

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
SIIRDE-JA MEDITSIINIINSTITUUT
NANOMEDITSIINI ÕPPETOOL

Kullerpeptiidi retseptori identifitseerimine lähiligeerimise meetodil

Magistritöö

30 EAP

Rasmus Enno

Professor Tambet Teesalu

Kristina Põšnograjeva

Professor Juhan Sedman

TARTU 2025

Kullerpeptiidi retseptori identifitseerimine lähiligeerimise meetodil.

Vaskulaarsed endoteelirakud avaldavad erinevaid omadusi sõltuvalt koe füsioloogilisest seisundist. Nende rakkude pinnaretseptorite sihtmärgistamiseks on välja töötatud vaskulaarsed kullerpeptiidid (ingl. *vascular homing peptides*, VHP), mida avastatakse *in vivo* faagidisplei abil. Kuna faagidisplei ei võimalda retseptorite kohest tuvastamist, kasutatakse nende leidmiseks sageli afiinsuskromatograafiat. Selle protsessi oluline etapp on rakkude lüüs, mille käigus vabanevad rakusisesed valgud, mis võivad häirida VHP-de seondumist sihtvalkudega, vähendades märgistamise spetsiifilisust. Selle piirangu ületamiseks töötati käesolevas töös välja mädarõika peroksüdaasist (HRP) sõltuv, VHP-ga suunatud lähiligeerimise meetod, mis võimaldab märgistada peptiidi läheduses paiknevaid valke elusrakkudes. Mudelsüsteemina kasutati kullerpeptiidi järjestusega RPARPAR (RPAR) ja selle retseptorit neuropiliin-1 (NRP-1). RPAR-HRP konjugaat võimaldas NRP-1 positiivsete rakkude selektiivset märgistamist AlexaFluor 647-türamiidi ja biotiin-türamiidiga. Märgistatud rakupinna valgud isoleeriti afiinsuskromatograafia abil ning NRP-1 tuvastati Western blot'i ja massispektromeetrilise analüüsi kaudu. Antud töö tulemused näitavad, et VHP-ga juhitud lähiligeerimine on toimiv strateegia kullerpeptiidide sihtretseptorite tuvastamiseks terviklikel elusrakkudel.

Märksõnad: mädarõika peroksüdaas, kullerpeptiidid, NRP-1, faagidisplei, RPARPAR

CERCS kood: B210 Histoloogia, tsütokeemia, histokeemia, koekultuurid

Identification of vascular homing peptide target receptor via proximity ligation.

Vascular endothelial cells display distinct characteristics in different organs under both healthy and diseased conditions. Vascular homing peptides (VHP) have been developed to target their cell surface receptors, and are discovered using *in vivo* phage display, where the target receptors remain initially unknown. Current methods in VHP receptor discovery rely on affinity chromatography. A critical step in this workflow is cell lysis, which disrupts the plasma membrane and releases intracellular components that may interfere with peptide-receptor interactions, thereby reducing labeling specificity. To overcome this limitation, Horseradish Peroxidase-based (HRP), VHP-guided proximity labeling method was developed to enable covalent tagging of proteins located in the immediate vicinity of the peptide in live cells. RPARPAR (RPAR) peptide and its receptor, neuropilin-1 (NRP-1), were used as a model system. The RPAR-HRP conjugate enabled selective labeling of NRP-1-expressing cells with AlexaFluor 647-tyramide and biotin-tyramide. Labeled cell surface proteins were isolated using affinity chromatography, and presence of NRP-1 was confirmed by Western blotting, and mass spectrometry. The results of this study demonstrates that VHP-guided proximity labeling is a viable strategy for identifying homingpeptide target receptors on intact cells.

Keywords: Horseradish Peroxidase, homing peptides, NRP-1, phage display, RPARPAR

CERCS code: B210 Histology, cytochemistry, histochemistry, tissue culture

Sisukord

Kasutatud lühendid	5
Sissejuhatus	6
1. Kirjanduse ülevaade.....	7
1.1. <i>In vivo</i> faagidisplei.....	7
1.2. Praegused meetodid vaskulaarsete kullerpeptiidide retseptorite tuvastamisel	8
1.2.1. Afiinsuskromatograafia	8
1.3. Neuropilin 1 ja CendR motiiv	10
1.4. Mädarõika peroksüdaas	11
1.5. HRP kasutus immunohistokeemilistes rakendustes.....	11
1.5.1. Alternatiivsed meetodid lähiligeerimiseks	14
2. Eksperimentaalne osa	15
2.1. Töö eesmärgid	15
2.2. Materjalid ja meetodika	15
2.2.1. Peptiid-SA-HRP konjugaatide valmistamine	15
2.2.2. Lähiligeerimine AlexaFluor 647-Türamiidiga konfokaalmikroskoopia jaoks .	16
2.2.3. Lähiligeerimine AlexaFluor 647-türamiidiga ja voolutsütomeetriline analüüs	16
2.2.4. Lähiligeerimine biotiin-türamiidiga voolutsütomeetria jaoks	17
2.2.5. Afiinsuskromatograafia	17
2.2.6. SDS-PAGE	18
2.2.7. Western blot.....	18
2.2.8. Massi spektromeetria	19
3. Tulemused ja arutelu	20
3.1.1. RPAR-HRP konjugaat märgistab selektiivselt NRP-1 positiivseid rakke	21
3.1.2. Rakupinna proteoomi selektiivne biotinüleerimine.....	25
3.1.3. Biotinüleeritud valkude affiinsuskromatograafia.	27
3.1.4. Mass spektromeetria	29
Kokkuvõte	34
Summary	35
Tänuõnad	37
Kirjanduse loetelu	38
Lisad.....	51
Lisa 1. Joonis 5 lisa. PPC1 ja M21 rakkude märgistamine AlexaFluor 647 abil HRP-st sõltuva lähiligeerimise kaudu konfokaalmikroskoopia jaoks.	51
Lisa 2. Joonis 6A lisa PPC1 ja M21 rakkude märgistamine AlexaFluor 647 abil HRP-st sõltuva lähiligeerimise kaudu konfokaalmikroskoopia jaoks.....	52
Lisa 3. Püütioni kood tulpdiagrammi genereerimiseks.	53

Lisa 4. Joonis 7A lisa. PPC1 ja M21 rakkude märgistamine biotiiniga HRP-st sõltuva lähiligeerimise kaudu voolutsütomeetria analüüsi jaoks.	61
Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks.....	62

Kasutatud lühendid

APEX – muteeritud askorbaatperoksüdaas (ingl. *engineered ascorbate peroxidase*)

APEX2 – muteeritud askorbaatperoksüdaas 2 (ingl. *engineered ascorbate peroxidase 2*)

CendR – C-terminuse reegel (ingl. *C-end rule*)

DAB – 3,3'-diaminobensidiin

DMEM – Dulbecco modifitseeritud Eagle'i sööde

ELISA – ensüümidega seotud immunosorbentanalüüs (ingl. *enzyme-linked immunosorbent assay*)

EPHA2 – ephriini tüüp-A retseptor 2 (ingl. *Ephrin type-A receptor 2*)

FDR – valepositiivse määramise määr (ingl. *false discovery rate*)

HRP – mädarõika peroksüdaas (ingl. *horseradish peroxidase*)

