*ingl. k. runs test*) p väärtuste korrutist. Mudelite optimeerimiseks kasutati Nelder-Meadi algoritmi (Nelder and Mead 1965). Membraanituvastusalgoritmi optimeerimiseks kasutati geneetilist algoritmi.

TULEMUSED JA ARUTELU

Aparecium tarkvara

Tarkvara ülesehitus

Aparecium tarkvara ülesehitusel (**Joonis 1**) lähtuti kirjanduse ülevaates tõstatatud probleemidele lahenduste pakkumisest. Aparecium tarkvara tsentraalne tööriist on *MIDASTools*, mis pakub erinevaid võimalusi MIDAS (*Minimum Information for Data Analysis in Systems Biology*) failidega opereerimiseks. MIDAS formaat täidab tsentraalse ja standardiseeritud failiformaadi rolli ning selle olemust selgitatakse edaspidi pikemalt. Erinevate andmefailide lugemise jaoks sisaldab Aparecium mitud impordimoodulit. MIDAS formaadis failide loomise võimalusi pakuvad kõik impordimoodulid. MIDAS failide teisendamiseks teisteks väljundformaatideks on loodud ekspordimoodul *ExportTools*. Kuna andmeanalüüsil tuleb tihti ette mõnede operatsioonide kordamist, siis selle lihtsustamiseks on tarkvarasse lisatud võimalus salvestada ja laadida konfiguratsioonifaile. Kuna enamus katseid põhineb mikrotiiterplaadi formaadil, siis katsekirjelduste lisamiseks ja süvendite grupeerimiseks on loodud mikroplaadi simulatsiooni moodul. Selliselt ülesehitatud tarkvara sobib eelnevalt nimetatud probleemide lahendamiseks hästi. Kuna impordi ja ekspordi moodulid on MIDAS formaadi vahendusel üksteisest sõltumatud, siis saab lisada uusi impordimooduleid ilma otsese vajaduseta teha muudatusi ekspordimoodulisse ning vastupidi. Olulisemate moodulite ja komponentide täpsemat toimimist kirjeldatakse detailsemalt järgmistes peatükkides



Joonis 1. Aparecium tarkvara üldise ülesehituse skeem. Nooled näitavad andmete liikumist erinevate moodulite ja failide vahel. Apareciumi on võimalik kasutada enam kui 20 erineva graafilise kasutajaliidese abil. Apareciumi arendamisel on kasutatud nii funktsionaalset kui ka objekt orienteeritud lähenemist ning kokku koosneb tarkvara rohkem kui 200 klassist või suuremast funktsioonist ning rohkem kui 50 000 koodireast.

MIDASTools moodul ja MIDAS formaat

MIDASTools on Apareciumi MIDAS failidega opereerimise moodul. *MIDASTools* lubab teostada operatsioone nagu uute sündmuste lisamine, eemaldamine ja muutmine, ühikute teisendamine, MIDAS failide salvestamine ja laadimine, MIDAS failide ühendamine ja MIDAS failide viimine *ExportTools* moodulisse. Nende operatsioonide sujuva toimimise tagab biokeemiliste andmete ja metaandmete kirjeldamiseks hästi sobiv MIDAS faili andmemudel.

MIDAS formaat põhineb CSV (*ingl. k. Comma Separated Values*) failiformaadil, kuid praktikas võib Apareciumis kasutamiseks MIDAS faili salvestada nii CSV, xls kui ka xlsx failidena. MIDAS faili algne kuju on adapteeritud *DataRail* tarkvarast (Saez-Rodriguez *et al.* 2008) ning selle üldine ülesehitus on küllaltki lihtne. Iga rida tabelis vastab ühele katse käigus toimunud sündmusele. Sündmused jaotuvad mõõtesündmusteks ning lisamissündmusteks. Nende sündmuste erinevus seisneb selles, et lisamissündmusega ei ole seotud mõõteväärtusi ning mõõtmis-sündmuste korral jääb iga komponendi sisaldus vastavas süvendis võrreldes eelmise sündmusega samaks. MIDAS failis on sõltuvalt vajadusest erinev hulk tulpasid, mis jaotuvad nelja klassi. Eesliitega „ID:“ (*ingl. k. identifier*) algavad tulbad on süvendite identifitseerimiseks. Read, millel on vastavalt võrdsed kõik identifitseerimistulba elemendid tähendab, et tegemist on sama mõõtesüvendiga. Aparecium tarkvaras on kasutusel kaks identifitseerimistulpa. „ID:plate“ vastab mõõteplaadile ning „ID:well“ vastab mõõtesüvendile plaadil. Teine grupp tulpasid algab eesliitega „TR:“ (*ingl. k. treatment*) ning need vastavad süvendi keemilistele ja bioloogilistele komponentidele. Kolmas tulpade grupp algab eesliitega „DA:“ (*ingl. k. data acquisition*) ning see määrab mõõtmise ajahetke. „DA:ALL“ kasutamisel kehtib mõõtmise aeg kõikidele mõõdetud parameetritele. Apareciumis on tüüpiliselt kasutusel ühe ajatulbaga MIDAS faili variant. Neljas tulpade grupp algab eesliitega „DV:“ (*ingl. k. data values*) ning need tulbad tähistavad erinevaid mõõdetud parameetreid. Sõltuvalt katsetüübist võib mõõtetulpade arv varieeruda laias vahemikus. Tulbad on vasakult paremale organiseeritud järjekorras „ID:“, „TR:“, „DA:“ ning „DV:“. Nimetatud viisil ülesehitatud tabeli näidis on tootud **lisana 1**.

Impordimoodulid

Kuna mõõtetulemuste failides sisalduvat infot mõjutab nii katseformaat kui ka mõõtmiseks kasutatud spektrof fluorimeeter, siis ei ole nende failide põhjal MIDAS failide loomine triviaalne ning nõuab analüüsija sekkumist. Aparecium sisaldab mitut impordimoodulit, mis lihtsustavad MIDAS failide loomist. Impordimoodulitele on seatud peamiselt kaks ülesannet.

Esimene ülesanne on mõõteandmete korrastamine, mis on vajalik peamiselt sisendfailis esineva ajatelje ebatäpsuse tõttu. Sõltuvalt spektrofleurimeetrist ja mõõtmise juhtimiseks kasutatavast protokollist on võimalik mõõta kas üks või mitu andmematriksit. Kui ekspordiformaadist on puudu kahe või enama andmematriksi vaheline ajanihe, on võimalik katse sooritamisel see aeg vastavast masinatarkvarast sõltumatult mõõta. Selle ajanihke kestus on omakorda võimalik sisestada impordimooduli kaudu. Masina ülesehituse tõttu teostavad plaadilugejad mõõtmised süvend-süvendi haaval, kuid andmematriksis raporteerivad tüüpiliselt vaid mõõtettsükli alguse ajahetke. Ühe mõõtmistsükli minimaalne pikkus sõltub paljudest parameetritest, millest olulisemateks on ühe tsükli jooksul mõõdetavate süvendite arv, üksikmõõtmiste arv süvendi kohta igas tsükli ning aeg, mis kulub spektrofleurimeetril järgmise süvendi liigutamiseks detektori ette. See põhjustab jällegi ebatäpsust mõõtmise aja määramisel. Samas kasvab ühe mõõtettsükli teostamiseks kulunud aeg süvendite arvuga esimeses lähenduses lineaarselt, mis lubab, teades mõõtettsükli pikkust, süvendite arvu ja süvendite mõõtmise järjekorda, arvutada välja iga mõõtmise täpsema aja, parandades oluliselt andmekvaliteeti. Selline parandus on seda olulisem, mida rohkem mõõdetakse süvendeid ja mida kiiremat kineetilist protsessi uuritakse. Kineetiliste parameetrite mõõtmisele orienteeritud katsete puhul lubavad kirjeldatud funktsioonid katse ajatelje täielikult taastada.

Impordimoodulite teine ülesanne on mõõteandmete ja katse metaandmete ühendamine MIDAS formaadis failiks. Biokeemilise katse metaandmed on katses kasutatavate keemiliste või bioloogiliste komponentide nimetused, kasutatud hulgad, kokkusegamise järjekord ning lisamise aeg. Nende ülesannete täitmiseks on impordimoodulites vastav eksperimendi konfiguratsiooni paneel. Selleks, et määrata igas süvendis sisalduva komponendi hulk ning vastava komponendi lisamise aeg, on võimalik kasutada mikroplaadi simulatsiooni moodulit katse kirjelduse režiimis. Kuna metaandmed on tihti katsete vahel sarnased, siis on võimalik eksperimendi konfiguratsiooni paneelil sisestatud metaandmed salvestada eksperimendi konfiguratsioonifailidena, mida saab taaskasutada korduskatsete või sarnase ülesehitusega katsete metaandmete lisamiseks või modifitseerimiseks.

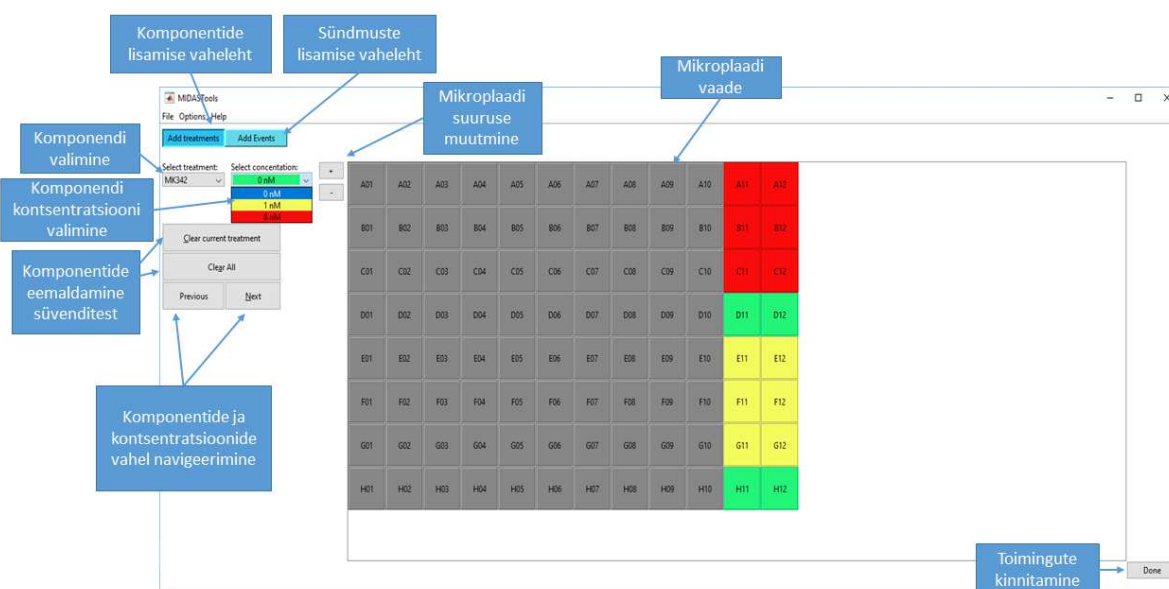
Iga Apareciumi impordimoodul on disainitud üldjuhul importima ühe spektrofleurimeetri tootja faile, kuna tavaliselt on mitut erinevat spektrofleurimeetri mudelit tootvatel ettevõtetel loodud nende juhtimiseks üks tarkvara ja sarnase ülesehitusega ekspordiformaat. Siinkohal on erandiks impordimoodulid, mis kasutavad sisendina pilte. Sellisel juhul on toorandmete formaat OME-TIFF pilt, mis on paindlik ja standardiseeritud failiformaat mikroskoopiapiltide salvestamiseks, kuid mille analüüs nõuab sõltuvalt meetodist täiesti erinevat pilditöötlusalgoritmi. Pilditöötlust

rakendavate impordimoodulite võimaluste hulka kuulub lisaks originaalandmete sisselugemisele ka mikroskoopiapiltide töötlus ja analüüs.

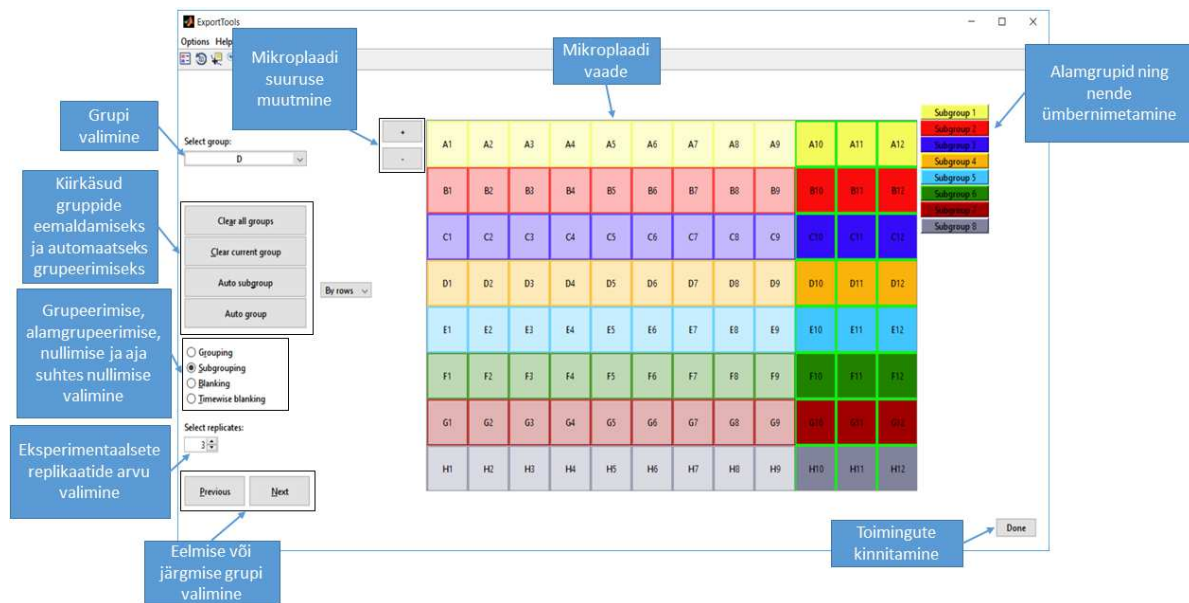
Mikroplaadi simulatsiooni moodul

Kuna tüüpilised biokeemilised katsed põhinevad mikroplaadi kasutamisel, siis on hilisem metaandmete lisamine vastavale katsele kõige intuitiivsem, kui seda sama katseplaati on kujutatud ka graafilisel kasutajaliidesel. Mikroplaadi simulatsiooni moodulit saab kasutada kahes erinevas režiimis.