ICC – immunotsütokeemia

IHC – immunohistokeemia

M21 – UCLA-SO-M21 rakuliin (inimese melanoomi rakuliin)

MS – massispektromeetria

NRP-1 – neuropiliin 1

PPC1 – primaarsed eesnäärmevähi rakud (ingl. *primary prostate carcinoma-1*)

PVDF- polüvinüül difluoriid

RPAR – CendR-motiiviga kullerpeptiid järjestusega RPARPAR

SA – streptavidiin

SD – standardhälve

SPLATT- Türaamiidil põhinev selektiivne proteoomne lähedusmärgistuse analüüs. (ingl. *Selective Proteomic Proximity Labeling Assay Using Tyramide*)

TSA – türaamiidiga vahendatud signaali võimendamine (ingl. *tyramide signal amplification*)

Tukey HSD – Tukey olulise erinevuse test (ingl. *Tukey's Honestly Significant Difference test*)

VEC – vaskulaarsed endoteelirakud (ingl. *vascular endothelial cells*)

VHP – vaskulaarsed kullerpeptiidid (ingl. *vascular homing peptides*)

Sissejuhatus

Vaskulaarsed endoteelirakud (ingl. *vascular endothelial cells*, VEC) on olulised paljude füsioloogiliste protsesside jaoks. VEC-id ekspresseerivad igas koes, elundis ja patoloogilises seisundis unikaalset ZIP-koodi, mida saab sihtida ringlevate sondide abil. VEC-ide rakupinna retseptorite sihtimiseks kasutatakse vaskulaarseid kullerpeptiide (ingl. *vascular homing peptide*, VHP), mida avastatakse *in vivo* faagidispleiga (ingl. *phage display*). *In vivo* faagidisplei avastusprotsessi olemuse tõttu ei ole kullerpeptiidide retseptorid teada. Nende retseptorite määramine on peptiidi bioloogiliste omaduste mõistmisel kriitilise tähtsusega. Praegused meetodid kullerpeptiidide retseptorite avastamiseks põhinevad afiinsuskromatograafial. Afiinsuskromatograafia läbiviimiseks tuleb rakud esmalt lüüsida. Rakulüüs vabastab hulga rakusiseseid molekule, millele tavapäraselt kullerpeptiidid ligi ei pääse. Lisaks võib rakumembraani hävimine muuta retseptori konformatsiooni, mõjutades seeläbi peptiidi seondumist.

Mädarõika peroksüdaas (ingl. Horseradish peroxidase, HRP) on oksüdatiivseid reaktsioone katalüüsiv ensüüm, mida kasutatakse laialdaselt biomolekulide tuvastamiseks ja märgistamiseks. HRP katalüüsib oksüdatsioonireaktsioone, kandes elektrone üle peroksiididele nagu H₂O₂. Immunohistokeemias kasutatakse HRP-d tihti valkude visualiseerimiseks. Lisaks kasutatakse HRP-d türamiid signaali võimendamise (ingl. *tyramide signal amplification*, TSA) meetodis, kus ensüüm muudab türamiidi reaktiivseks radikaaliks, mis seondub sihtvalkude türosiinijääkidega. Sama põhimõtet rakendatakse HRP-st sõltuvas lähiligeerimises, kus türamiid konjugeeritakse funktsionaalsete molekulidega, näiteks biotiiniga, võimaldades märgistatud valkude hilisemat isoleerimist. HRP sobib hästi rakupinnal asuvate molekulide uurimiseks, kuid ei toimi hästi redutseerivas keskkonnas nagu tsütoplasmas.

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli arendada usaldusväärsem ja tõhusam meetod vaskulaarsete kullerpeptiidide retseptorite määramiseks kasutades HRP-st sõltuvat lähiligeerimist. Eksperimentaalne osa tööst viidi läbi Tartu Ülikoolis, Bio- ja Siirdemeditsiini Instituudis, Täppis- ja Nanomeditsiini laboris.

1. Kirjanduse ülevaade

Vaskulaarsed endoteelirakud on olulised homöostaasi ja vereringe säilitamisel (Cines et al., 1998). VEC-idel on mitmed metaboolseid, sekretoorseid ja immunoloogilisi omadusi ning nad suhtlevad pidevalt teiste rakkudega, sealhulgas leukotsüütidega (Cines et al., 1998; D'Onofrio et al., 2014). VEC-id on osa laiemast vaskulaarsest süsteemist ning on kriitilise tähtsusega paljude füsioloogiliste protsesside ja haiguslike seisundite seisukohalt (D'Onofrio et al., 2014; Teesalu et al., 2012). Muutused VEC-ides mõjutavad konkreetset organit või kude ning võivad avaldada mõju ka kogu organismile (Cines et al., 1998; D'Onofrio et al., 2014; Teesalu et al., 2012).

Kasvajate korral kasvavad veresooned paralleelselt kasvajaga (Folkman, 1971). Selle ebanormaalse kasvu tulemusena erinevad veresooned struktuuri, anatoomia ja funktsiooni poolest normaalsetest veresoontest (Hanahan & Folkman, 1996). Nagu kasvajatelgi, on igal organil ja patoloogial unikaalsed veresoonte molekulaarsed profiilid, mida nimetatakse vaskulaarseks ZIP-koodideks (Teesalu et al., 2012). Vaskulaarsete endoteelirakkude ZIP-koodidele saab ligi pääseda vere kaudu ringlevate sondide, näiteks aptameeride, antikehade või peptiidide abil (D'Onofrio et al., 2014; Pleiko et al., 2023; Teesalu et al., 2012).

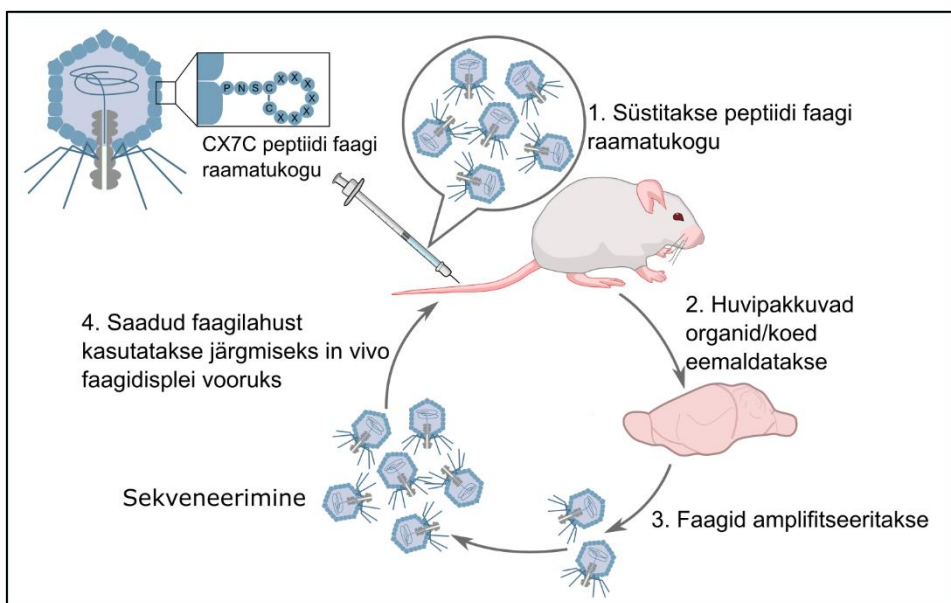
Vaskulaarseteks kullerpeptiidideks (ka kullerpeptiidid; ingl. *Vascular homing peptides*, VHP) nimetatakse peptiide, mis on välja töötatud VEC-ide rakupinnal paiknevate retseptorite sihtimiseks. Vaskulaarsete kullerpeptiidide väljatöötamine toimub peamiselt Pasqualini ja Ruoslahti (1996) poolt kasutusele võetud *in vivo* faagidisplei (ingl. *phage display*) abil.

1.1. *In vivo* faagidisplei

Faagidisplei on kõrge läbilaskevõimega meetod, mida kasutatakse haiguslike, kasvajaliste ja tervete veresoonte kaardistamiseks (D'Onofrio et al., 2014). See tööriist võimaldab seostada faagi kattevalgu pinnal ekspresseeritud peptiidi seda kodeeriva DNA järjestusega. Raamatukogu konstrueeritakse nii, et iga bakteriofaag (ka faag) ekspresseerib ainult ühte peptiidijärjestust ja kuvab oma pinnal mitmeid koopiaid sellest peptiidist, suurendades seeläbi üksiku faagi afiinsust sihtmärkorgani, -koe või -retseptori vastu (Pasqualini & Ruoslahti, 1996).

In vivo faagidisplei protsessi käigus süstitakse faagiraamatukogu vereringesse. Vereringes seonduvad vastava koe või selle veresoontega ainult need faagid, mis ekspresseerivad sihtorganile sobivaid peptiide. Mitteseonduvad faagid eraldatakse loomade perfuseerimisega. Huvi pakkuvad organid või koed eemaldatakse ning akumulunud faagid paljundatakse, puhastatakse, kvantifitseeritakse ja valmistatakse ette järgmise faagidisplei tsükli jaoks (joonis 1). Pärast mitmeid *in vivo* faagidisplei voorusid jäävad alles ainult need bakteriofaagid, mis

seonduvad sihtorganitega kõige tugevamalt (Pasqualini & Ruoslahti, 1996; Pleiko et al., 2021). Selle meetodiga on aastate jooksul avastatud mitmeid vaskulaarseid kullerpeptiide, millest tuntuim on iRGD, mis läbis hiljuti 1b/2a faasi kliinilised uuringud (Lisata Therapeutics, 2025). *In vivo* faagidisplei on tõhus võimalus vaskulaarsete kullerpeptiidide avastamiseks, kuid kuna valik põhineb peptiidide organi- või koespetsiifilisusel, ei selgu faagidisplei käigus kullerpeptiidide sihtretseptor ega sidumismehhanism (Pasqualini & Ruoslahti, 1996; Pleiko et al., 2021; Teesalu et al., 2012).



Joonis 1. Peptiidide avastamine *in vivo* faagidisplei abil. Faagiraamatukogu süstitakse hiirele või rotile, faagid ringlevad organismis ja akumulerevad sihtmärk- ja/või kontrollkudedesse. Pärast vereringet loomad hukatakse ning kogutakse huvipakkuvad organid või koed. Kogutud organitest amplifitseeritakse faagid, mis seejärel puhastatakse, sekveneritakse ja/või kasutatakse järgmises faagidisplei voorus. Illustratsiooni autor: K. Põšnograjeva.

1.2. Praegused meetodid vaskulaarsete kullerpeptiidide retseptorite tuvastamisel

1.2.1. Afiinsuskromatograafia

Kuna vaskulaarsed kullerpeptiidid avastatakse agnostiliselt, *in vivo* faagidisplei abil, ei ole nende peptiidide retseptorid esialgu teada. Retseptori(te) tuvastamine on oluline samm peptiidi seondumismehhanismi ja rakku sisenemise mõistmisel (Pleiko et al., 2021; Teesalu et al., 2012). Praegu on retseptorite määramise kuldstandardiks afiinsuskromatograafia, millele järgneb massispektromeetriline analüüs (Staquicini et al., 2023).

Afiinsuskromatograafia on meetod molekulide või molekularühmade isoleerimiseks kompleksetest lahustest. Meetod põhineb kahe molekuli, näiteks ligandi ja retseptori või antikeha ja antigeeni, spetsiifilisel seondumisel. Oluline on, et nende molekulide vaheline

seondumine oleks pöörduv. Üks molekulidest, mida nimetatakse aafiinsusligandiks, kinnitatakse tahkele kandjale, moodustades statsionaarse faasi. Teine molekul ehk sihtmolekul paikneb mobiilses faasis, milleks on tavaliselt kompleksne lahus, näiteks rakulüsaat. Statsionaarse ja mobiilse faasi kokkupuutel saab sihtmolekul seonduda aafiinsusligandiga; seda protsessi nimetatakse sidumisfaasiks. Sellele järgneb pesemisfaas, mille eesmärgiks on eemaldada mitteseondunud molekulid ning suurendada proovi puhtust (Rodriguez et al., 2020; Urh et al., 2009). Viimaseks etapiks on elueerimisfaas, mille käigus katkestatakse sihtmolekuli ja kinnitatud ligandi vaheline interaktsioon ning seondunud valgud vabastatakse. Elueerimine saavutatakse tavaliselt pH muutmise, ioonitugevuse reguleerimise või konkureeriva ligandi lisamise teel (Acikara et al., 2013; Rodriguez et al., 2020).

Vaskulaarsete kullerpeptiidide retseptorite määramiseks kinnitatakse uuritav peptiid tahkele kandjale, moodustades statsionaarse faasi. Mobiilne faas koosneb tavaliselt organi või huvipakkuvate rakkude lüsaatidest. Sidumisfaasis interakteerub peptiid mobiilses faasis olevate valkudega ning mitteseondunud valgud eemaldatakse pesemisfaasi käigus. Tavaliselt kasutatakse elueerimiseks kõrge kontsentratsiooniga vaba peptiidi (Arias et al., 2024; Teesalu et al., 2009). Eduka aafiinsuskromatograafia-järgselt tuvastatakse seondunud valgud geelelektroforeesi ja hõbevärvimise ning massispektromeetria abil. Retseptori tuvastamist kinnitatakse sageli täiendavate meetoditega, nagu immunoblottingu, seondumiskatsete või muude funktsionaalsete analüüsidega (Arias et al., 2024; Teesalu et al., 2009).

Kuigi aafiinsuskromatograafia on laialdaselt kasutatav ja tehniliselt suhteliselt lihtne meetod, võivad selle rakendamisel tekkida mitmed probleemid, millest levinumad on valgu madal saagis ja ebapiisav puhtus. Neid kitsaskohti on põhjalikult käsitletud mitmetes tõrkeotsingu juhendites, mille on koostanud valdkonna juhtivad ettevõtted (Cytiva, 2025; Merck, 2025).