Esimene võimalus on mikroplaadi simulatsiooni moodulit kasutada katsekirjelduse lisamiseks (PlateSimulator) (**Joonis 2**). Kasutajaliideses on rippmenüü abil võimalik valida, millise komponendi sisalduse metaandmeid parasjagu lisatakse ning teise rippmenüü abil, milline kvantitatiivne väärtus selle komponendi sisaldust vastavas süvendis kirjeldab. Selleks, et erinevate komponentide ja sisalduste vahel navigeerimine oleks võimalikult mugav, on moodulisse lisatud ka kiirklahvide kombinatsioonid. Kui katse käigus ei ole ained lisatud kõik korraga vaid kindlas järjekorras teatud ajavahemike järel, siis on mikroplaadi simulatsiooni mooduli sündmuste paneeli abil võimalik kirjeldada komponentide lisamise sündmusi. Nende funktsioonide abil on võimalik katse käiku üheselt kirjeldada, mis on nii masin- kui ka inimloetav.



Joonis 2. Mikroplaadi simulatsiooni mooduli vaade katse kirjeldamisel. Kasutajaliidese abil on võimalik lisada virtuaalsele mikrotiiterplaadile katses kasutatavate komponentide analüütilised sisaldused. Virtuaalne mikrotiiterplaat teeb värvikodeeringute abil süvendite ja komponentide kokkuviimise lihtsaks. Halliga on tähistatud mikrotiiterplaadi süvendid, mida antud katses ei mõõdetud.



Joonis 3. Mikroplaadi simulatsiooni moodul gruppide kirjeldamisel. Kasutajaliidese abil on võimalik süvendeid virtuaalsel mikrotiterplaadil lisada gruppidesse ja alamgruppidesse. Värvikodeeringute abil on lihtne grupe ja alamgrupe süvenditega kokku viia. Valitud gruppi kuuluvad süvendid on alamgrupivaates esitatud erksavärviliselt ning ülejäänud süvendid tuhmistatult, alamgrupid ja süvendid on võimalik kokku viia värvikodeeringute järgi. Kiirkäskude abil on võimalik süvendeid automaatselt gruppidesse ja alamgruppidesse jagada.

Teine võimalus plaadi simulatsiooni mooduli kasutamiseks on süvendite grupeerimine (GroupingSimulator) (Joonis 3). Sõltuvalt eksperimendi disainist ning hilisematest arvutustest on tihtipeale vaja proovi mõõteväärtusest lahutada tühiproovi mõõteväärtus, see mõne teise süvendi mõõteväärtusega jagada, näiteks normaliseerimiseks, või ka sama süvendi eelmise mõõteväärtusega jagada selleks, et arvutada mõõteparameetri suhtelist muutumist ajas. Selle saavutamiseks on võimalik süvendid jagada gruppidesse, mis jagavad omavahel tühiproovi süvendeid, ja alamgruppidesse, mis tähistavad eksperimentaalseid replikaate. Üks spetsiaalne alamgrupp on tühiproovi süvend, mis kehtib kogu süvendite grupi jaoks. Tühiproovi süvendeid on võimalik ka gruppide vahel jagada, kui andmete organiseerimise loogika kohaselt kuulub üks tühiproovi süvend mitmesse gruppi. Ajas normaliseerimiseks on võimalik märgistada iga süvendi jaoks eraldi üks või mitu mõõtmistsükli, mille väärtusi ajas normaliseerimiseks kasutatakse. Loodud grupe ja alamgrupe saab nimetada vastavalt kasutaja eelistustele nii, et need määraks üheselt ja selgelt vastava grupi või alamgrupi katselise sisu. Mitmel juhul suudab automaatse grupeerimise moodul süvendid nendes sisalduvate komponentide hulga järgi grupeerida automaatselt muutes grupeerimise veelgi kiiremaks.

Ekspordimoodul

Apareciumi ekspordimoodul on *ExportTools*. Ekspordimoodul koosneb kolmest peamisest paneelist. Grupeerimise paneel lubab plaadil olevaid süvendeid grupeerida kasutades mikroplaadi simulatsiooni moodulit gruppide kirjeldamise režiimis, määrata gruppide arvu ja

gruppe ning alamgrupe ümber nimetada. Lisaks on selle paneeliga võimalik laadida ja salvestada grupeerimise konfiguratsioonifaile. Teine paneel on üldseadete paneel, mis lubab muuta ekspordiformaadist sõltumatuid eksportimise parameetreid. Nende seadete hulgas on mõõteandmetega matemaatiliste operatsioonide läbiviimine ning ajaga seotud seadete muutmine. Matemaatiliste operatsioonide läbiviimiseks on olemas võrrandi paneel. Selle paneeli abil on võimalik mõõteandmetega läbi viia mõningaid enimlevinud arvutusi nagu näiteks tühiproovi väärtuse lahutamist, fluorestsentsanisotroopia arvutamist ja summaarse fluorestsentsintensiivsuse arvutamist, sisestada uusi võrrandeid ning loodud võrrandite kombinatsioone salvestada ja eelnevalt salvestatud võrrandeid importida. Kolmas paneel on ekspordi eelvaate paneel, mis koosneb mitmest alampaneelist. Selle paneeli abil saab muuta seadeid, mis on vastavale ekspordiformaadile spetsiifilised ning kuvada ekspordi eelvaadet.

Konfiguratsioonifailid

Andmeanalüüsi käigus tekib tihti olukord, kus andmeid tuleb uuesti analüüsida näiteks mõne varem tähelepanuta jäänud efekti kirjeldamiseks. Olenevalt olukorrast on uuesti analüüsimiseks vaja kasutada kas eelmise analüüsiga sama või mõnda muud tarkvara ning eksportida andmeid vähesel määral muudetud kujul. Operatsioonide sellisel kujul kordamine võib andmeanalüüsil põhjustada kasutajapoolseid vigu ning kulutab andmete analüüsiks kuluvat aega. Nende probleemide vältimiseks, on *Apareciumis* võimalik kasutada kolme eri tüüpi konfiguratsioonifaile.

Eksperimendi konfiguratsioonifailid võimaldavad salvestada katses kasutatud ainete nimesid, koguseid ja ühikuid. Konfiguratsioonifaile saab nii laadida kui ka salvestada *impordimoodulites* ja *MIDASTools* moodulis. Eksperimendi konfiguratsioonifailide kasutamine aitab säilitada ka erinevate ainete ühtlast nomenklatuuri MIDAS failide vahel ühe projekti raames.

Grupeerimise konfiguratsioonifailid sisaldavad kogu infot, mis sisestatakse *ExportToolsi* grupeerimise paneelil ehk gruppide ja alamgruppide nimesid, süvendite paiknemist gruppides ja alamgruppides ning nullsüvendite paiknemist ja mõõtmistsükli indekseid, mida iga süvendi puhul kasutatakse aja järgi normaliseerimiseks. Grupeerimise konfiguratsioonifailid on kasulikud peamiselt kahel juhul. Esiteks, kui on tarvis sama katse andmeid analüüsida mõne teise tarkvara või võrrandiga, kuid süvendite omavaheline suhe on sama. Teiseks, kui katsete disain süvendite omavahelise paiknemise aspektist on sama nagu näiteks korduskatsete tegemisel.

Valemifailid sisaldavad andmetete töötlemiseks vajalikke matemaatilisi operatsioone, mis sisestatakse *ExportTools*si võrrandipaneeli abil. Valemifailid aitavad tagada andmete ühest analüüsi projekti raames ning vältida võrrandite sisestamisel tehtavaid vigu.

Aparecium tarkvara kasutamine ja saadavus

Aparecium on vabavaraline avatud lähtekoodiga tarkvara, biokineetiliste andmete standardiseerimiseks, haldamiseks ja töötamiseks. Aparecium tarkvara on saadaval nii TÜ Bioorgaanilise keemia õppetooli kodulehel <http://gpcr.ut.ee/aparecium.html> kui ka Github keskkonnas <https://github.com/laasfeld/Aparecium> ning seda täiendatakse pidevalt. Õpetused, abi ja videod on saadaval <http://gpcr.ut.ee/uploads/ApareciumHelp/Aparecium.html>.

Aparecium tarkvara rakendusnäited

Katseandmete haldamine ja töötlus

Selleks, et arendada matemaatilise modelleerimise meetoditega signaaliülekanne mehhanismi etappide kineetilisi ja tasakaalulisi mudeleid on tüüpiliselt vaja teostada suhteliselt suur hulk mõõtmisi erinevatel tingimustel. Peamiselt varieeritakse mõõtmise aega, ainete lisamise järjekorda, konkureeriva ligandina kasutatavat ainet ning selle aine kontsentratsiooni ja katses kasutatava retseptorpreparaadi hulka ning reporterligandi kontsentratsiooni. Lisaks tuleb igale katsele sooritada ka päevadevahelise varieeruvuse hindamiseks korduskatsed. Selle tulemusel tekib arvestatav hulk toorandmeid, mis on jaotunud erinevate failide vahel, mis nõuab andmete organiseerimist ja puhastamist. Seetõttu on andmeanalüüsi üks aeganõudvamaid etappe toorandmete puhastamine ning analüüsiks kasutatavate andmete kvaliteedi tagamine. Selleks, et olulisel määral vähendada andmete puhastamiseks kuluvat aega, on tarvis enne projekti algust koostada andmehaldusplaan, mis kirjeldab, kuidas toimub failide nimetamine ja organiseerimine ning metaandmete lisamine. Mikroplaadilugejatel ning biopiltidel põhinevate uurimuste teostamiseks on võimalik andmehalduseks ja -töötamiseks kasutada Aparecium tarkvara ning seda võimalust on juba kasutatud mitme lõppenud teadusprojekti teaduprojekti raames (**Tabel 1**) ning paljude käimasolevate projektide jaoks.

Rakendusnäide	Kasutatud moodulid	Toorandmed
Automatiseeritud meetodi arendamine bakuloviiruste tiitrimiseks (Laasfeld 2016; Laasfeld <i>et al.</i> 2017)	<i>ICSETools, PlateSimulator, GroupingSimulator, MIDASTools, ExportTools</i>	~300 GB, OME-TIFF pildid
A Selective Biligand Inhibitor of CK2 Increases Caspase-3 Activity in Cancer Cells and Inhibits Platelet Aggregation (Rahnel <i>et al.</i> 2017)	<i>Gen5Tools, PlateSimulator, GroupingSimulator, MIDASTools, ExportTools</i>	~ 300 GB, OME-TIFF pildid
Development of assay systems for studying ligand binding to dopamine receptors (Allikalt 2018)	<i>Gen5Tools, ICSETools, MembraneTools, PlateSimulator, GroupingSimulator, MIDASTools, ExportTools</i>	~100 GB, OME-TIFF pildid
Melanokortiin-4 retseptori aktivatsiooni uurimine (Tahk 2016)	<i>Gen5Tools, ICSETools, PlateSimulator, GroupingSimulator, MIDASTools, ExportTools</i>	~5 MB, Gen5 ASCII failid
Apoptoosi mõõtmine rakkudes kaspas-3 substraadil põhineva biosensorsüsteemiga (Tahk 2018)	<i>Gen5Tools, PlateSimulator, GroupingSimulator, MIDASTools, ExportTools</i>	~2 TB, OME-TIFF pildid
Characterization of ligand binding to melanocortin 4 receptors using fluorescent peptides with improved kinetic properties (Link <i>et al.</i> 2017)	<i>BMGTools, PlateSimulator, GroupingSimulator, MIDASTools, ExportTools</i>	~20 MB, BMG ASCII failid

Tabel 1. Ülevaade teadusprojektidest, mille käigus on Apareciumit kasutatud andmetöötuseks ja andmehalduseks, ning mille katseline osa on lõppenud.

Apareciumi laialdane ja edukas kasutuselevõtt näitab, et selle kasutamine aitab andmete organiseerimisele ja analüüsile oluliselt kaasa. Samuti on Aparecium võimaldanud palju suuremal andmemahul põhinevate teadustööde läbiviimist, kuna varasemalt oli biopiltidel põhinevate mõõtmiste teostamine raskendatud just piltide töötlemise ja tulemuste haldamise tõttu. Samuti on **tabelis 1** toodud teadustööd tõestanud Aparecium tarkvara arhitektuuri sobilikkust. Näiteks on ICSETools (Laasfeld *et al.* 2017), MembraneTools (Allikalt 2018), ja Gen5Tools (Tahk 2016) moodulid lisatud pärast esmase tarkvaraarhitektuuri paikapanemist ja esimeste moodulite loomist. Uute moodulite lisamine on osutunud kiireks ja mugavaks tänu olemasolevate tarkvarakomponentide taaskasutamisele ning moodulite omavahelisele suhtelisele sõltumatussele.

Retseptor-ligand interaktsioonide modelleerimine M_1 MR ja Y_1R näitel

Ligandi sidumise MR-le on keeruline protsess, mida ei ole olnud võimalik lihtsustatud mudelitega kirjeldada. Fluorestsentsanisotroopia meetodi eripära annab hea võimaluse mõõta

retseptor-ligand interaktsiooni kineetikat, mille saamine teiste meetoditega on mõnevõrra raskendatud.

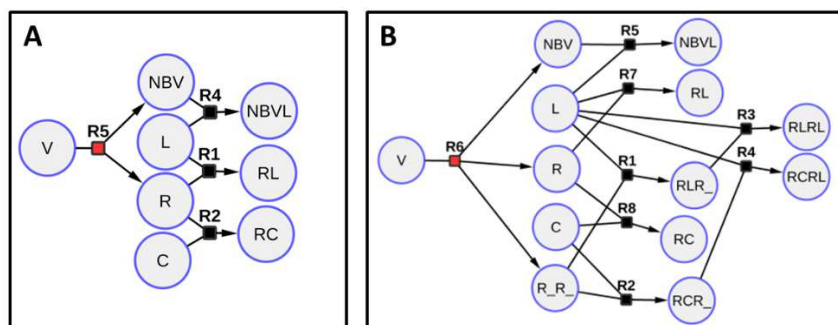
M_1 MR ligandi seostumise protsessi kirjeldamiseks kasutati fluorestsentsanisotroopia meetodi mõõtetulemusi ning nende analüüsimiseks kasutati tervikanalüüsi metoodikat modifitseeritud versiooniga tarkvarast IQMTools. Tervikanalüüsi korral luuakse süsteemi kirjeldamiseks harilike diferentsiaalvõrrandite süsteem, kus iga võrrand kirjeldab ühte toimuvat keemilist reaktsiooni. Diferentsiaalvõrrandite süsteemi vabad parameetrid on sellisel juhul keemiliste reaktsioonide päri- ja vastassuunalised kiiruskonstandid, retseptorpreparaadi kontsentratsioon ning fluorestsensligandi erinevate vabade ja seotud vormide fluorestsentsanisotroopia väärtused.

Kuna ei olnud selge, milline mudel on sobiv mõõdetud süsteemi kirjeldamiseks, siis koostati erinevatel eeldustel põhinevad mudelid ning kasutati neid fluorestsentsanisotroopia tulemuste kirjeldamiseks.