Vaskulaarsete kullerpeptiidide retseptori määramisel esinevad probleemid on peamiselt seotud aafiinsuskromatograafia-eelse rakkude lüüsimisega, mille käigus vabastatakse suur hulk tsütoplasma valke. Hiljutises uuringus leiti, et tsütoplasma valkude kogus on ligikaudu 100 korda suurem kui rakupinnal olevate valkude kogus (Leung et al., 2025). Kuna vaskulaarsed kullerpeptiidid seonduvad rakuväliseid valke, võivad rakulüüsi käigus vabanevad tsütoplasma valgud mõjutada aafiinsuskromatograafia edukust, vähendades rikastamise spetsiifilisust ja muutes seeläbi sihtretseptori tuvastamist raskemaks. Lisaks võivad rakupinna retseptorid rakkude lüüsimise käigus läbida konformatsioonilisi muutusi, mõjutades pinnaretseptorite funktsionaalsust või seondumisvõimet. Kuigi aafiinsuskromatograafiat on edukalt kasutatud vaskulaarsete kullerpeptiidide retseptorite tuvastamiseks, võib tulevikus vaja minna kiiremaid ja usaldusväärsemaid meetodeid (Rampado et al., 2022; Teesalu et al., 2009).

1.3. Neuropilin 1 ja CendR motiiv

Neuropiliin-1 (NRP-1) on rakupinnareseptor, mille molekulmass on ligikaudu 100 kDa (UniProt, NRP1_HUMAN, 014786). NRP-1 on glükoproteiin, mille molekulmass võib glükosülatsiooni ja teiste post-translatsiooniliste modifikatsioonide tõttu oluliselt suurenda. Seetõttu detekteeritakse NRP-1 valku Western blot-analüüsidest tihti 130–140 kDa vahemikus (Mehta et al., 2018). NRP-1 interakteerub mitmete ligandidega ning omab kesksel rollil kardiovaskulaarses arengus, angiogeneesis ja närvisüsteemi arengus (Staton et al., 2007; Takashima et al., 2002; Teesalu et al., 2009). NRP-1 mängib olulist rolli veresoonte läbilaskvuse suurendamises, olles vajalik veresoonte endoteeli kasvufaktori (ingl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) ja semaforiin 3A (ingl. *semaphorin 3A*) toime realiseerumiseks. Semaforiin 3A ja VEGF C-terminaalsed alad interakteeruvad NRP-1 b1 domeeniga, kutsudes esile veresoonte läbilaskvuse suurenemise. VEGF-NRP-1 koostoimet ja sellest tulenevaid bioloogilisi mõjusid on võimalik blokeerida sünteetiliste peptiididega, mis on homoloogsed VEGF-A165 C-terminaalse alaga (Acevedo et al., 2008; Starzec et al., 2006).

NRP-1 osaleb mitmetes molekulaarsetes protsessides ning selle interaktsioone on kirjeldatud paljude erinevate valkudega, sealhulgas erinevate integriini- ja pleksiini-perekonna valkudega (Glinka et al., 2011; Goel & Mercurio, 2012; Takahashi et al., 1999; Valdembri et al., 2009). Lisaks tuvastab ja seob NRP-1 CendR-motiivi (ka C-terminuse reegel, ingl. *C-end Rule*) (Teesalu et al., 2009). NRP-1 toimib ka peremeesfaktorina inimese koroonaviiruse SARS-CoV-2 infektsiooni korral, tuvastades ja sidudes viiruse S-valgus paiknevat CendR-motiivi RRAR (Cantuti-Castelvetri et al., 2020; Daly et al., 2020).

CendR on motiiv kujul R/KXXR/K, millel on võime tungida kudedesse. See võime tuleneb C-terminaalsest arginiinist või lüsiinist ning motiivi C-terminaalsest eksponeeritusest. CendR-motiiv interakteerub NRP-1 b1 domeeniga, mis aktiveerib spetsiifilise transpordiraja, mida tuntakse ka CendR-rajana. CendR-rada võimaldab CendR-motiivi sisaldavatel valkudel ja peptiididel läbida veresoonte seina jõudes kasvajakoe ekstravaskulaarsesse piirkonda ning sealt edasi kasvaja parenhüümuni (Teesalu et al., 2009). CendR-rada võimaldab ka CendR-peptiididega seotud laadungite (antikehad, nanoosakesed, ravimid) sihipärast transporti, muutes need peptiidid väärtuslikeks vahenditeks täppis- ja nanomeditsiinis (d'Avanzo et al., 2024; Ruoslahti, 2017; Teesalu et al., 2009).

RPARPAR (RPAR), mis leiti eelnevalt kirjeldatud faagidisplei meetodil, on üks paremini iseloomustatud CendR-peptiide (d'Avanzo et al., 2024; Pang et al., 2014; Teesalu et al., 2009; Tobi et al., 2021). Multivalentse vormina (näiteks nano-osakestega konjugeeritult või faagi pinnal) on RPAR võimeline internaliseeruma erinevatesse kasvajakudedesse ja akumuldeeruma

kopsudes *in vivo* (Teesalu et al., 2009). Samuti seondub ja internaliseerub RPAR NRP-1-te ekspresseerivatesse rakkudesse, näiteks rakuliini primaarsed eesnäärmevähi rakud 1 (ingl. *Primary Prostate Carcinoma-1*, PPC1). Seevastu rakuliinidele, kus NRP-1 ekspressioon puudub, RPAR ei seonu ega internaliseeru. Üheks selliseks rakuliiniks on inimese melanoomi rakuliin UCLA-SO-M21 (M21). RPAR konjugaatide (kvanttäpid, erinevad nanoosakesed, fluorestsentsmärgised) abil on uuritud RPAR-i ja NRP-1 vahelisi koostoimeid (Teesalu et al., 2009; Willmore et al., 2016).

1.4. Mädarõika peroksüdaas

Peroksüdaasid on levinud kõigis elusorganismides ja osalevad paljudes bioloogilistes protsessides (Passardi et al., 2005). Peroksüdaasid on ensüümid, mis katalüüsivad erinevaid oksüdatsioonireaktsioone, mille käigus substraatmolekulid oksüdeeritakse, kandes elektronid üle peroksiididele, näiteks H₂O₂-le. Mädarõika peroksüdaas (ingl. *Horseradish peroxidase*, HRP) on heemirühma sisaldav ensüüm, mis on pärit taimest *Armoracia rusticana* (Veitch, 2004). HRP on laialdase rakendusega ensüüm, mida hakati teaduses kasutama 19. sajandi alguses, kui kirjeldati esimesi selle poolt katalüüsitud reaktsioone (Planche, 1810). Taimel *Armoracia rusticana* esineb mitmeid HRP isoensüüme, kuid enim uuritud ja kasutatud on isoensüümi C1A (Bosch et al., 2021; Gajhede et al., 1997). HRP struktuuri stabiliseerivad neli disulfiidsilda ning kaks kaltsiumiioonide (Ca²⁺) sidumiskohta (Welinder, 1979). See omadus muudab HRP redutseerivas keskkonnas, näiteks tsütoplasmas, inaktiivseks (Bosch et al., 2021; Hopkins et al., 2000).

1.5. HRP kasutus immunohistokeemilistes rakendustes

Mädarõika peroksüdaasi kasutamist immunohistokeemilistes rakendustes kirjeldasid esmakordselt Bobrow jt 1980. aastate lõpus (Bobrow et al., 1989). Järgnenud aastatel suurenes HRP kasutamine märgatavalt. Seda soodustasid veel lisaks molekulaardiagnostika ja molekulaarbioloogia tööriistade areng ning HRP geeni avastamine (Fujiyama et al., 1988; Krainer & Glieder, 2015). HRP-d kasutatakse paljudes analüüsimeetodites, sealhulgas ensüümidega seotud immunosorbentanalüüsis (ingl. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA), Western blot'is, immunohistokeemias (IHC) ja immunotsütokesemias (ICC). Kuna HRP-l puudub sihtmolekulide vastu spetsiifilisust, konjugeeritakse see sageli molekulidega, mis võimaldavad selektiivset seondumist, näiteks antikehade, peptiidide või streptavidiiniga (Bio-Rad, 2025; Thermo Fisher Scientific, 2025).