Esimene mudel, mille paikapidavust kontrolliti oli kõige lihtsam võimalikest retseptor-ligand interaktsioonide kirjeldamiseks kasutatavatest. Selle mudeli korral eeldatakse, et kõik ligandid reageerivad retseptoritega 1:1 vahekorras, mitme erineva ligandi seostumine ühele retseptormolekulile pole lubatud, retseptorid ei saa esineda dimeeridena ning seega esinevad ainult monomeeridena. Lisaks on võimalik fluorestsensligandi mittespetsiifiline sidumine, näiteks adsorptsioon bakuloviiruse membraanile. Nende eelduste põhjal koostatud **mudeli 1** reaktsioonikaart on kujutatud **joonisel 4A** ning täielik mudel on toodud **lisana 2**.

Teise mudeli korral loobuti esimese mudeli eeldusest, et kõik sidumistaskud seovad kõiki ligande võrdväärselt. Selle asemel esineb kolme erinevat tüüpi sidumistaskuid, mille korral erinevad sidumistaskuga interakteerudes nii fluorestsensligandi kui ka märgistamata ligandide kineetilised ja tasakaalukonstandid. Kolme eri tüüpi spetsiifiliste sidumistaskute esinemist võib selgitada näiteks retseptorite homodimeriseerumisega, mida on M_1 MR vahel varem otseselt jälgitud, ning nii retseptormonomeeri kui ka -dimeeri samaaegse esinemisega. Samuti on eeldatud, et erinevate sidumistaskutega sidumise korral võib fluorofoori rotatsiooniline vabadus erineda ning viia erineva iseloomuliku FA väärtuseni. Siiski ei ole võimalik kindlalt väita, et homodimeriseerumine on näiliselt kolme eri tüüpi sidumistasku esinemise põhjus, kuna sarnaseid efekte võivad kasutatud katsesüsteemis potentsiaalselt põhjustada ka teised keemilised või fotofüüsikalised protsessid nagu näiteks pleekimine või fluorestsentskustutamine. Antud juhul loeti kirjeldatud selgitus siiski kõige tõenäolisemaks

toetudes varasemalt avaldatud tulemustele. Selliste eelduste põhjal konstrueeritud **model 2** reaktsioonikaart on kujutatud **joonisel 4B** ning täielik model on toodud **lisana 3**.

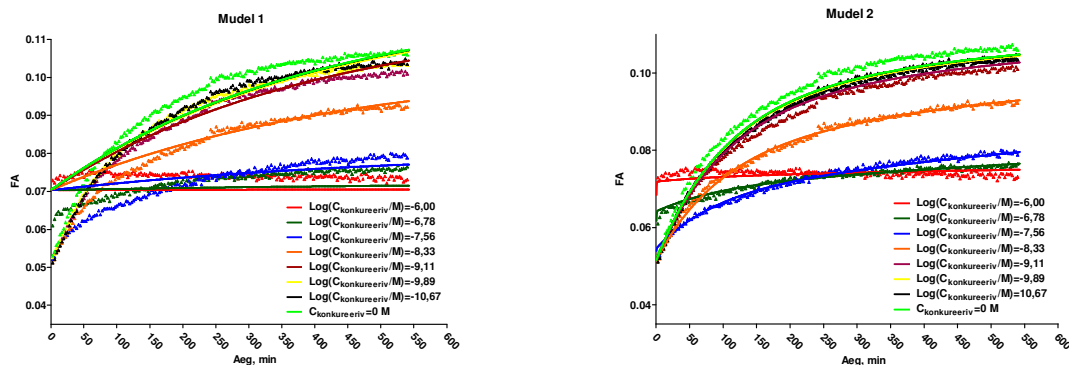


Joonis 4. Mudel 1 (A) ja mudel 2 (B) reaktsioonikaardid. Punase ruuduga (■) on tähistatud pöördumatuid reaktsioone, musta ruuduga (■) on tähistatud pöörduvaid reaktsioone. Ringides on kujutatud vastavas reaktsioonis osalevad ained.

	Vabu parameetreid	Logaritmiline tõepära	AIK
Mudel 1	13	-656,5	1339
Mudel 2	23	-267,8	581,6

Tabel 2. Mudelite sobivuse võrdlus Akaike informatsiooni kriteeriumi järgi. Sobivam mudel on see, millel on vähim AIK väärtus.

Selgitamaks välja, kumb mudel on antud süsteemi kirjeldamiseks sobivam, võrreldi omavahel mudelite ja andmete vastavust kirjeldavaid parameetreid (**Tabel 2**). Selgub, et **mudel 2** korral on andmete ja mudeli vastavus oluliselt parem, kui **mudel 1** korral. Osaliselt saab keerulisema mudeli paremat andmetega sobivust alati selgitada suurema parameetrite hulgaga. Selleks, et võtta mudeli sobivuse hindamisel arvesse tasakaalu mudeli keerukuse ja selle ennustusvõime vahel, saab kasutada sobivaid statistilisi teste nagu näiteks Akaike informatsiooni kriteeriumit (AIK). **Mudel 1** kasutamise korral on selge, et mitmed esinevad fenomenid jäävad täielikult kirjeldamata, mille kirjeldamist lubab väga hästi **mudel 2** (**Joonis 5**). Näiteks ennustab **mudel 1**, et kiire mittespetsiifilise seostumise ja aeglase fluorestsentsligandi seostumise korral peab konkureerimiskatsetes FA väärtus jõudma kiiresti ühtlasele tasemele sõltumata konkureeriva ligandi kontsentratsioonist ning alles seejärel toimub FA väärtuse tõus sõltuvalt konkureeriva ligandi kontsentratsioonist. Katseandmetest selgub aga, et ka kõige esimeste mõõtettsüklite järel võib toimuda väga kiire FA väärtuse kasv, mis sõltub konkureeriva ligandi kontsentratsioonist. Lisaks kirjeldatud efektidele näitab **mudel 2** paremat sobivust ka AIK.

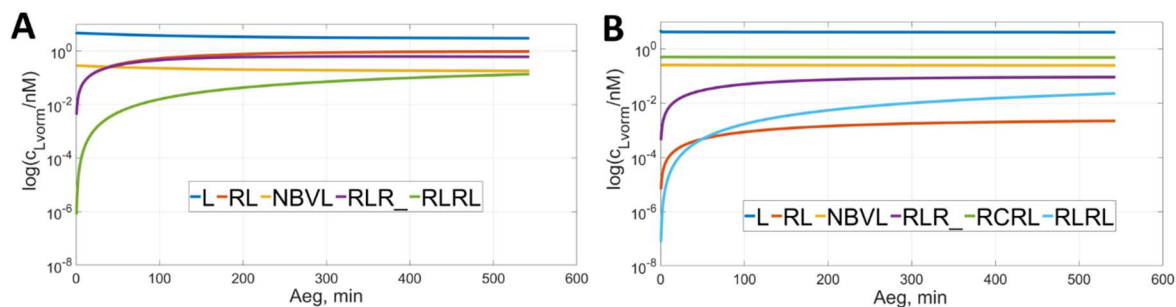


Joonis 5. FA sõltuvus süsteemis kasutatud konkureeriva ligandi UR-SK-III-59 kontsentratsioonist ja ajast. Selgub, et mudel 2 vastavus andmetele on Akaike informatsioonikriteeriumi järgi parem. Sama tulemuseni jõuab nii jääkliikmete analüüsil kui ka mudeli poolt ennustatavate efektide analüüsil. Katsetes oli segatud fluorestsentsligand MK342 ($c=5$ nM) ning $40 \mu\text{l}$ M_1 MR sisaldavat bakuloviiruse suspensiooni ning sõltvalt süvendist varieeruv kontsentratsioon konkureerivat ligandi UR-MK-III-59.

Mõlema mudeli optimeerimisprotsessile teostati osaline sensitiivsusanalüüs, mille käigus määrati mudeli parameetrite optimaalsed väärtused ja optimeerimisprotsessist tulenevad määramatused (Lisa 4).

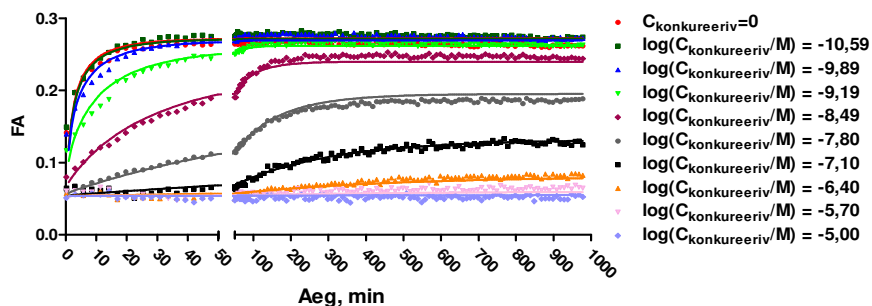
Teostatud konkureerimiskatsest selgub **mudel 2** põhjal, et konkureeriva ligandi puudumise korral jääb antud katseformaadi kasutamisel suur osa fluorestsentsligandist (L) retseptorile seostumata. Kõige kiiremini toimub mittespetsiifiline sidumine ning mittespetsiifiliselt seotud ligand (NBVL) on seotud ligandi vormidest (*ingl. k. state*) kõige levinum katse esimese 38 minuti jooksul. Samuti selgub, et 500 minuti möödudes on seotud ligandi vormidest kõige levinum retseptormonomeer-fluorestsentsligand (RL) kompleks ning retseptordimeeriga seotud üksiku fluorestsentsligandi (RLR_) kontsentratsioon on jäänud RL kontsentratsiooniga võrreldes madalamaks. Selle põhjuseks on osaliselt nii erinevad afiinsused monomeeri ja dimeeri suhtes kui ka RLRL kompleksi aeglane teke, mille eelduseks on eelnev RLR_ kompleksi olemasolu (**Joonis 6, B**). Kõige kõrgema konkureeriva ligandi kontsentratsiooni kasutamise korral selgub, et enamus fluorestsentsligandi on samuti vabas vormis lahuses nagu ka totaalse sidumise korral. Siiski on näha selge erinevus, et retseptormonomeeri (RL) teke on tugevalt tagasitõrjutud ning samuti on tagasitõrjutud RLR_ kompleksi teke. Sellistes tingimustes on fluorestsentsligandi seotud vormidest kõige levinud RCRL vorm, mis tekib väga kiiresti. Sellest võib järeldada, et konkureeriv ligand UR-SK-III-59 seostub kiiresti nii retseptormonomeerile kui ka retseptordimeeri esimesse sidumistaskusse ning dimeersele vormile seostudes indutseerib kiire fluorestsentsligandi seostumise dimeeri teise sidumistaskusse. Sellise efekti olemasolu võib selgitada näiteks efektiga, kus konkureeriva ligandi seostumine retseptordimeeri esimesse sidumistaskusse indutseerib teises sidumistaskus konformatsioonilise muutuse avatud vormi, kuhu on fluorestsentsligandil võimalik kiiremini

seostuda kineetilise barjääri kadumise tõttu. Samas ei pruugi **model 2** olla ainuke võimalik mudel vastava efekti selgitamiseks ning seetõttu ei saa kindlalt väita, et selline konformatsiooniline muutus toimub. Samas võib mudelite võrdlemisest järeldada, et **model 1** on kindlasti liialt lihtsustatud, et mõõdetud efekte selgitada. Kirjeldatud strateegia abil on tulevikus võimalik omavahel võrrelda veelgi enam mudeleid.



Joonis 6. Mudel 2 simulatsioon. A) Totaalse mõõtepunkti simulatsioon, kuhu oli lisatud fluorestsentsligand MK342 ($c=5$ nM) ning $40 \mu\text{l}$ M_1 MR sisaldavat bakuloviiruse suspensiooni, B) Mittespetsiifilise mõõtepunkti simulatsioon, kuhu oli lisatud fluorestsentsligand MK342 ($c=5$ nM), konkureeriv ligand UR-MK-III-59 ($c=10 \mu\text{M}$) ning $40 \mu\text{l}$ M_1 MR sisaldavat bakuloviiruse suspensiooni.

Siiski ei ole **model 1** sobimatus retseptor-ligand interaktsioonide kirjeldamiseks üldistatav kõigile G-valk seotud retseptoritele. Näiteks sobib **model 1** sama katseformaadi puhul Y_1R -ligand interaktsiooni kirjeldamiseks vastava retseptori ligandiga BIBO3304 (Joonis 7). Mudeli optimeeritud parameetrite väärtused on toodud lisana 5. Tulemusi võrreldes on selgelt näha, et Y_1R mõõtmistel on täielikult puudu efekt, kus kõrgem konkureeriva ligandi kontsentratsioon põhjustaks kiire efektina fluorestsentsanisotroopia väärtuse kasvu. Kuigi mõne konkureeriva ligandi kontsentratsiooni korral on selge, et mudeli ennustuses on süstemaatiline viga, siis nähtav efekt on suure tõenäosusega põhjustatud pipeteerimise määramatusest, kuna mudel on vastavates katsepunktides juba väga väikestele kontsentratsioonivariatsioonide suhtes tundlik.



Joonis 7. FA sõltuvus katses kasutatud konkureeriva ligandi kontsentratsioonist ja ajast. Katse modelleerimiseks on kasutatud mudelit 1. Konkureeriva ligandina on kasutatud Y_1R ligandi BIBO3304, fluorestsentsligandina TAMRA märgisega MC159 ($c=0,2$ nM) ning retseptorpreparaadina $0,5 \mu\text{l}$ Y_1R sisaldavat bakuloviiruse suspensiooni. Katse autor: Christoph Mueller.

Meetod dopamiin D₃ retseptor – ligand interaktsioonide uurimiseks elusrakkudes

Kuna retseptorsüsteemide uurimise peamine kaugem eesmärk on ravimiarendus, siis on ääremiselt oluline kontrollida *in vitro* mudelsüsteemides leitud efektide esinemist järk-järgult ka elussüsteemides. Kõige lihtsam võimalik elussüsteem on sobivat retseptorit ekspresseeriv rakukultuur. Rakukultuuridel põhinevaid meetodeid on palju, kuid mikroskoopiat rakendavad meetodid on kõige võimalusterohkemad. Üks võimalus retseptor-ligand interaktsioonide uurimiseks elusrakkudes on tuvastada rakumembraan ning kvantifitseerida membraanist lähtuv fluorestsentskiirgus. Membraani eelnev tuvastamine on vajalik, kuna fluorestsenspildi keskmise intensiivsuse põhjal järelduste tegemine on ebatäpne. Kuivõrd fluorestsentskanalit kasutatakse kvantifitseerimiseks, siis membraanide tuvastamiseks ei saa sama detektsioonikanalit enam kasutada ning seega tuleb kasutada näiteks heleväljakanalit. Mõõtmise üldpõhimõtte skeem on toodud **lisana 6**.

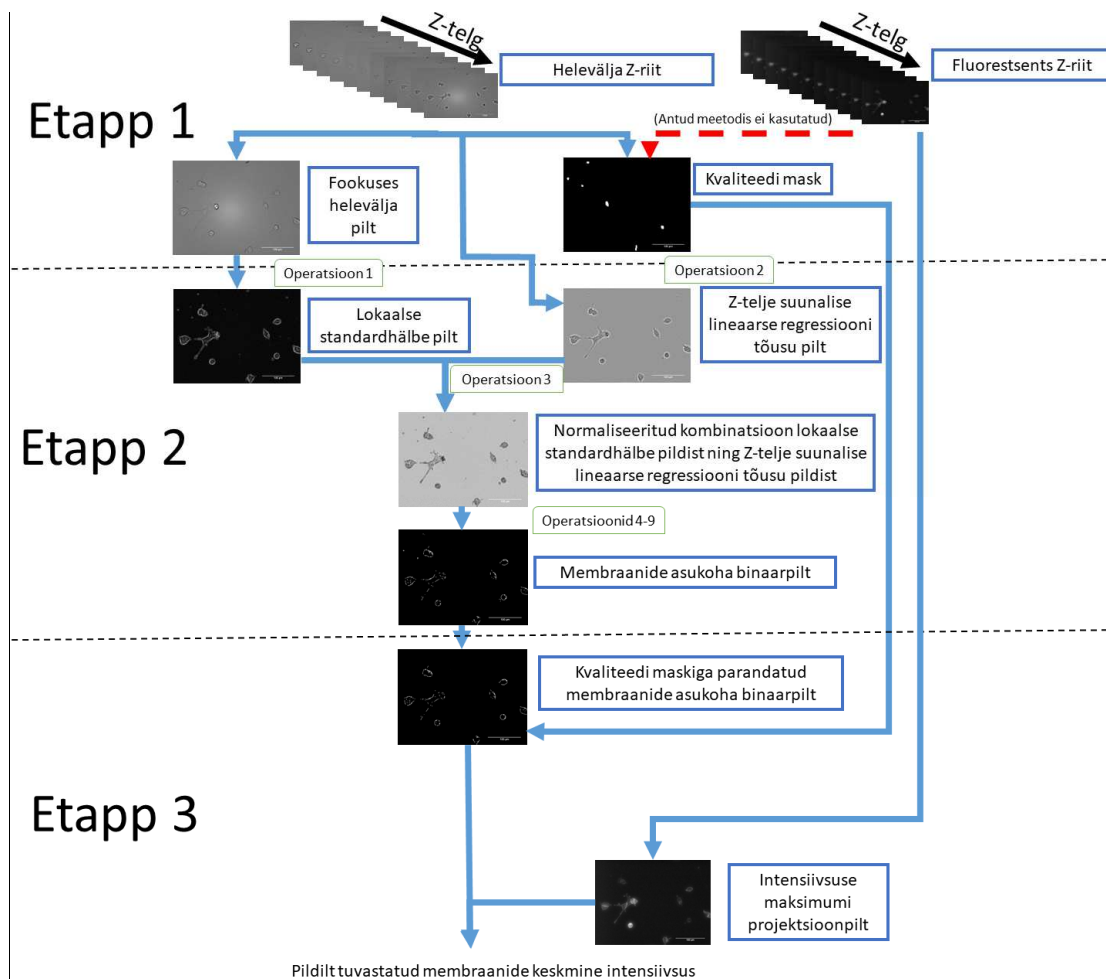
Rakumembraani tuvastamise algoritm ja selle parameetrite optimeerimine

Membraanide tuvastamiseks loodi algoritm, mis jaotub kahte staadiumisse (**Joonis 8**). Esimeses staadiumis teostab kasutaja mikroskoopiapiltidele kvaliteedikontrolli ning valib pildidelt esinduslikud alad. Teises staadiumis töötab algoritm automaatselt ning selle staadiumi saab jagada eraldi järjestikku toimivateks operatsioonideks:

1. Lokaalse standardhälbe filtri (ring raadiusega 5 px) rakendamine fookuses heleväljapildile, et leida pildilt heterogeensed alad, mis on omased membraani ümbrusele. Lokaalse standardhälbe filtri väärtused projitseeritakse uueks pildiks;
2. Igale helevälja Z-riida (*ingl. k. Z-stack*) pildi pikslile Z-telje suunalise lineaarse regressiooni teostamine ning nende regressioonide tõusude projitseerimine uueks pildiks;
3. Kahes eelmises etapis saadud piltide kombineerimine ning normaliseerimine lõiku [0,1];
4. Eelnevas etapis saadud pildilt servade tuvastamine kasutades automaatse lävendiga (**Tabel 2, p₁**) Sobeli filtrit;
5. Teises etapis saadud pildi normaliseerimine ning alumise ja ülemise lävendi (**Tabel 2, p₂₋₃**) rakendamine etapis 4 saadud pildile, et eemaldada pildilt leitud servad, mis enamasti vastavad muudele servaelementidele ja mitte rakumembraanidele;

6. Suuruse lävendi (**Tabel 2, p4**) rakendamine leitud servaelementidele. See jätab välja väikesed servaelemendid, mis ei vasta eeldatavale membraani suurusele servaelemendi kontekstis;
7. Eelmises etapis saadud pildi laiendamine (*ingl. k. image dilation*) ühe piksi suuruse filtriga, mis muudab leitud servad paksemaks. Kuna Sobeli algoritm leiab tüüpiliselt üsna kitsad servad laiusega üks piksel, kuid fluorestsentspiltidelt on eristuva membraani näiline pakus on tüüpiliselt kolm pikslit, mis vastab paksusele $\sim 1 \mu\text{m}$, siis muudab see etapp servad paremini membraanidele vastavaks. Membraani näiline paksus tuleneb nii raku kujust kui mikroskoobi difraktsioonlimiteeritud resolutsioonist;
8. Suuruse lävendi (**Tabel 2, p5**) rakendamine servaelementidele. Seekord võib lävend olla kõrgem etapis 6 kasutatud lävendist, kuna pildi laiendamine peaks väiksemad membraanilülid kokku liitma;
9. Pildi töötlemine hüstereesifiltriga (*ingl. k. hysteresis thresholding*). Pikslid, mis ei läbinud etapis 4 automaatset lävendit, loetakse membraani pikslite hulka, kui mõni selle piksli kõrval asuvatest pikslitest juba on loetud membraani pikslik;

Kirjeldatud algoritm sisaldab kokku viit muudetavat parameetrit, mille optimaalsed väärtused võivad sõltuda nii sellest, millise mikroskoobi, objektiivi ja kaamera on vastavad mikroskoopia pildid mõõdetud kui ka rakuliinist, mida katseks kasutati. Kuna antud töö käigus ei valideeritud algoritmi sobivust erinevate mikroskoopide ja rakuliinide kombineerimise korral, siis tuleks vastavad parameetrid erineva rakenduse jaoks uuesti optimeerida.



Joonis 8. Membraanituvastusalgoritmi skeem. Nooltega on tähistatud piltidega teostatavad operatsioonid, kus noole alguseks on sisendpilt ning noole lõpus operatsiooni tulemusena saadud pilt. Etapp 2 sisaldab põhitekstis kirjeldatud etappe 1-9. Punase noolega on märgitud operatsioonid, mida MembraneTools moodul lubab teostada, kuid mis antud töö kontekstis viiks erapoolikute tulemusteni ning mida seetõttu ei rakendatud.

HEK293 rakuliini membraanituvastusalgoritmi optimeerimiseks loodi kataloog 64 pildist, millel on rakumembraanid tuvastatud käsitsi. Kataloogi koostamisel oli käsitsi membraanide tuvastamise aluseks fookuses heleväljapilt rakkudest. Selleks, et vältida erapoolikust, mis võiks tuleneda märkija eripärast märkisid kataloogis pilte kolm inimest (Dr. Anni Allikalt, Dr. Mihkel Ilisson, Tõnis Laasfeld). Algoritmi optimeerimiseks otsiti maksimaalset väärtust **võrrandile (4)**.

$$f(p_1, p_2, p_3, p_4, p_5) = \sqrt{\frac{TP}{TP+FN}} * \left(\frac{TP}{FP}\right)^2 \quad (4)$$

Kus p_{1-5} on algoritmi optimeeritavad parameetrid, TP on õigesti tuvastatud membraanipikslite arv ning FN on valenegatiivsete pikslite ehk II tüüpi vigade arv. Optimeeritavate parameetrite kirjeldused ja optimaalsed väärtused on toodud **tabelis 3**. Membraanituvastuse kvaliteeti kirjeldavad parameetrid on toodud **lisana 7**.

Parameeter	Optimaalne väärtus
Automaatsele serva gradiendi lävendile liidetav parand	0,0486
Intensiivsuse alumine lävend lineaarse regressiooni tõusu pildil	48,1%
Intensiivsuse ülemine lävend lineaarse regressiooni tõusu pildil	63,6%
Pildielemendi suuruse alumine lävend enne laiendamist	1 px
Pildielemendi suuruse alumine lävend pärast laiendamist	1 px

Tabel 3. Membraanide tuvastamise algoritmi parameetrite optimaalsed väärtused kirjeldatud süsteemis. Intensiivsuse lävendid võivad omandada väärtusi lõigus [0%,100%], kus 0% vastab minimaalsele võimalikule piksli intensiivsusele (must piksel) ja 100% vastab maksimaalsele võimalikule piksli intensiivsusele (valge piksel). Kuna pildielemendi suuruse alumine lävend pärast laiendamist ei erine pildielemendi suuruse alumisest lävendist enne laiendamist, siis antud rakenduse korral pole vastav pilditöötlusetapp vajalik, kuid parameeter võib vajalikuks osutuda teiste algoritmi rakenduste korral.

Membraanist lähtuva fluorestsentskiirguse kvantifitseerimine

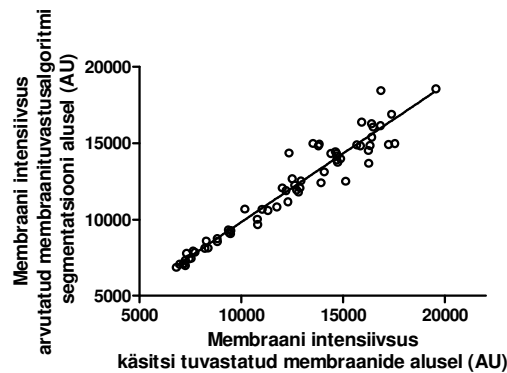
Kasutades eelnevalt kirjeldatud membraanide tuvastamise algoritmi saab arvutada pildi keskmise membraanide intensiivsuse. Keskmise fluorestsentsintensiivsuse arvutamiseks leitakse fluorestsentspiltide maksimumprojektsioon XY tasandile ning arvutatakse nende projektsiooni pikslite aritmeetiline keskmine, mis tuvastati membraanidena (**Joonis 8**). Näitamaks, et membraanide segmenteerimise algoritm on piisavalt täpne membraanide fluorestsentsintensiivsuse leidmiseks võrreldi membraanide intensiivsuse arvutamisel kahte erinevat membraanituvastusmeetodit. Esimesel juhul leiti membraanide keskmine intensiivsus membraanituvastusalgoritmi abil leitud segmentatsiooni kasutades ning teisel juhul kasutati käsitsi teostatud segmentatsiooni. Võrdlemiseks korreleeriti kahel moodusel arvutatud intensiivsusi ning teostati lineaarne regressioon (**Joonis 9**). Regressioonanalüüsil loeti käsitsi segmenteeritud piltide abil leitud membraanide intensiivsused referentsväärtuseks. Korrelatsioonanalüüsi tulemusel selgub, et korrelatsioon on kõrge ($R^2 = 0,935$) ning saadud regressiooni kirjeldab **võrrand (5)**.

$$y = 0,90 \pm 0,04 x + 800 \pm 400 \quad (5)$$

Kus y on membraani intensiivsus arvutatuna membraanituvastusalgoritmi segmentatsiooni alusel ning x on membraani intensiivsus käsitsi tuvastatud membraanide alusel.

Saadud regressioon on heteroskedastiline, kuid jääkliikmed on jaotunud juhuslikult. Nende parameetrite põhjal sobib membraanituvastusalgoritmi poolt väljastatav membraani segmentatsioon hästi membraanide intensiivsuse mõõtmiseks fluorestsentskanali piltidelt.

Väljatöötatud membraanide fluorestsentsintensiivsuse kvantifitseerimismeetodit võib kasutada mitme erineva biokeemilise rakenduse jaoks nagu näiteks fluorestsentsligandide kineetiliste- ja tasakaalukonstantide määramiseks ja konkureerivate ligandide afiinsuse hindamiseks elusates rakkudes.



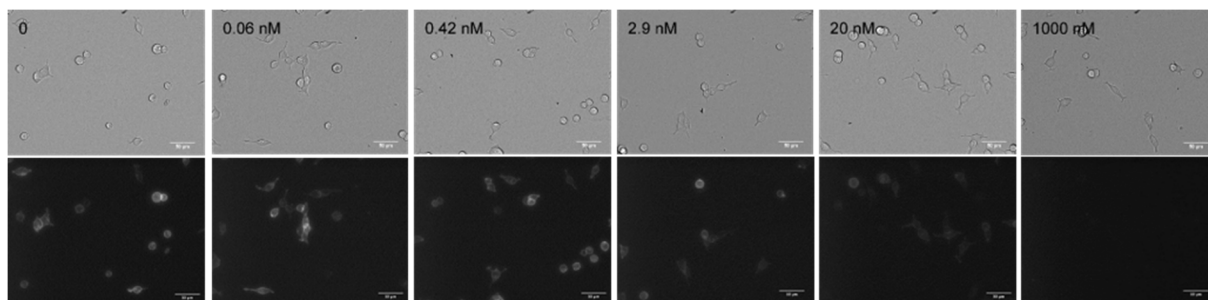
Joonis 9. Lineaarne regressioon membraanituvasustusalgoritmi poolt leitud membraani intensiivsuste ja käsitsi tuvastatud membraani intensiivsuste vahel. Regressiooni kirjeldab võrrand (5), $R^2=0,935$. Jäakliikmed on jaotunud juhuslikult, kuid heteroskedastiliselt. Iga punkt graafikul tähistab ühelt fluorestsents Z-riidalt arvatud väärtust. Intensiivsuse väärtuste lai vahemik on saavutatud sellega, et eri süvendites, kust pildid on tehtud, on kasutatud erinevaid väljatõrjuva ligandi butaklamool kontsentratsioone. Igas süvendis oli rakutihedus 20000 rakku/süvend (~40 rakku pildil) ning fluorestsentsligandina kasutati NAPS-Cy3B ($c=1$ nM).

MembraneTools pildianalüüsi moodul

Eelnevates lõikudes kirjeldatud algoritmid realiseeriti Apareciumi impordimoodulina *MembraneTools*. Tähelepanu pöörati sellele, et implementatsioon oleks praktiliseks kasutamiseks piisavalt kiire, analüüsi kiirendamiseks on võimalik kasutada ka mitmel tuumal paralleelarvutusi. *MembraneTools* pakub kasutajale mugavat kasutajaliidest, millesse on integreeritud nii mikroplaadi simulatsiooni moodul, algoritmi parameetrite muutmise võimalused, ajatelje korrigeerimise võimalused kui ka piltide eelvaate, fookuse korrigeerimise ja kvaliteedikontrolli funktsioonid. *MembraneToolsi* kasutajaliidese peaaken on kujutatud **lisana 8**.