Valkude visualiseerimiseks kasutatakse erinevaid HRP substraate. HRP substraadid jagunevad kolme põhikategooriasse: kromogeensed, kemiluminescentsed ja fluorogeensed substraadid

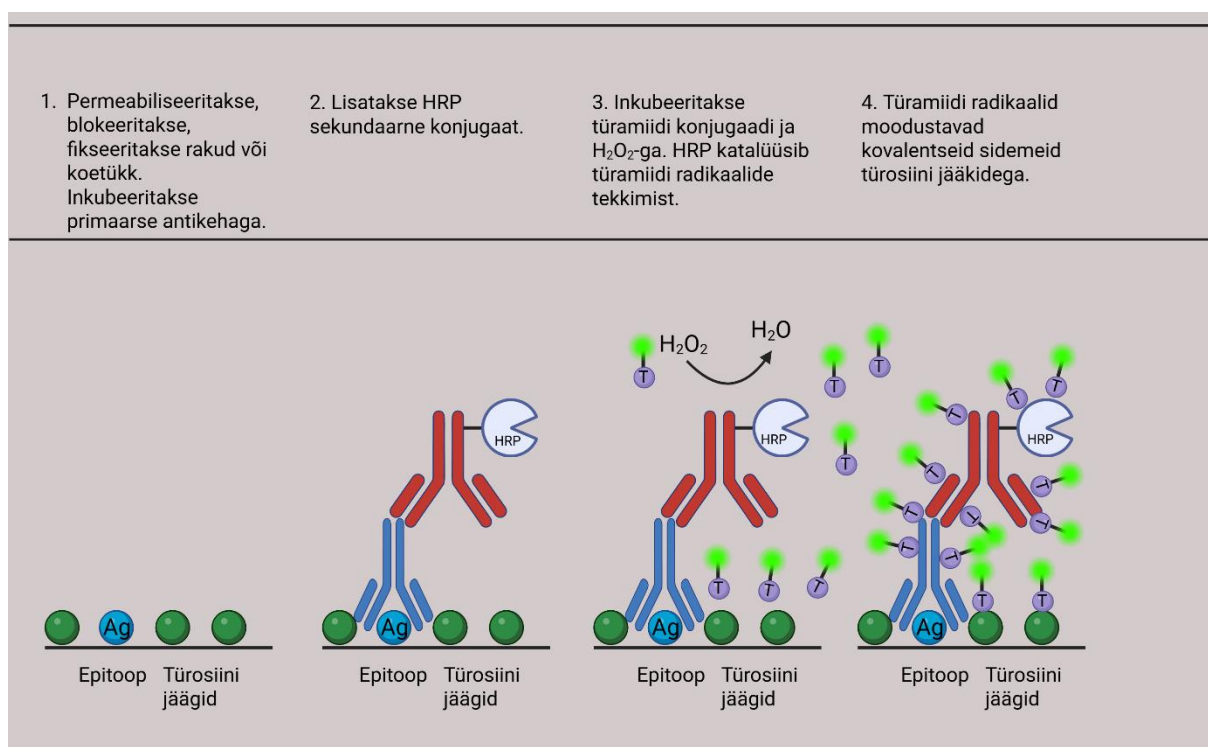
(Bio-Rad, 2025; Thermo Fisher Scientific, 2025). Kromogeensed substraadid, näiteks 3,3'-diaminobensidiin (DAB), tekitavad HRP-ga katalüütilise reaktsiooni tulemusena nähtava värvimuutuse (Conyers & Kidwell, 1991). Kemiluminesentsed substraadid, näiteks luminool, kiirgavad HRP-ga reageerimisel valgust (Marzocchi et al., 2008). Fluorogeensed substraadid, näiteks Amplex Red või QuantaBlue (Thermo Fisher Scientific), fluorestseeruvad HRP-ga reaktsiooni käigus (Gorris & Walt, 2009).

Lisaks tavapärasele substraadipõhisele visualiseerimisele saab HRP abil signaali ka võimendada. Selleks kasutatakse türamiidiga konjugeeritud molekule. Seda protsessi nimetatakse türamiidiga vahendatud signaali võimendamiseks (ingl. *Tyramide Signal Amplification*, TSA). TSA põhineb HRP võimel oksüdeerida türamiidi molekul vesinikperoksiidi (H₂O₂) abil, muutes selle elektronülekanne kaudu reaktiivseks radikaaliks. HRP oksüdeerib türamiidi fenoolrühma, mille tulemusel tekib väga reaktiivne türosüülradikaal. (Avens et al., 2011; Czarnek & Bereta, 2020). Moodustunud radikaalid seonduvad kiiresti lähedal asuvate valkude türosiini jääkidega (Joonis 2). TSA protsessis kasutatakse erinevaid türamiidiga konjugeeritud markereid, näiteks AlexaFluor 488-türamiidi või muid fluorestseeruvaid ühendeid. Tänu sellele saavutatakse tugev ja lokaliseeritud signaal, võimaldades kõrge tundlikkusega detektsiooni (Avens et al., 2011; Czarnek & Bereta, 2020).