Dopamiin D₃ retseptori ligandide sidumisomaduste iseloomustamine

Kuna konkureerivate ligandide sidumisomaduste iseloomustamine pakub farmakoloogias kõige laialdasemat huvi, siis rakendati väljatöötatud membraanide intensiivsuse kvantifitseerimise algoritmi just selle rakenduse jaoks. Kuigi afiinsust saab kvalitatiivselt hinnata ka otseselt piltide järgi (**Joonis 10**), on kvantitatiivne lähenemine kiirem ja usaldusväärsem. Afiinsuse hinnanguna kasutatakse vastava ligandi poolefektiivse inhibeerimise kontsentratsiooni IC₅₀.



Joonis 10. NAPS-Cy3B butaklamooliga konkureeriv sidumine D_3 R-le. Stabiilselt D_3 retseptorit ekspresseeriva HEK293 rakke (20000 rakku süvendis) inkubeeriti 1 nM NAPS-Cy3B ja erinevate butaklamooli kontsentratsioonidega, nagu näidatud pildil, 90 minutit enne pildistamist. Heleväljapiltide (ülemine rida) ja fluorestsentspiltide (alumine rida) mõõtmiseks kasutati Eksperimentaalses ja praktilises osas kirjeldatud parameetreid.

Dopamiin D_3 retseptori ligandide IC_{50} määramise meetodika põhineb neljal eeldusel.

1. Süsteemi saab kirjeldada kahe pöörduva reaktsiooni abil:



kus R on retseptor, antud meetodikas D_3R , L on fluorestsentsligand, antud meetodikas NAPS-Cy3B, ning C on konkureeriv ligand, käesolevas töös kas dopamiin või butaklamool, RL on retseptor-fluorestsentsligand kompleks ning RC on retseptor-konkureeriv ligand kompleks. Dimeerseid ja oligomeerseid vorme siin arvesse ei võeta, kuna antud mõõtemetodiga ei ole võimalik neid monomeerisest vormist eristada.

2. Kõik retseptormolekulid R, mis on võimalised osalema **reaktsioonides** [I] ja [II] on lokaliseerunud rakkude plasmamembraani.
3. Membraanidest lähtuv fluorestsentsintensiivsus on ligilähedaselt lineaarses seoses suurusega [RL]. Lineaarne seos tuleneb sellest, et membraanide fluorestsentsintensiivsus kasvab proportsionaalselt **reaktsiooni I** käigus tekkiva RL hulgaga.
4. Membraanituvastusalgoritm suudab vajalikul määral eristada pildilt piksleid, mis esindavad membraani, pikslitest, mis ei esinda membraani.

Seega saab antud süsteemi kirjeldada **võrranditega** (6), (7) ja (8).

$$MI = MI_a + \frac{MI_{\bar{u}} - MI_a}{1 + 10^{\log IC_{50} - \log [C]}} \quad (6)$$

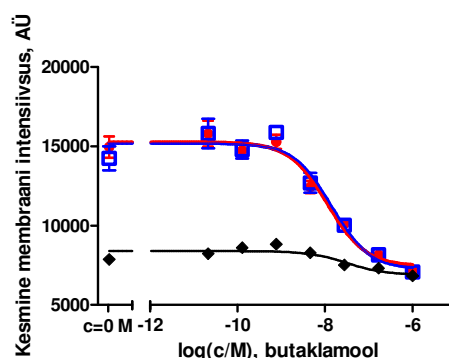
$$K_i = \frac{[R][C]}{[RC]} = \frac{IC_{50}}{\frac{[L]}{K_d} + 1} \quad (7)$$

$$K_d = \frac{[R][L]}{[RL]} \quad (8)$$

Kus MI on mõõdetud membraanide keskmine fluorestsentsintensiivsus, MI_a on membraanide mittespetsiifiline fluorestsentsintensiivsus, MI_i on maksimaalne võimalik keskmine membraanide fluorestsentsintensiivsus vastaval fluorestsentsligandi kontentratsioonil, K_d on fluorestsentsligand-retseptor kompleksi dissotsiatsioonikonstant, K_i on inhibeerimiskonstant ning IC_{50} tähistab konkureeriva ligandi kontsentratsiooni, mille korral MI on MI_a ja MI_i aritmeetiline keskmine (Lazareno and Birdsall 1993). Seega, teades lisatud konkureeriva ligandi kontsentratsiooni ning mõõtes membraanide intensiivsuse MI paljude erinevate konkureeriva ligandi kontsentratsioonide korral on võimalik leida vastava interaktsiooni IC_{50} väärtus. Kui on teada fluorestsentsligandi dissotsiatsioonikonstant K_d on võimalik arvutada ka K_i . NAPS-Cy3B dissotsiatsioonikonstandi väärtus on määratud varasemalt $K_d = 0,7 \pm 0,4$ nM (Allikalt 2018).

Selleks, et kontrollida, kas koostatud algoritm on üldise vajalik andmete analüüsiks võrreldi omavahel kolme moodust IC_{50} leidmiseks. Esimesel juhul koostati **võrrandi (6)** baasil doos-vastus sõltuvus kasutades MI arvutamiseks käsitsi leitud membraanide intensiivsusi. Teisel juhul kasutati MI arvutamiseks membraanide intensiivsuse mõõtmise algoritmi. Kolmandal juhul kasutati MI lähendusena fluorestsentspildi keskmist intensiivsust (**Joonis 11**). Mudeli ja andmete vastavust kirjeldavad parameetrid on koondatud **tabelisse 4**. Selgub, et käsitsi membraanide segmenteerimise ja membraanituvasustalgoritmiga segmenteerimise korral saadakse üsna sarnased nii sidumist kirjeldavate parameetrite kui ka mudeli sobivust kirjeldavate parameetrite väärtused. Kasutades pildi keskmist intensiivsust on saadavad parameetrid oluliselt halvemad. Seega saavutatakse kirjeldatud membraanituvasustalgoritmi kasutades käsitsi analüüsiga võrreldes väga sarnased tulemused, kuid analüüsiks kuluv aeg on oluliselt lühem. Samas on selge, et ainuüksi piltide keskmise intensiivsuse analüüsist usaldusväärseks IC_{50} arvutamiseks ei piisa ja seega on keerukama meetodi kasutamine põhjendatud.

Kirjeldatud meetodikaga määrati IC_{50} ja K_i väärtused kasutades **võrrandeid (6)** ja **(7)** D_3R agonistile dopamiin ($IC_{50} \pm SEM = 6,5 \pm 0,3$; $pK_i \pm SEM = 7,0 \pm 0,5$; $n=3$) ja antagonistile butaklamool ($pIC_{50} \pm SEM = 7,67 \pm 0,17$; $pK_i \pm SEM = 8,0 \pm 0,5$; $n=3$). Saadud väärtused langevad hästi kokku varem publitseeritud pK_i väärtustega vastavalt 6,4-7,3 ja 6,7-8,0, mis tõestab, et kirjeldatud uus meetod on kirjeldatud parameetrite mõõtmiseks sobiv (Jean-Martin *et al.*).



Joonis 11. Erinevate arvutusmeetodite võrdlus dopamiin D_3 antagonisti IC_{50} määramiseks dopamiin D_3 retseptorit stabiilselt ekspresseerivas HEK293 rakuliinis. Käsitsi membraanide tuvastamist (●) kasutati kvaliteetse referentsmeetodina, kuna valdkonna spetsialist suudab membraane kergesti tuvastada. Membraanituvasustalgoritmi abil arvutati membraanide intensiivsused (□) MembraneTools mooduliga ning intensiivsused parandati **võrrandi (5)** abil. Kõige lihtsama võimaliku meetodina kasutati fluorestsentspiltide keskmise intensiivsuse analüüsimist (◆), mis ei anna siiski piisavalt häid tulemusi. Kõikide meetodikate korral kasutati mudelina **võrrandit (6)**.

Meetod \ Parameeter	R^2	$\text{LogIC}_{50} \pm \text{SD}$	$MI_a \pm \text{SD}$	$MI_i \pm \text{SD}$	Replikaatide keskmise R^2
Käsitsi segmenteeritud membraanid	0,85	-7,94±0,13	7400±400	15200±300	0,98
Membraanituvasustalgoritmi segmenteeritud membraanid	0,80	-7,86±0,15	7300±500	15200±300	0,96
Pildi keskmise intensiivsuse meetod	0,62	-7,5±0,3	6890±160	8400±100	0,80

Tabel 4. Erinevate membraani intensiivsuse mõõtmisel põhinevate IC_{50} määramise meetodikate kvaliteediparameetrid. Käsitsi ja membraanituvasustalgoritmi abil saadavad tulemused langevad väga hästi kokku samas kui pildi keskmise intensiivsuse meetod annab oluliselt kehvemaid tulemusi.

Edasised sammud

Aparecium tarkvara sobivust erinevate mõõtemetoodikate väljatöötamisel on näidanud paljud erinevad projektid, mille korral on seda andmehalduseks ja –töötamiseks kasutatud. Selleks, et muuta Aparecium veelgi universaalsemaks, on edaspidi plaanis luua juurde impordimoodulid integreerimaks Aparecium tarkvara nii eLabFTW keskkonnaga, Fiji pildianalüüsi keskkonnaga, OMERO andmebaasiga ning lisada toetus veelgi suuremale hulga matemaatilise modelleerimise tarkvaradele *ExportTools* moodulis. Aparecium tarkvara on plaanis publitseerida teadusartiklina. Samuti on plaanis publitseerida nii meetod dopamiin D_3 retseptor – ligand interaktsioonide uurimiseks elusrakkudes kui ka ligand-mAChR interaktsioonide modelleerimise täiendatud tulemused.

KOKKUVÕTE

Katseandmete mahud, mõõtemetoodikate arv ja andmetöötlustarkvarade võimalused on teaduses pidevalt kasvanud ning seetõttu on kerkinud esile ka uued andmehalduse ja andmetöötlusega seotud probleemid nagu andmetesse vigade tekkimine, raskused andmeformaatide konverteerimisel ning vajadus kasutada andmeanalüüsiks kombinatsiooni paljudest erinevatest tarkvaradest. Seega on katseandmete kiire ning korrektne töötlus ja jätkusuutlik haldus on muutunud loodusteadustes ning ühtlasi biokeemias üha olulisemaks.

Käesolevas töös on kirjeldatud Aparecium tarkvara, mis loodi biokeemia katseandmete konverteerimiseks, töötamiseks, standardiseerimiseks ja halduseks. Apareciumi pakub selleks kasutajale kergesti õpitavaid ning intuitiivseid graafilisi kasutajaliideseid ning uute meetodite ja andmeanalüüsi tarkvarade liidestamiseks modulaarset disaini.

Töös on kirjeldatud ka Apareciumi rakendamist ja rolli mitme erineva biokeemilise meetodi väljatöötamisel ja kasutamisel. Kirjeldatud on üldisi andmehaldusprintsippe Aparecium tarkvaraga ning projekte, kus Apareciumit on andmehalduseks juba kasutatud. Esimese rakendusliku näitena on kirjeldatud võimalusi retseptor-ligand interaktsioonide uurimiseks kasutades reaktsioonide matemaatilist modelleerimist muskariinse atsetüülkoliini retseptori ja neuropeptiid Y Y₁ retseptori näitel. Teise näitena on kirjeldatud meetodit dopamiin D₃ retseptor-ligand interaktsioonide uurimiseks elusrakkudes kasutades fluorestsents- ja heleväljamikroskoopiat ning kvantitatiivset pildianalüüsi.

SUMMARY

The volume of experimental data, the number of assays, and features provided by various data analysis tools has continuously increased. This has raised new problems related to data management and analysis such as the accumulation of errors in the data, converting between data formats and the need to combine several software tools for a complete data analysis solution. Therefore, quick and correct data analysis and sustainable data management have become increasingly important in science and technology, including biochemistry.

In this work the Aparecium software for converting, standardizing, analysis and management of biochemical data. For this purpose, Aparecium offers user-friendly graphical user interfaces and a modular design for integrating new software and data formats to the existing system.

To exemplify the use of Aparecium in working conditions, several assay systems are discussed which rely on Aparecium for data management and standardization. The work describes general principles of data management and the nature of used data for several already completed scientific projects. As a first in-depth example, the mathematical modelling of receptor-ligand interactions in muscarinic acetylcholine receptor M_1 and neuropeptide Y_1 receptor are discussed. As a second, more specific application, the development of fluorescence and bright-field microscopy-based assay for the characterization of ligand binding to dopamine D_3 receptors in live cell system is described.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Akaike H. (1974) A New Look at the Statistical Model Identification, pp. 215–222. Springer, New York, NY.
- Allan C., Burel J.-M., Moore J., Blackburn C., Linkert M., Loynton S., MacDonald D., et al. (2012) OMERO: flexible, model-driven data management for experimental biology. *Nat. Methods* **9**, 245–253.
- Allikalt A. (2018) *Development of assay systems for studying ligand binding to dopamine receptors*. University of Tartu. PhD thesis.
- Balsa-Canto E., Henriques D., Gábor A., Banga J. R. (2016) AMIGO2, a toolbox for dynamic modeling, optimization and control in systems biology. *Bioinformatics* **32**, 3357–3359.
- Boer P. De, Hoogenboom J. P., Giepmans B. N. G. (2015) *Correlated light and electron microscopy: Ultrastructure lights up!*
- Goldberg I. G., Allan C., Burel J.-M., Creager D., Falconi A., Hochheiser H., Johnston J., Mellen J., Sorger P. K., Swedlow J. R. (2005) The Open Microscopy Environment (OME) Data Model and XML file: open tools for informatics and quantitative analysis in biological imaging. *Genome Biol.* **6**, R47.
- Hafner M., Niepel M., Subramanian K., Sorger P. K. (2017) Designing Drug-Response Experiments and Quantifying their Results. *Curr. Protoc. Chem. Biol.* **9**, 96–116.
- Hern J. A., Baig A. H., Mashanov G. I., Birdsall B., Corrie J. E. T., Lazareno S., Molloy J. E., Birdsall N. J. M. (2010) Formation and dissociation of M1 muscarinic receptor dimers seen by total internal reflection fluorescence imaging of single molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 2693–8.
- Hoops S., Sahle S., Gauges R., Lee C., Pahle J., Simus N., Singhal M., Xu L., Mendes P., Kummer U. (2006) COPASI--a COMplex PATHway SIMulator. *Bioinformatics* **22**, 3067–3074.
- Hucka M., Finney A., Bornstein B. J., Keating S. M., Shapiro B. E., Matthews J., Kovitz B. L., et al. (2004) Evolving a lingua franca and associated software infrastructure for computational systems biology: the Systems Biology Markup Language (SBML) project. *Syst. Biol. (Stevenage)*. **1**, 41–53.

- Jabłoński A. (1898-1980) (1960) On the Notion of Emission Anisotropy. *Bibl. Wydz. Fiz. UMK*.
- Jean-Martin B., Emiliana B., Arvid C., Caron M. G., Stefano E., Gilberto F., Gainetdinov R. R., et al. *Dopamine receptors: D3 receptor*.
- Kopanchuk S., Veiksina S., Mutulis F., Mutule I., Yahorava S., Mandrika I., Petrovska R., Rinken A., Wikberg J. E. S. (2006) Kinetic evidence for tandemly arranged ligand binding sites in melanocortin 4 receptor complexes. *Neurochem. Int.* **49**, 533–542.
- Kuzmič P. (1996) Program DYNAFIT for the Analysis of Enzyme Kinetic Data: Application to HIV Proteinase. *Anal. Biochem.* **237**, 260–273.
- Laasfeld T. (2016) *Automatiseeritud meetodi arendamine bakuloviiruste kvantifitseerimiseks*. University of Tartu. Bakalaureusetöö.
- Laasfeld T., Kopanchuk S., Rinken A. (2017) Image-based cell-size estimation for baculovirus quantification. *BioTechniques*. **63**(4), 161-168.
- Lazareno S., Birdsall N. J. (1993) Estimation of competitive antagonist affinity from functional inhibition curves using the Gaddum, Schild and Cheng-Prusoff equations. *Br. J. Pharmacol.* **109**, 1110–9.
- Leggio G. M., Bucolo C., Platania C. B. M., Salomone S., Drago F. (2016) Current drug treatments targeting dopamine D3 receptor. *Pharmacol. Ther.* **165**, 164–177.
- Lensing C. J., Freeman K. T., Schnell S. M., Speth R. C., Zarth A. T., Haskell-Luevano C. (2019) Developing a Biased Unmatched Bivalent Ligand (BUmBL) Design Strategy to Target the GPCR Homodimer Allosteric Signaling (cAMP over β -Arrestin 2 Recruitment) Within the Melanocortin Receptors. *J. Med. Chem.* **62**, 144–158.
- Link R., Veiksina S., Rinken A., Kopanchuk S. (2017) Characterization of ligand binding to melanocortin 4 receptors using fluorescent peptides with improved kinetic properties. *Eur. J. Pharmacol.* **799**, 58–66.
- Linkert M., Rueden C. T., Allan C., Burel J.-M., Moore W., Patterson A., Loranger B., et al. (2010) Metadata matters: access to image data in the real world. *J. Cell Biol.* **189**, 777–82.
- Marsango S., Ward R. J., Alvarez-Curto E., Milligan G. (2018) Muscarinic receptor oligomerization. *Neuropharmacology* **136**, 401–410.
- Martin K. A., Mani M. V., Mani A. (2015) New targets to treat obesity and the metabolic

- syndrome. *Eur. J. Pharmacol.* **763**, 64–74.
- Nelder J. A., Mead R. (1965) A Simplex Method for Function Minimization. *Comput. J.* **7**, 308–313.
- Nimchinsky E. A., Hof P. R., Janssen W. G., Morrison J. H., Schmauss C. (1997) Expression of dopamine D3 receptor dimers and tetramers in brain and in transfected cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 29229–37.
- Otto M. R., Lillo M. P., Beechem J. M. (1994) Resolution of multiphasic reactions by the combination of fluorescence total-intensity and anisotropy stopped-flow kinetic experiments. *Biophys. J.* **67**, 2511–2521.
- Peng H., Bateman A., Valencia A., Wren J. D. (2012) Bioimage informatics: a new category in Bioinformatics. *Bioinformatics* **28**, 1057.
- Perrin F. (1926) Polarisation de la lumière de fluorescence. Vie moyenne des molécules dans l'état excité. *J. Phys. Radium* **7**, 390–401.
- Ploem J. S. (1967) Die Möglichkeit der Auflichtfluoreszenzmethoden bei Untersuchungen von Zellen in Durchströmungskammern und Leightonröhren. *Acta Histochem. Suppl.* **7**, 339–343.
- Rahnel H., Viht K., Lavogina D., Mazina O., Haljasorg T., Enkvist E., Uri A. (2017) A Selective Biligand Inhibitor of CK2 Increases Caspase-3 Activity in Cancer Cells and Inhibits Platelet Aggregation. *ChemMedChem* **12**, 1723–1736.
- Raue A., Steiert B., Schelker M., Kreutz C., Maiwald T., Hass H., Vanlier J., et al. (2015) Data2Dynamics: a modeling environment tailored to parameter estimation in dynamical systems: Fig. 1. *Bioinformatics* **31**, 3558–3560.
- Reinart-Okugbeni R. (2012) *Assay systems for characterisation of subtype-selective binding and functional activity of ligands on dopamine receptors*. University of Tartu.
- 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.
- Rocca-Serra P., Brandizi M., Maguire E., Sklyar N., Taylor C., Begley K., Field D., et al. (2010) ISA software suite: supporting standards-compliant experimental annotation and enabling

- curation at the community level. *Bioinformatics* **26**, 2354–2356.
- Saez-Rodriguez J., Goldsipe A., Muhlich J., Alexopoulos L. G., Millard B., Lauffenburger D. A., Sorger P. K. (2008) Flexible informatics for linking experimental data to mathematical models via DataRail. *Bioinformatics*.
- Schmidt H., Jirstrand M. (2006) Systems Biology Toolbox for MATLAB: a computational platform for research in systems biology. *Bioinformatics* **22**, 514–515.
- Shea L. D., Neubig R. R., Linderman J. J. (2000) Timing is everything: The role of kinetics in G protein activation. *Life Sci.* **68**, 647–658.
- Tahk M.-J. (2016) *Melanokortiin-4 retseptori aktivatsiooni uurimine*. University of Tartu. Bakalaureusetöö.
- Tahk M.-J. (2018) *Apoptoosi mõõtmise rakkudes Kaspas-3 substraadil põhineva biosensorsüsteemiga*. University of Tartu. Magistritöö.
- Thompson R. B., Gryczynski I., Malicka J. (2002) Fluorescence polarization standards for high-throughput screening and imaging. *Biotechniques*.
- 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.
- Xiang Z., Thompson A. D., Jones C. K., Lindsley C. W., Conn P. J. (2012) Roles of the M1 muscarinic acetylcholine receptor subtype in the regulation of basal ganglia function and implications for the treatment of Parkinson's disease. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **340**, 595–603.

INFOLEHT

Aparecium tarkvara arendamine ja kasutamine retseptorsüsteemide biokeemilistes uuringutes

Käesolevas töös on kirjeldatud andmetöötlusega seotud probleeme biokeemiliste katsete läbiviimisel ning nende lahendamiseks mõeldud Aparecium tarkvara eesmärgid ja ülesehitust. Töös on kirjeldatud kahte praktilist rakendust, mille arendamisel ja kasutamisel on Aparecium tarkvaral andmetöötluse seisukohast määrav roll. Esimene kirjeldatud rakendus on retseptor-ligand interaktsioonimehhanismide uurimine muskariinse atsetüülkoliini retseptor M_1 ja neuropeptiid Y Y_1 retseptori näitel. Teine rakendus on meetod dopamiin D_3 retseptor – ligand interaktsioonide uurimiseks. Töös kirjeldatud rakendused näitavad, et Aparecium tarkvara on kasutajasõbralik ning paindlik paljudes erinevates rakendustes kasutamiseks.

CERCS koodid ja nimetused: B740 Farmakoloogia, farmakogognoosia, farmaatsia, toksikoloogia, P170 Arvutiteadus, arvutusmeetodid, süsteemid, juhtimine (automaatjuhtimisteooria)

Aparecium software development and use for studying receptor systems biochemistry

This thesis describes problems related to data management during biochemical experiments and discusses the goals and architecture of the Aparecium software package as a solution to these problems. To exemplify the use of Aparecium in real world setting, two projects are described which rely on Aparecium software. The first application is the mathematical modelling of receptor-ligand interaction kinetics of muscarinic acetylcholine receptor subtype M_1 and neuropeptide Y Y_1 receptor. The second application is the study of receptor-ligand interactions in live cell system using the combination of bright-field and epifluorescence microscopy techniques and bioimage analysis.

CERCS codes and names: B740 Pharmacological sciences, pharmacognosy, pharmacy, toxicology; P170 Computer science, numerical analysis, systems, control

LISAD

Lisa 1 MIDAS faili näidis fluorestsentsanisotroopia katse puhul kuvatuna MIDASTools moodulis.....	43
Lisa 2 Mudel 1 definitsioonifail.....	44
Lisa 3 Mudel 2 definitsioonifail.....	46
Lisa 4 Sensitiivsusanalüüsi tulemused M_1 MR mudelite optimeerimisel.....	48
Lisa 5 Y_1R konkureerimiseksperimenti parameetrite optimeerimisel arvutatud väärtused...	49
Lisa 6 Retseptor-ligand interaktsiooni elusrakkudes kvantifitseerimise põhimõtte mudel....	49
Lisa 7 Membraanituvatusalgoritmi kvaliteediparameetrid.....	50
Lisa 8 <i>MembraneTools</i> peaaken.....	50

MIDAS file MD-170509_111102_Anisotroopia-saksa ligand_Egor M1_2.xls loaded								
	ID:plate	ID:well	TR:M1_BV_27x_A_ul	TR:MK342_nM	TR:Scopolamine_nM	DA:ALL	DV:Paralleelne	DV:Risti
1	My_plate	A11	40	8	0	30	20100	16169
2	My_plate	A12	40	8	0	60	20309	16355
3	My_plate	B11	40	8	0	33.7500	20125	16112
4	My_plate	B12	40	8	0	63.7500	19653	15739
5	My_plate	C11	40	8	8000	37.5000	22658	17882
6	My_plate	C12	40	8	8000	67.5000	22738	17932
7	My_plate	D11	40	0	0	41.2500	2416	1266
8	My_plate	D12	40	0	0	71.2500	2327	1235
9	My_plate	E11	40	1	0	45	4914	3267
10	My_plate	E12	40	1	0	75	4852	3307
11	My_plate	F11	40	1	0	48.7500	5346	3573
12	My_plate	F12	40	1	0	78.7500	5306	3618
13	My_plate	G11	40	1	8000	52.5000	5440	3564
14	My_plate	G12	40	1	8000	82.5000	5147	3433
15	My_plate	H11	40	0	0	56.2500	2566	1349
16	My_plate	H12	40	0	0	86.2500	2477	1333

Lisa 1. MIDAS faili näidis fluorestsentsanisotroopia katse puhul kuvatuna MIDASTools moodulis. Tulba pealkirjas on tähistatud vastava tulba tüüp ja tulba nimi. Kuvatud katses kasutati kolme komponenti, milleks olid M1 retseptorit sisaldav bakuloviiruse suspensioon (TR:M1_BV_27x_A_ul), fluorestsentsligand MK342, (TR:MK342_nM) ning märgistamata ligand Skopolamiin (TR:Scopolamine_nM). Mõõtmised teostati kahes fluorestsentskanalis, millest üks on ergastava valguse polarisatsioonitasandiga paralleelne (DV:Paralleelne) ning teine risti (DV:Risti). Joonisel ei ole toodud kogu MIDAS faili sisu vaid ainult esimene mõõtetükk.

***** MODEL NAME

Mudel 1 - 1:1 sidumine.

***** MODEL NOTES

Selle mudeli korral eeldatakse, et kõik ligandid reageerivad retseptoritega 1:1 vahekorras, mitme erineva ligandi seostumine ühele retseptormolekulile pole lubatud, retseptorid ei saa esineda dimeeridena ning esinevad ainult ühes võimalikus vormis. Lubatud on mittespetsiifiline sidumine bakuloviiruste osakestele. Mittespetsiifilise sidumise korral

***** MODEL STATES

$d/dt(C) = -R2$ % Konkureeriva ligandi reaktsiooni kiiruse võrrand, ühik: nM/s
 $d/dt(L) = -R1-R4$ % fluorestsentsligandi reaktsiooni kiiruse võrrand, ühik: nM/s
 $d/dt(R) = -R1-R2+R5*n$ % retseptori reaktsiooni kiiruse võrrand, ühik: nM/s
 $d/dt(RC) = +R2$ %retseptor-konkureeriv ligand reaktsiooni kiiruse võrrand, ühik: nM/s
 $d/dt(RL) = +R1$ %retseptor-fluorestsentsligand reaktsiooni kiiruse võrrand, ühik: nM/s
 $d/dt(NBV) = -R4+R5*NBVcommon$ % mittespetsiifiliste sidumistaskute reaktsiooni kiiruse võrrand, ühik: nM/s
 $d/dt(NBVL) = +R4$ % mittespetsiifiline sidumistasku-fluorestsentsligand reaktsiooni kiiruse võrrand, ühik: nM/s
 $d/dt(V) = -R5$ % Bakuloviiruse lahuse lisamise võrrand, ühik: nM/s NB! Retseptorite lisamine ei ole modelleeritud sündmusena, kuna fundamentaalselt on lisatud bakuloviiruse ruumala ja mitte teadaoleva kontsentratsiooniga retseptori kontsentratsioon. Lisaks saab võrrandina esitades modelleerida pipeteerimise kiirust.
 $C(0) = 0$ % konkureeriva ligandi algkontsentratsioon. Tegelik väärtus tuleb eksperimendi definitsioonist, ühik: nM
 $L(0) = 0$ % fluorestsentsligandi algkontsentratsioon. Tegelik väärtus tuleb eksperimendi definitsioonist, ühik: nM
 $R(0) = 0$ % retseptori algkontsentratsioon. Alati 0, retseptori kogukontsentratsiooni paneb paika Reaktsioon 5 ja $V(0)$ väärtus, ühik: nM
 $RC(0) = 0$ % retseptor-konkureeriv ligand kompleksi algväärtus, tüüpiliselt 0, ühik: nM
 $RL(0) = 0$ % retseptor-konkureeriv ligand kompleksi algväärtus, tüüpiliselt 0, ühik: nM
 $NBV(0) = 0$ % vabade mittespetsiifilise sidumistaskute arvu algväärtus. Alati 0, tegeliku algkontsentratsiooni paneb paika Reaktsioon 5 tüüpiliselt 0, ühik: nM
 $NBVL(0) = 0$ %mittespetsiifiline sidumistasku – ligand komplekside algväärtus, tüüpiliselt 0, ühik: nM
 $V(0) = 0$ %Lisatud bakuloviiruse ruumala. Tegelik väärtus tuleb eksperimendi definitsioonist, ühik: μM