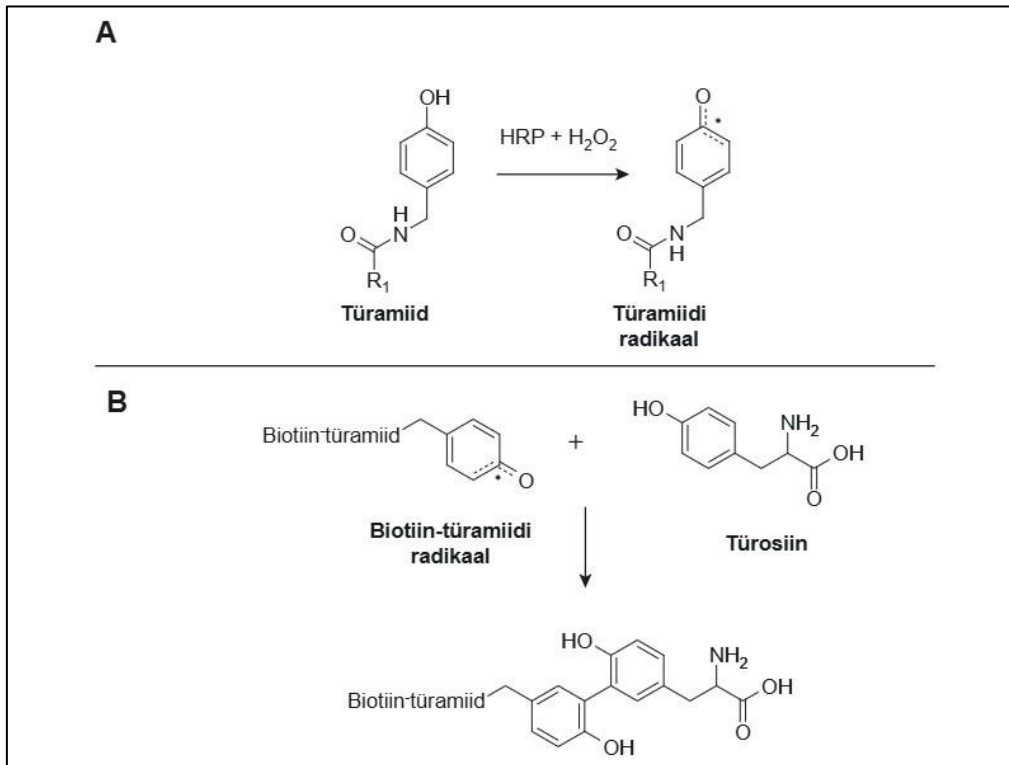
HRP-d on kasutatud ka molekulaarses naabruses olevate valkude märgistamiseks ehk lähiligeerimiseks (Bosch et al., 2021; Klaesson et al., 2018; Kostelnik et al., 2019). HRP-l baseeruvat lähiligeerimis meetodit on nimetatud ka türaamiidil põhinevaks selektiivseks proteoomseks lähedusmärgistuse analüüsiks. (ingl. *Selective Proteomic Proximity Labeling Assay Using Tyramide*, SPPLAT) (Rees et al., 2015). HRP-st sõltuv lähiligeerimine põhineb türamiidi muutmisel väga reaktiivseks vaheühendiks. See protsess toimub fenoolrühma hüdroksüülrühma oksüdeerimise teel, kus elektronid kantakse üle peroksiidühendile, enamasti vesinikperoksiidile (Sato & Nakamura, 2019). Moodustunud reaktiivne türamiid seonduv kovalentselt lähedal asuvate türosiini aminohappejääkidega (Rees et al., 2015; joonis 3). Märgistatud valkude tuvastamiseks ja hilisemaks isoleerimiseks konjugeeritakse türamiid enne reaktsiooni funktsionaalse molekuliga, näiteks biotiini või fluorofooriga (Kostelnik et al., 2019; Liao et al., 2020). Pärast türamiidi oksüdeerumist seonduv kogu konjugeeritud molekul valgu türosiini jääkidega, moodustades kovalentse sideme türamiidi ja türosiini vahel. Kasutades märgistamiseks biotiin-türamiidi on valke võimalik biotinüleerida. Biotinüleeritud valkute isoleerimiseks kasutatakse streptavidiinil põhinevat afiinsuskromatograafiat. Lähiligeerimist ja sellele järgnevat afiinsuskromatograafiat, on laialdaselt kasutatud elusrakkude pinnastruktuuride kaardistamiseks (Li et al., 2020; Loh et al., 2016; Wu et al., 2017). HRP-st

sõltuvat lähiligeerimist on kasutatud ka aptameeride sihtretseptorite tuvastamiseks (Pleiko et al., 2023). Rakusiseste interaktoomide kaardistamist HRP-st sõltuva lähiligeerimisega ei ole saavutatud, kuna HRP kaotab redutseerivas keskkonnas oma aktiivsuse (Bosch et al., 2021; Hopkins et al., 2000). HRP-st sõltuva lähiligeerimise ja TSA populaarsuse tõttu on saadaval mitmesuguseid HRP konjugaate, sealhulgas streptavidiiniga konjugeeritud HRP (Savini et al., 2023).

Streptavidiin (SA) on 53 kDa molekulmassiga bakteriaalne valk, mis pärineb organismist *Streptomyces avidinii* (UniProt, SAV_STRAV, P22629). See molekul koosneb neljast identsest subühikust, mis moodustavad tetrameeri. Iga subühik suudab siduda 1 biotiinimolekuli (Hendrickson et al., 1989). Streptavidiini ja biotiini vaheline seondumine ($K_d \approx 10^{-14}$ mol/L) on üks tugevamaid teadaolevaid mitte-kovalentseid interaktsioone looduses (Marangoni et al., 2020). Tänu oma erakordselt suurele afiinsusele on streptavidiin laialdaselt kasutusel erinevates biomolekulaarsetes rakendustes. Eriti sobib see biotiiniga modifitseeritud molekulide, näiteks peptiidide või ravimite, konjugeerimiseks suuremate molekulide või nanokandjatega (Culica et al., 2021; Jacobs et al., 2010). Lisaks võimaldab see seondumine biotinüleeritud molekulide efektiivset isoleerimist, mistõttu on streptavidiin oluline tööriist afiinsuskromatograafias (Chodosh, 2001; Pleiko et al., 2023).



Joonis 2. Türamiidiga signaali võimendamise (TSA) töövoog. Joonis põhineb AAT Bioquesti kirjeldatud kontseptuaalsel raamistikul ja meetodikal. (AAT Bioquest, 2020). Joonis tehtud programmis BioRender.



Joonis 3. Türamiidi aktiveerimine ja kinnitumine türosiinile. **A)** HRP katalüüsib türamiidi oksüdatsiooni H₂O₂ juuresolekul. Selle tulemusel tekib türamiidi radikaal. R1 tähistab molekuli varieeruvat osa, näiteks mürkgruupa (biotiin, fluorofoorid). **B)** Biotiin-türamiidi radikaal reageerib türosiini fenoolrühmaga, moodustades kovalentse sideme. Joonis tehtud programmis Marvin.

1.5.1. Alternatiivsed meetodid lähiligeerimiseks

Lisaks HRP-le on lähiligeerimisel kasutatud ka teisi ensüüme. BioID ja TurboID on bakteriaalse biotiin-ligaasi BirA modifitseeritud vormid. Need ensüümid kasutavad ATP-d biotiini aktiveerimiseks, mille tulemusena moodustub reaktiivne vaheühend. See vaheühend suudab kovalentselt märgistada lähedalasuvad biomolekulid. Nii BioID kui ka TurboID toimivad ainult rakusiseselt, limiteerides nende kasutusvõimalusi (Cho et al., 2020; Sears et al., 2019).

Lähiligeerimisel kasutatakse laialdaselt ka muteeritud askorbaatperoksüdaasi (ingl. *Engineered Ascorbate Peroxidase*, APEX) ja selle edasi arendatud versiooni muteeritud askorbaatperoksüdaas 2-te (ingl. *Engineered Ascorbate Peroxidase 2*, APEX2). APEX ja APEX2 on spetsiaalselt konstrueeritud ja optimeeritud biotiinil põhinevaks lähiligeerimiseks. Sarnaselt BioID-le ja TurboID-le on APEX ja APEX2 peamiselt kasutusel rakusiseste molekulide märgistamisel (Dumrongprechachan et al., 2021; Nguyen et al., 2020). Kuigi APEX2-te on rakupinna proteoomi kaardistamiseks kasutatud, nõuab see rakumembraani eelnevat modifitseerimist kolesteroolil põhinevate lipiidigruppide abil mis teeb meetodi oluliselt töömahukamaks ja tehniliselt nõudlikumaks (Vilen et al., 2023).

2. Eksperimentaalne osa

2.1. Töö eesmärgid

Käesoleva töö eesmärk on arendada usaldusväärsem ja tõhusam meetod vaskulaarsete kullerpeptiidide retseptorite määramiseks kasutades HRP-st sõltuvat lähiligeerimist.

Uurimus tugineb kullerpeptiidide tuntud omadustele ning HRP ensüümi katalüütilisele aktiivsusele. Selle põhjal on püstitatud järgmised hüpoteesid:

1. Kullerpeptiide saab konjugeerida streptavidiin-HRP (SA-HRP) kompleksiga, kasutades biotiin-streptavidiini seondumismehhanismi.
2. Kullerpeptiid-SA-HRP konjugaat märgistab *in vitro* keskkonnas peptiidi läheduses asuvaid valke.
3. Märgistatud valgud saab isoleerida afiinsuskromatograafia ja identifitseerida massispektromeetria abil, et määrata kindlaks kullerpeptiidi sihtretseptor.

Mudelsüsteemina kasutatakse hästi iseloomustatud kullerpeptiidi RPARPAR ja selle teadaolevat retseptorit neuropiliin-1. Mittespetsiifilise märgistuse ja taustsignaali hindamiseks kasutatakse kontrollina biotiini ilma konjugeeritud peptiidita.

2.2. Materjalid ja meetodika

2.2.1. Peptiid-SA-HRP konjugaatide valmistamine

Biotiin-ahx-RPARPAR-OH (RPAR; TAG Copenhagen) ja biotiini (biot; Sigma Aldrich, B4501) 2 mM lahused valmistati DPBS-is (Corning, 21-031-cv). Streptavidiiniga konjugeeritud määrarõika peroksüdaas (SA-HRP) osteti Sigma Aldrichilt (S5512). SA-HRP lahustati 500 µl DPBS-is kuni spektrofotomeetriga (NanoDrop™ 2000c spektrofotomeeter, ND-2000) mõõdeti kontsentratsiooniks vähemalt 0,5 mg/ml. Kontsentratsiooni mõõtmiseks kasutati spektrofotomeetri *Protein* A280 valikut. Konjugatsiooni-reaktsiooni jaoks lisati SA-HRP-le 10 korda rohkem (M/M) RPAR-i või biotiini. Segu inkubeeriti 1 tund toatemperatuuril, kasutades pöörlevat segajat. Seondumata peptiidid ja biotiin eemaldati reaktsioonisegust, kasutades DPBS-iga eelniisutatud Amicon® Ultra tsentrifugeerimisfiltrit, 3 kDa MWCO (Sigma Aldrich, UFC 5003). Konjugaati pesti 3 korda, täites filtrituubi DPBS-iga ja tsentrifugeerides 10 minutit kiirusel 14 000 x g toatemperatuuril. Iga tsentrifugeerimise järel tühjendati kogusmistuub. Pärast viimast pesu lisati filtrituubi 50 µl DPBS-i. Konjugaadid, RPAR-SA-HRP (RPAR-HRP) ja biot-SA-HRP (biot-HRP), resuspendeeriti ja viidi üle uude 1,5 ml tuubi. Lõpuks määrati kompleksi kontsentratsioon spektrofotomeetriga, kasutades *Protein* A280 valikut.

2.2.2. Lähiligeerimine AlexaFluor 647-Türamiidiga konfokaalmikroskoopia jaoks

Ümmargused mikroskoopiaklaasid asetati 24-kaevukesega plaati. Iga kaevu külvati 150 000 M21 või PPC1 rakku ja kasvatati üleöö 37°C juures 5% CO₂ atmosfääris. Rakke kasvatati Dulbecco modifitseeritud Eagle'i söötmes (ingl. Dulbeccos Modified Eagle's Media, DMEM, Lonza, BE12-604F). Söötmele lisati 10% veiseloote seerumit (ingl. fetal bovine serum, FBS, Capricorn, FBS-11A) ning 1% penitsilliini ja streptomütsiini. Katse läbiviimiseks sööde eemaldati ja rakke inkubeeriti 0,5 µM RPAR-HRP või biot-HRP-ga DMEM-is, millele polnud lisatud FBS-i ega antibiootikume, 1 tund toatemperatuuril. Pärast inkubatsiooni eemaldati sööde ja rakke pesti 3 korda DPBS-iga. Rakke inkubeeriti 2 minutit toatemperatuuril lahuses, mis sisaldas AlexaFluor 647-türamiidi (Thermo Fisher Scientific, B40958) (1:600 lahjendus DPBS-is) ja 1 mM vesinikperoksiidi (H₂O₂, Honeywell International, 008-003-00-9). Reaktsioon peatati, lisades 100 U/ml katalaasi (Sigma Aldrich, C9322) DPBS-is. Reaktsiooni täielikuks peatamiseks pesti rakke 3 korda 100 U/ml katalaasiga DPBS-is. Rakud fikseeriti 4% paraformaldehüüdi (PFA, lahjendatud PBS-is) lahuses ja pesti 3 korda DPBS-iga. Rakutuumade värvimiseks inkubeeriti rakke 1 µg/ml DAPI lahusega (lahjendatud DPBS-is) 3 minutit. Seejärel pesti rakke veel 2 korda DPBS-iga. Ümmargused mikroskoopiaklaasid kinnitati mikroskoobiklaasidele Fluoromount-G™ kinnitusainega (Thermo Fisher Scientific, 00-4958-02). Klaase hoiti kinnitusaine kuivamiseks üleöö toatemperatuuril pimedas. Järgmisel hommikul analüüsiti slide konfokaalmikroskoobiga (Olympus FV1200MPE).

2.2.3. Lähiligeerimine AlexaFluor 647-türamiidiga ja voolutsütomeetriline analüüs

PPC1 ja M21 rakud kasvatati 75 cm² kolbides kuni 90% konfluentsuseni. Sööde aspireeriti ja rakke pesti 1 kord DPBS-iga. Rakud dissotseeriti kasutades mitteensümaatilist rakueraldamislahust Cellstripper (Corning, 25-056-CI), vältida rakupinnaretseptorite lagunemist. 900 000 PPC1 või M21 rakku viidi üle 96-kaevukesega V-põhjaga plaati. Rakke tsentrifuugiti 5 minutit 300 x g juures toatemperatuuril ja sööde eemaldati. Rakud resuspendeeriti 0,5 µM RPAR-HRP, biot-HRP või ilma HRP-ta DMEM-is ja inkubeeriti 1 tund toatemperatuuril. Ilma HRP-ta DMEM-is inkubeeritud rakke kasutati rakkude autofluorestsentsi määramiseks. Pärast inkubeerimist tsentrifuugiti rakke 5 minutit 300 x g juures ja lahus eemaldati. Rakke pesti 3 korda DPBS-iga, tsentrifuugides iga kord 5 minutit 300 x g juures. Seejärel viidi läbi lähiligeerimisreaktsioon. Rakusade resuspendeeriti lahuses, mis sisaldas AlexaFluor 647-türamiidi (1:600 lahjendus DPBS-is) ja 1 mM H₂O₂. Inkubatsioon toimus toatemperatuuril 2 minutit. Reaktsioon peatati, lisades 100 U/ml katalaasi DPBS-is.

Reaktsiooni täielikuks peatamiseks ja liigse AlexaFluor-647-türamiidi eemaldamiseks pesti rakke 3 korda 100 U/ml katalaasiga DPBS-is, tsentrifuugides iga kord 5 minutit 300 x g juures. Seejärel fikseeriti rakud 4% paraformaldehüüdis (PFA, lahendus PBS-is) ja inkubeeriti neid 10 minutit toatemperatuuril. Rakud viidi 96-kaevukesega plaadist üle 1,5 ml tuubidesse. Pärast PFA eemaldamist pesti rakke 3 korda DPBS-is. Seejärel rakud suspendeeriti 100 µl MQ-vees ja analüüsiti voolutsütomeetriaga. Voolutsütomeetria väravaseaded määrati märgistamata kontrollrakkude alusel.