***** MODEL PARAMETERS

$kf1 = 3.77681e-06$ % Reaktsioon 1 pärisuunaline kiiruskonstant, ühik $1/(nM*s)$
 $kr1 = 0.000189484$ % Reaktsioon 1 pöördsuunaline kiiruskonstant, ühik $1/s$
 $kf2 = 0.31981$ % Reaktsioon 2 pärisuunaline kiiruskonstant, ühik $1/(nM*s)$
 $kr2 = 219078$ % Reaktsioon 2 pöördsuunaline kiiruskonstant, ühik $1/s$
 $kf4 = 0.00111808$ % Reaktsioon 4 pärisuunaline kiiruskonstant, ühik $1/(nM*s)$
 $kr4 = 106.424$ % Reaktsioon 4 pöördsuunaline kiiruskonstant, ühik $1/s$
 $Afree = 0.0346438$ % vaba fluorestsentsligandi iseloomulik fluorestsentsanisotroopia
 $Arl = 0.34$ % retseptor-fluorestsentsligand kompleksi iseloomulik fluorestsentsanisotroopia
 $Anbv = 0.181105$ % mittespetsiifiline sidumistasku-fluorestsentsligand kompleksi iseloomulik fluorestsentsanisotroopia
 $n = 0.34$ % koefitsient, mis seab määrab ära retseptori kontsentratsiooni lõpplahuses lisatud bakuloviiruse suspensioonis ruumala kohta, ühik: nM/ μl . Bakuloviiruse suspensioonis endas on retseptori kontsentratsioon võrdne väärtusega $n*V_s\ddot{u}vend$, kus $V_s\ddot{u}vend$ on süvendis oleva lahuse lõppruumala, mis on tüüpiliselt 100 μl
 $NBVcommon = 589.999$ % koefitsient, mis seab määrab ära mittespetsiifiliste sidumistaskute kontsentratsiooni lõpplahuses lisatud bakuloviiruse suspensioonis ruumala kohta, ühik: nM/ μl . Bakuloviiruse suspensioonis endas on mittespetsiifiliste sidumistaskute kontsentratsioon võrdne väärtusega $NBVcommon *V_s\ddot{u}vend$, kus $V_s\ddot{u}vend$ on süvendis oleva lahuse lõppruumala, mis on tüüpiliselt 100 μl

***** MODEL VARIABLES

$FA_true = (Afree.*L./(L+RL+NBVL)+Arl.*RL./(L+RL+NBVL)+Anbv.*NBVL./(L+RL+NBVL))$ % fluorestsentsanisotroopia väärtus ja sõltuvus kõigist fluorestsentsligandi vormidest. Indeks „True“ viitab sellele, et fluorestsentsanisotroopia väärtus on korrigeeritud erütrosiinB-ga filtrite kalibratsioonis arvatud G-faktoriga.

***** MODEL REACTIONS

$R1 = kf1 * L * R - (kr1 * RL)$ {reversible} % Fluorestensligandi ja retseptori assotsiatsiooni ja vastava kompleksi dissotsiatsiooni summaarne reaktsioon, ühik: nM/s

$R2 = kf2 * C * R - (kr2 * RC)$ {reversible} % konkureeriva ligandi ja retseptori assotsiatsiooni ja vastava kompleksi dissotsiatsiooni summaarne reaktsioon, ühik: nM/s

$R4 = kf4 * L * NBV - (kr4 * NBVL)$ {reversible} % Fluorestensligandi ja mittespetsiifilise sidumistasku assotsiatsiooni ja vastava kompleksi dissotsiatsiooni summaarne reaktsioon, ühik: nM/s

$R5 = 1000 * V$ % Bakuloviiruse ruumala muutmine retseptori ja mittespetsiifiliste sidumistaskute varuks, ühik: μ l/s. NB 1000 on esimest järku kiiruskonstant ühikuga 1/s

***** MODEL FUNCTIONS

***** MODEL EVENTS

***** MODEL MATLAB FUNCTIONS

Lisa 2. Mudel 1 definitsioonifail. Fail on jagatud plokkidesse. Failis on võimalik määrata ära mudeli nimi (MODEL NAME), mudeli kirjeldus ja märkmed (MODEL NOTES), mudeli komponentide reageerimist kirjeldavad reaktsioonikiiruse diferentsiaalvõrrandid ja parameetrite algväärtused (MODEL STATES), mudelit kirjeldavad parameetrid, näiteks kiiruskonstandid, (MODEL PARAMETERS), mudelit kirjeldavad muutujad, mis võivad aga ei pea vastama mõõdetud väärtustele (MODEL VARIABLES), mudelit kirjeldavate keemiliste reaktsioonide võrrandid (MODEL REACTIONS), muud matemaatilised funktsioonid (MODEL FUNCTIONS), süsteemiga toimuvad ainete lisamise sündmused (MODEL EVENTS) ja Matlab keskkonna spetsiifilised funktsioonid (MODEL MATLAB FUNCTIONS).

***** MODEL NAME

Mudel 2 – Dimeeri ja monomeeri üheaegne esinemine

***** MODEL NOTES

Selle mudeli puhul eeldatakse, et retseptor eksisteerib nii monomeeri kui ka dimeerina, kusjuures sidumiskonstandid ja kiiruskonstandid nende ja ligandide vahelisel reaktsioonil võivad sõltuda sidumistaskust. Konkureeriv ligand dimeeri teise sidumistaskusse ei seostu või seostub nii madala afiinsusega, et seda pole tarvis arvestada.

***** MODEL STATES

$d/dt(C) = -R2-R8$ % Konkureeriva ligandi reaktsiooni kiiruse võrrand, ühik: nM/s
 $d/dt(L) = -R1-R3-R4-R5-R7$ % fluorestsentsligandi reaktsiooni kiiruse võrrand, ühik: nM/s
 $d/dt(R) = -R7-R8+R6*n_monomer$ % retseptorimonomeeri reaktsiooni kiiruse võrrand, ühik: nM/s
 $d/dt(RC) = +R8$ % retseptor-konkureeriv ligand reaktsiooni kiiruse võrrand, ühik: nM/s
 $d/dt(RL) = +R7$ % retseptor-fluorestsentsligand reaktsiooni kiiruse võrrand, ühik: nM/s
 $d/dt(NBV) = -R5+R6*NBVcommon$ % mittespetsiifiliste sidumistaskute reaktsiooni kiiruse võrrand, ühik: nM/s
 $d/dt(NBVL) = +R5$ %mittespetsiifiline sidumistasku – ligand komplekside algväärtus, tüüpiliselt 0, ühik: nM/s
 $d/dt(V) = -R6$ % Bakuloviiruse lahuse lisamise võrrand, ühik: nM/s NB! Retseptorite lisamine ei ole modelleeritud sündmusena, kuna fundamentaalselt on lisatud bakuloviiruse ruumala ja mitte teadaoleva kontsentratsiooniga retseptori kontsentratsioon. Lisaks saab võrrandina esitades modelleerida pipeteerimise kiirust.
 $d/dt(R_R_) = -R1-R2+R6*n_dimer$ % retseptordimeeri reaktsiooni kiiruse võrrand, ühik: nM/s
 $d/dt(RCR_) = R2-R4$ % retseptordimeer-konkureeriv ligand kompleksi reaktsiooni kiiruse võrrand, ühik: nM/s
 $d/dt(RLR_) = R1-R3$ % retseptordimeer-fluorestsents ligand kompleksi reaktsiooni kiiruse võrrand, ühik: nM/s
 $d/dt(RCRL) = R4$ % retseptordimeer-konkureeriv ligand-fluorestsentsligand kompleksi reaktsiooni kiiruse võrrand, ühik: nM/s
 $d/dt(RLRL) = R3$ % retseptordimeerfluorestsentsligand-fluorestsentsligand kompleksi reaktsiooni kiiruse võrrand, ühik: nM/s
 $C(0) = 0$ % konkureeriva ligandi algkontsentratsioon. Tegelik väärtus tuleb eksperimendi definitsioonist, ühik: nM
 $L(0) = 0$ % fluorestsentsligandi algkontsentratsioon. Tegelik väärtus tuleb eksperimendi definitsioonist, ühik: nM
 $R(0) = 0$ % retseptorimonomeeri algkontsentratsioon. Alati 0, retseptori kogukontsentratsiooni paneb paika Reaktsioon 6 ja $V(0)$ väärtus, ühik: nM
 $RC(0) = 0$ % retseptor-konkureeriv ligand kompleksi algväärtus, tüüpiliselt 0, ühik: nM
 $RL(0) = 0$ % retseptor-konkureeriv ligand kompleksi algväärtus, tüüpiliselt 0, ühik: nM
 $NBV(0) = 0$ % vabade mittespetsiifilise sidumistaskute arvu algväärtus. Alati 0, tegeliku algkontsentratsiooni paneb paika Reaktsioon 5 tüüpiliselt 0, ühik: nM
 $NBVL(0) = 0$ %mittespetsiifiline sidumistasku – ligand komplekside algväärtus, tüüpiliselt 0, ühik: nM
 $V(0) = 0$ %Lisatud bakuloviiruse ruumala. Tegelik väärtus tuleb eksperimendi definitsioonist, ühik: μM
 $R_R_ (0) =$ % retseptordimeeri algkontsentratsioon. Alati 0, retseptori kogukontsentratsiooni paneb paika Reaktsioon 6 ja $V(0)$ väärtus, ühik: nM
 $RCR_ (0) = 0$ % retseptordimeer-konkureeriv ligand kompleksi algkontsentratsioon, tüüpiliselt 0 ühik: nM
 $RLR_ (0) = 0$ % retseptordimeer-fluorestsents ligand kompleksi algkontsentratsioon, tüüpiliselt 0 ühik: nM
 $RCRL(0) = 0$ % retseptordimeer-konkureeriv ligand-fluorestsentsligand kompleksi algkontsentratsioon, tüüpiliselt 0 ühik: nM
 $RLRL(0) = 0$ % retseptordimeerfluorestsentsligand-fluorestsentsligand kompleksi algkontsentratsioon, tüüpiliselt 0 ühik: nM

***** MODEL PARAMETERS

$kf1 = 4.23349e-06$ % Reaktsioon 1 pärisuunaline kiiruskonstant, ühik $1/(nM*s)$
 $kr1 = 0.000143608$ % Reaktsioon 1 pöördsuunaline kiiruskonstant, ühik $1/s$
 $kf2 = 0.0103337$ % Reaktsioon 2 pärisuunaline kiiruskonstant, ühik $1/(nM*s)$
 $kr2 = 1.61528$ % Reaktsioon 2 pöördsuunaline kiiruskonstant, ühik $1/$
 $kf3 = 2.32722e-06$ % Reaktsioon 3 pärisuunaline kiiruskonstant, ühik $1/(nM*s)$
 $kr3 = 2.82083e-07$ % Reaktsioon 3 pöördsuunaline kiiruskonstant, ühik $1/$
 $kf4 = 0.00101925$ % Reaktsioon 4 pärisuunaline kiiruskonstant, ühik $1/(nM*s)$
 $kr4 = 0.0445515$ % Reaktsioon 4 pöördsuunaline kiiruskonstant, ühik $1/$
 $kf5 = 0.000729745$ % Reaktsioon 5 pärisuunaline kiiruskonstant, ühik $1/(nM*s)$

$kr5 = 189.389$ % Reaktsioon 5 pöördsuunaline kiiruskonstant, ühik $1/$
 $kf7 = 3.07251e-06$ % Reaktsioon 7 pärisuunaline kiiruskonstant, ühik $1/(nM*s)$
 $kr7 = 7.40438e-05$ % Reaktsioon 7 pöördsuunaline kiiruskonstant, ühik $1/$
 $kf8 = 0.312401$ % Reaktsioon 8 pärisuunaline kiiruskonstant, ühik $1/(nM*s)$
 $kr8 = 0.330351$ % Reaktsioon 8 pöördsuunaline kiiruskonstant, ühik $1/$
 $A_free = 0.0464029$ % vaba fluorestantsligandi iseloomulik fluorestantsanisotroopia
 $A_RL = 0.244439$ % retseptormonomeer-fluorestantsligand kompleksi iseloomulik fluorestantsanisotroopia
 $A_NBVL = 0.141774$ % mittspetsiifiline sidumistasku-fluorestantsligand kompleksi iseloomulik
 $A_RLR_ = 0.165839$ % esimesse retseptordimeeri sidumistaskusse seostunud fluorestantsligandi iseloomulik fluorestantsanisotroopia
 $A_R_RL = 0.228047$ % teise retseptordimeeri sidumistaskusse seostunud fluorestantsligandi iseloomulik fluorestantsanisotroopia
 $n_monomer = 0.179061$ % koefitsient, mis seab määrab ära retseptormonomeeri kontsentratsiooni lõpplahuses lisatud bakuloviiruse suspensioonis ruumala kohta, ühik: $nM/\mu l$. Bakuloviiruse suspensioonis endas on retseptori kontsentratsioon võrdne väärtusega $n_monomer*V_süvend$, kus $V_süvend$ on süvendis oleva lahuse lõppruumala, mis on tüüpiliselt $100 \mu l$
 $n_dimer = 0.190115$ % koefitsient, mis seab määrab ära retseptordimeeri kontsentratsiooni lõpplahuses lisatud bakuloviiruse suspensioonis ruumala kohta, ühik: $nM/\mu l$. Bakuloviiruse suspensioonis endas on retseptordimeeri kontsentratsioon võrdne väärtusega $n_dimer*V_süvend$, kus $V_süvend$ on süvendis oleva lahuse lõppruumala, mis on tüüpiliselt $100 \mu l$ concentration
 $NBVcommon = 354$ % koefitsient, mis seab määrab ära mittespetsiifiliste sidumistaskute kontsentratsiooni lõpplahuses lisatud bakuloviiruse suspensioonis ruumala kohta, ühik: $nM/\mu l$. Bakuloviiruse suspensioonis endas on mittespetsiifiliste sidumistaskute kontsentratsioon võrdne väärtusega $NBVcommon *V_süvend$, kus $V_süvend$ on süvendis oleva lahuse lõppruumala, mis on tüüpiliselt $100 \mu l$

***** MODEL VARIABLES

$LTtotal = L + RL + RLR_ + 2*RLRL + NBVL + RCRL$ % kõikide fluorestantsligandi vormide kontsentratsioonide summa. Ainejäävuse seaduse järgi ei tohi see parameeter ühegi katse käigus muutuda
 $FA_true = (A_free*L + A_RL*RL + A_RLR_*(RLR_ + RLRL) + A_R_RL*(RCRL + RLRL) + A_NBVL*Nbvl) / LTtotal$ % fluorestantsanisotroopia väärtus ja sõltuvus kõigist fluorestantsligandi vormidest. Indeks „True“ viitab sellele, et fluorestantsanisotroopia väärtus on korrigeeritud erütrosiinB-ga filtrite kalibratsioonil arvutatud G-faktoriga.

***** MODEL REACTIONS

$R1 = kf1*L*R_R_ - (kr1*RLR_)$ {reversible} % Fluorestantsligandi ja retseptordimeeri assotsiatsiooni ja vastava kompleksi dissotsiatsiooni summaarne reaktsioon, ühik: nM/s
 $R2 = kf2*C*R_R_ - (kr2*RCR_)$ {reversible} % Konkureeriva ligandi ja retseptori assotsiatsiooni ja vastava kompleksi dissotsiatsiooni summaarne reaktsioon, ühik: nM/s
 $R3 = kf3*L*RLR_ - (kr3*RLRL)$ {reversible} % Fluorestantsligandi ja fluorestantsligand-retseptordimeeri assotsiatsiooni ja vastava kompleksi dissotsiatsiooni summaarne reaktsioon, ühik: nM/s
 $R4 = kf4*L*RCR_ - (kr4*RCRL)$ {reversible} % Fluorestantsligandi ja konkureeriv ligand-retseptordimeeri assotsiatsiooni ja vastava kompleksi dissotsiatsiooni summaarne reaktsioon, ühik: nM/s
 $R5 = kf5*L*NBV - (kr5*NBVL)$ {reversible} % Fluorestantsligandi ja mittespetsiifilise sidumistasku assotsiatsiooni ja vastava kompleksi dissotsiatsiooni summaarne reaktsioon, ühik: nM/s
 $R6 = 1000*V$ % Bakuloviiruse ruumala muutmine retseptori ja mittespetsiifiliste sidumistaskute varuks, ühik: $\mu l/s$. NB 1000 on esimest järku kiiruskonstant ühikuga $1/s$
 $R7 = kf7*L*R_ - (kr7*RL)$ {reversible} % Fluorestantsligandi ja retseptormonomeeri assotsiatsiooni ja vastava kompleksi dissotsiatsiooni summaarne reaktsioon, ühik: nM/s
 $R8 = kf8*C*R_ - (kr8*RC)$ {reversible}

***** MODEL FUNCTIONS

***** MODEL EVENTS

***** MODEL MATLAB FUNCTIONS

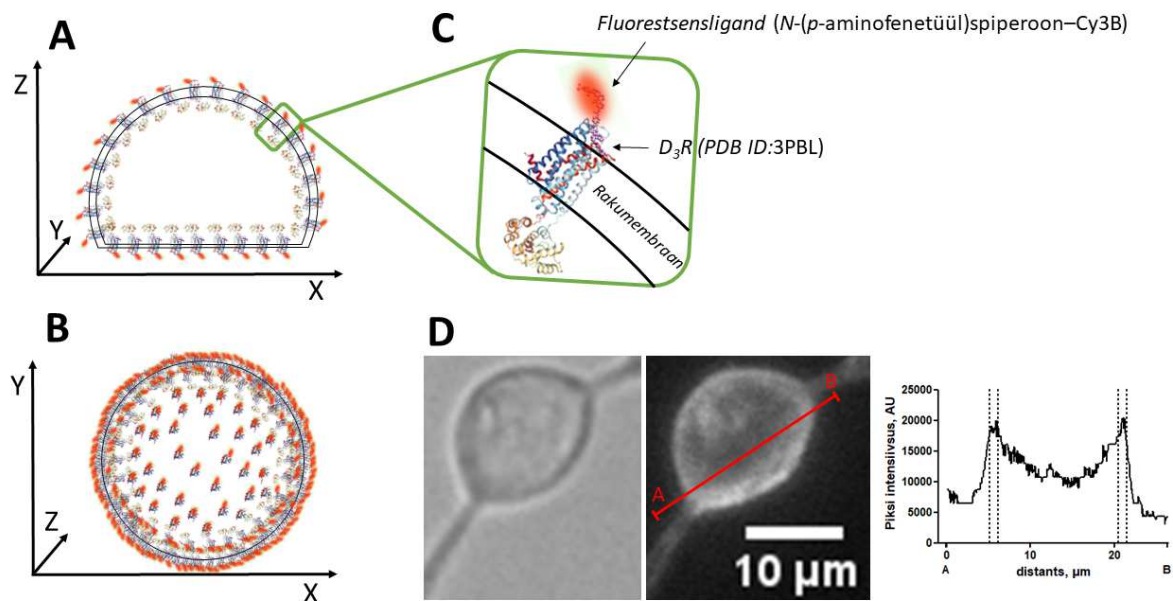
Lisa 3. Mudel 2 definitsioonifail. Fail on jagatud plokkidesse. Failis on võimalik määrata ära mudeli nimi (MODEL NAME), mudeli kirjeldus ja märkned (MODEL NOTES), mudeli komponentide reageerimist kirjeldavad reaktsioonikiiruse diferentsiaalvõrrandid ja parameetrite algväärtused (MODEL STATES), mudelit kirjeldavad parameetrid, näiteks kiiruskonstandid, (MODEL PARAMETERS), mudelit kirjeldavad muutujad, mis võivad aga ei pea vastama mõõdetud väärtustele (MODEL VARIABLES), mudelit kirjeldavate keemiliste reaktsioonide võrrandid (MODEL REACTIONS), muud matemaatilised funktsioonid (MODEL FUNCTIONS), süsteemiga toimuvad ainete lisamise sündmused (MODEL EVENTS) ja Matlab keskkonna spetsiifilised funktsioonid (MODEL MATLAB FUNCTIONS).

Mudel 1 parameeter	Optimaalne väärtus±SD	Mudel 2 parameeter	Optimaalne väärtus±SD
kf1	$1,3 \cdot 10^{-5} \pm 0,4 \cdot 10^{-6} \text{ nM}^{-1} \text{ s}^{-1}$	kf1	$4,4 \cdot 10^{-6} \pm 0,7 \cdot 10^{-6} \text{ nM}^{-1} \text{ s}^{-1}$
kr1	$2,1 \cdot 10^{-6} \pm 0,9 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$	kr1	$1,5 \cdot 10^{-4} \pm 0,3 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$
kf2	$0,17 \pm 0,04 \text{ nM}^{-1} \text{ s}^{-1}$	kf2	$0,012 \pm 0,0017 \text{ nM}^{-1} \text{ s}^{-1}$
kr2	$0,45 \pm 0,13 \text{ s}^{-1}$	kr2	$1,8 \pm 0,4 \text{ s}^{-1}$
kf4	$2,2 \cdot 10^{-4} \pm 1,0 \cdot 10^{-4} \text{ nM}^{-1} \text{ s}^{-1}$	kf3	$2,5 \cdot 10^{-6} \pm 0,5 \cdot 10^{-6} \text{ nM}^{-1} \text{ s}^{-1}$
kr4	$80 \pm 30 \text{ s}^{-1}$	kr3	$3,3 \cdot 10^{-7} \pm 0,6 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$
Afree	$0,030 \pm 0,006$	kf4	$1,1 \cdot 10^{-3} \pm 0,3 \cdot 10^{-3} \text{ nM}^{-1} \text{ s}^{-1}$
Arl	$0,29 \pm 0,06$	kr4	$0,045 \pm 0,009 \text{ s}^{-1}$
Anbv	$0,19 \pm 0,08$	kf5	$7,7 \cdot 10^{-4} \pm 1,2 \cdot 10^{-4} \text{ nM}^{-1} \text{ s}^{-1}$
n	$0,030 \pm 0,008 \text{ nM} \cdot \mu\text{l}^{-1}$	kr5	$210 \pm 50 \text{ s}^{-1}$
NBVcommon	$4000 \pm 2000 \text{ nM} \cdot \mu\text{l}^{-1}$	kf7	$3,2 \cdot 10^{-6} \pm 0,7 \cdot 10^{-6} \text{ nM}^{-1} \text{ s}^{-1}$
		kr7	$7,6 \cdot 10^{-5} \pm 1,2 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$
		kf8	$0,33 \pm 0,07 \text{ nM}^{-1} \text{ s}^{-1}$
		kr8	$0,38 \pm 0,08 \text{ s}^{-1}$
		A_free	$0,044 \pm 0,004$
		A_RL	$0,24 \pm 0,05$
		A_R_RL	$0,24 \pm 0,05$
		A_NBVL	$0,15 \pm 0,03$
		A_RLR_	$0,17 \pm 0,03$
		n_monomer	$0,18 \pm 0,03 \text{ nM} \cdot \mu\text{l}^{-1}$
		n_dimer	$0,19 \pm 0,04 \text{ nM} \cdot \mu\text{l}^{-1}$
		NBVcommon	$360 \pm 80 \text{ nM} \cdot \mu\text{l}^{-1}$

Lisa 4. Sensitiivsusanalüüsi tulemused M_1 MR mudelite optimeerimisel. M_1 MR konkureerimiseksperimenti parameetrite optimeerimisel leitud parameetrite optimaalsed väärtused ning sensitiivsusanalüüsil leitud määramatused standardhälbe tasemel. Tabelis toodud määramatus võtab arvesse ainult parameetrite optimeerimise määramatust ning ei võta arvesse teisi määramatuse komponente nagu näiteks määramatust lahuste ruumalades ja spektrofluorimeetri detektoris.

Mudel 1 parameeter	Optimaalne väärtus
kf1	$4,5 \cdot 10^{-2} \text{ nM}^{-1} \text{ s}^{-1}$
kr1	$3,0 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$
kf2	$3,1 \cdot 10^{-2} \text{ nM}^{-1} \text{ s}^{-1}$
kr2	$8,0 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$
kf4	$3,7 \cdot 10^{-4} \text{ nM}^{-1} \text{ s}^{-1}$
kr4	15 s^{-1}
Afree	0,040
Arl	0,31
Anbv	0,11
n	$0,352 \text{ nM} \cdot \mu\text{l}^{-1}$
NBVcommon	$18000 \text{ nM} \cdot \mu\text{l}^{-1}$

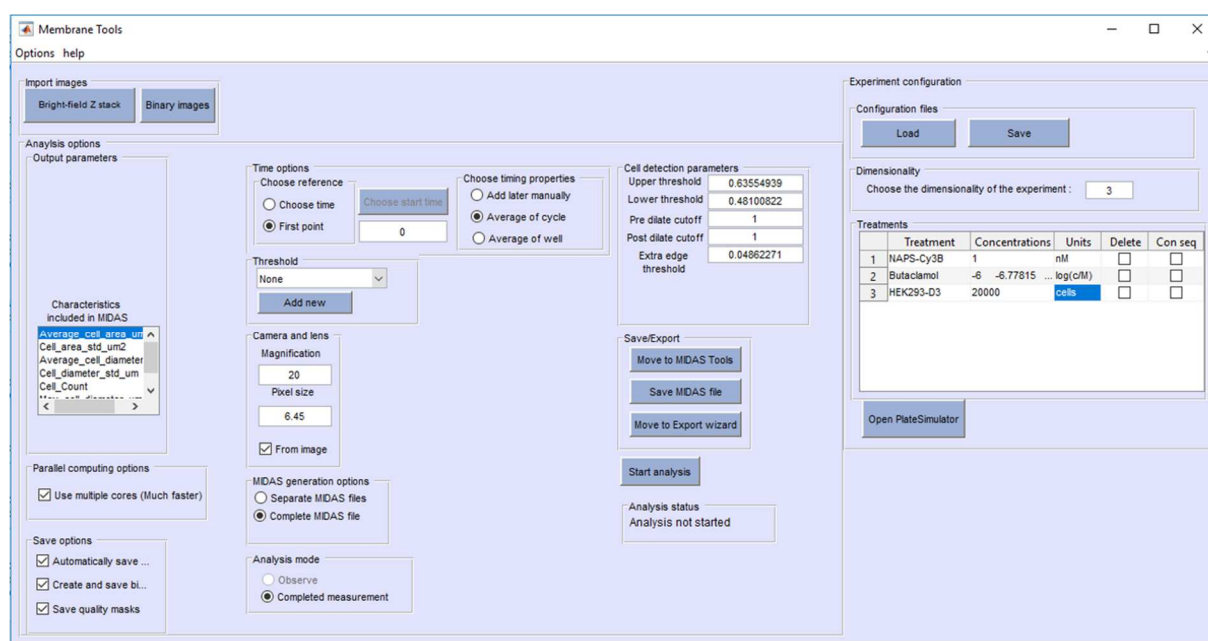
Lisa 5. Y_1R konkureerimiseksperimendi parameetrite optimeerimisel arvutatud väärtused.



Lisa 6. Retseptor-ligand interaktsiooni elusrakkudes kvantifitseerimise põhimõtte mudel. A) Üksiku raku ristlõige. Retseptorid on membraanis jaotunud võrdlemisi ühtlaselt. XY tasand tähistab mikrotiiterplaadi tasandit. B) Üksiku raku pealtvaade. Kuna epifluorestsentsmikroskoobi Z-telje suunaline resolutsioon on võrdlemisi halb, siis projitseerub paljudest erinevatest Z-tasanditest lähtuv fluorestsentskiirgus samale CCD kaamera pikslile. Raku kuju projektsioonist tulenevalt on fluorestsentsintensiivsus raku servades kõrgem. C) Rakumembraanil olev dopamiin D_3 retseptor, millele on seostunud fluorestsentsligand NAPS-Cy3B. Kuna tegemist on antagonistiga, siis G-valgu vabanemist ei toimu. D) Üksik rakk helevälja kanalil (vasakul) ja fluorestsentskanalis (keskel). Fluorestsentsintensiivsuse ruumiline jaotus vastab hästi mudelis kirjeldatule. Lõigu AB joonprofiil fluorestsentspildilt (paremal) kinnitab, et fluorestsentsintensiivsus on raku servades kõrgem. Katkendjoonte vahele jääb membraanituvasustalgoritmi poolt ennustatava membraani asukoht. Membraani näiline paksus $1 \mu\text{m}$ tuleneb nii raku kuju projektsioonist kui ka valgusmikroskoobi difraktsioonilimeeritud tingimustes teostatud mõõtmistest.

Parameeter	Väärtus
Membraanipikslite osakaal kõigist pikslitest	0,83%
Täpsus (<i>ingl. k. precision</i>)	33,4%
Saagis (<i>ingl. k. recall</i>)	17,1%
Sørensen-Dice koefitsient	0,226
Võrrand (4) f väärtus optimumis	0,104

Lisa 7. Membraanituvalu algoritm kvaliteediparameetrid. Kuigi täpsus ja saagis ei pruugi olla piisavalt kõrged teisteks rakendusteks nagu näiteks rakkude täielikuks segmentatsiooniks, siis väljatöötatud rakenduseks ei ole nende nii kõrge väärtus vajalik.



Lisa 8. MembraneTools peaaiken. MembraneTools peaaikna abil saab olulisematest funktsioonidest sisse laadida pilte (Bright-field Z stack), muuta algoritmi parameetreid (Cell detection parameters), opereerida eksperimendi konfiguratsioonifailidega ning lisada metaandmeid (Experiment configuration), valida ajastusega seotud seadeid (Time options) ning saadud tulemusi salvestada ja eksportida (Save/Export).

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, _____ Tõnis Laasfeld _____,

(autori nimi)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose, „Aparecium tarkvara arendamine ja kasutamine retseptorsüsteemide biokeemilistes uuringutes“,

mille juhendajad on Ago Rinken, PhD, MD ja Sergei Kopantšuk, PhD

(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 **27.05.2022** 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**