2.2.4. Lähiligeerimine biotiin-türamiidiga voolutsütomeetria jaoks

PPC1 ja M21 rakud valmistati ette 96-kaevukesega V-põhjaga plaadis samal viisil, nagu kirjeldatud eelnevas peatükis. Rakud resuspendeeriti 0,5 µM RPAR-HRP, biot-HRP või ilma HRP-ta DMEM-is ja inkubeeriti 1 tund toatemperatuuril. Ilma HRP-ta DMEM-is inkubeeritud rakke kasutati rakkude autofluorestsentsi määramiseks. Pärast inkubeerimist tsentrifuugiti rakud 5 minutit 300 × g juures toatemperatuuril ja supernatant eemaldati. Rakke pesti 3 korda, suspendeerides need DPBS-is ja tsentrifuugides iga kord 5 minutit 300 × g juures. Seejärel viidi läbi lähiligeerimise reaktsioon. Selleks suspendeeriti rakud 500 µM biotiin-türamiidi (Iris Biotech, LS-3500) ja 1 mM H₂O₂ lahuses (lahjendatud DPBS-is) ning inkubeeriti 2 minutit toatemperatuuril. Reaktsioon peatati, lisades 100 U/ml katalaasi DPBS-is. Reaktsiooni täielikuks peatamiseks ja jääkrektiivide eemaldamiseks viidi läbi kolm pesu 100 U/ml katalaasiga DPBS-is, suspendeerides ja tsentrifuugides iga kord viis minutit 300 × g juures. Seejärel fikseeriti rakud 4% PFA lahuses, inkubeerides neid 10 minutit toatemperatuuril. Pärast fikseerimist viidi rakud üle 96-augulisest V-põhjaga plaadist 1,5 ml tuubidesse. Liigse PFA eemaldamiseks viidi läbi 3 pesu DPBS-is. Biotinüleeritud rakkude visualiseerimiseks inkubeeriti rakke 1 tund toatemperatuuril Streptavidiin-Dylight 550 (Thermo Fisher Scientific, 84542) lahuses (1:400 lahendus DPBS-is). Sellele järgnes 3 pesu DPBS-is, et eemaldada liigne SA-Dylight 550. Rakud resuspendeeriti DPBS-is ja analüüsiti voolutsütomeetriaga. Väravaseaded määrati negatiivsete kontrollproovide alusel.

2.2.5. Afiinsuskromatograafia

PPC1 ja M21 rakke kasvatati 150 cm² kultiveerimiskolbides kuni 90% konfluentsuseni. Sööde aspireeriti ning rakke pesti 1 kord DPBS-ga. Seejärel aspireeriti DPBS ning rakud dissotseeriti kasutades rakueraldamislahust Cellstripper. 900 000 PPC1 ja M21 raku inkubeeriti 1,5 ml tuubides 0,5 µM RPAR-HRP, biot-HRP või ilma HRP-ta DMEM-is. Reaktsioon viidi läbi vastavalt peatükis 2.2.4. kirjeldatule ning peatati 100 U/ml katalaasi lahusega DPBS-is. Rakud lüüsi lüüsi puhvriga, mis koosnes 1% n-dodetsüül-β-D-maltoosist (n-dodecyl-β-D-maltoside,

DDM; Thermo Fisher Scientific, 89902), ühest proteaaside inhibiitoritablest (Thermo Fisher Scientific, A32965) 2 ml kohta ning 1× proovipuhvrist (Invitrogen, BN2008) DPBS-is. Proovid segati korralikult ning inkubeeriti jääl 30 minutit. Pärast rakkude lüüsimist tsentrifugiti saadud lüsaadid 16 000 × g juures 30 minutit temperatuuril +4 °C. Rakulüsaat eraldati rakuadest ja koguti uude tuubi. Rakulüsaadile lisati 20 µl MagStrep® Strep-Tactin® XT magnetkerakesi (Iba Lifesciences, 2-5090-002). Lüsaate inkubeeriti magnetkerakestega 30 minutit toatemperatuuril pöörleva segamisega. Magnetkerakesi pesti neli korda lüüsipuhvriga. Pärast iga pesu viidi need uude 1,5 ml tuubi. Elueerimiseks resuspendeeriti magnetkerakesed 30 µl-s biotiini (50 mM) sisaldavas lüüsipuhvril ja kuumutati 5 minutit temperatuuril 95°C. Magnetkerakesed eraldati lahusest ning proovid säilitati -20 °C juures.

2.2.6. SDS-PAGE

Afiinsuskromatograafiast saadud proovid sulatati ning segati 10 µl laadimispuhvriga (4× Laemmli puhver (Bio-Rad, 1610747), millele on lisatud 1:10 2-merkaptotoetanooli). Seejärel kuumutati proove 95 °C juures 5 minutit. Valgud kanti 4–20% Mini-PROTEAN® TGX™ eelvalmistatud polüakrüülamiidgeelile (Bio-Rad, 4561095). Elektroforees viidi läbi 100 V pingel 90 minuti jooksul, kasutades 1× Tris/glütsiin/SDS jooksupuhvrit (25 mM Tris, 192 mM glütsiin ja 0,1% (m/v) SDS MQ-vees). Valgumarkerina kasutati Precision Plus Protein Dual Color Standards valgumarkerit (Bio-Rad, 1610374).

2.2.7. Western blot

Proovid valmistati ette Tris/glütsiin/SDS elektroforeesiks ja jooksutati geelis vastavalt peatükis 2.2.6 kirjeldatud protokollile. Valgud kanti polüvinüül difluoriidi (PVDF) membraanile kasutades Trans-Blot Turbo Mini 0,2 µm PVDF ülekandekomplekti (Bio-Rad, 1704156). Ülekanne viidi läbi Trans-Blot® Turbo™ süsteemiga (Bio-Rad, 1704150). Ülekandeks kasutati seadme eelseadistatud protokollil "Mixed MW (Turbo)". Pärast ülekannet pesti membraani 1× TBS-T lahuses (1× Tris-puhverdatud soolalahus ja 0,1% Tween-20 MQ-vees). Seejärel blokeeriti membraan 5% piimapulbri lahusega TBS-T-s 30 minutit toatemperatuuril. Blokeeritud membraan inkubeeriti üleöö temperatuuril +4 °C küüliku monoklonaalse anti-NRP-1 antikehaga (Abcam, ab81321; 1:1000 lahjendus 3% piimapulbris TBS-T-s). Membraani pesti 3 korda 15 minutit TBS-T-ga. Seejärel inkubeeriti membraani 1 tund toatemperatuuril HRP-konjugeeritud anti-küüliku sekundaarse antikehaga (BioLegend, 406401; 1:5000 lahjendus 3% piimapulbris TBS-T-s). Pärast inkubeerimist pesti membraani 3 korda TBS-T-ga. Signaal ilmutati SuperSignal™ West Pico PLUS kemiluminescentsubstraadiga ning membraan skaneeriti LI-COR® Odyssey® Fc skänneriga.

2.2.8. Massi spektromeetria

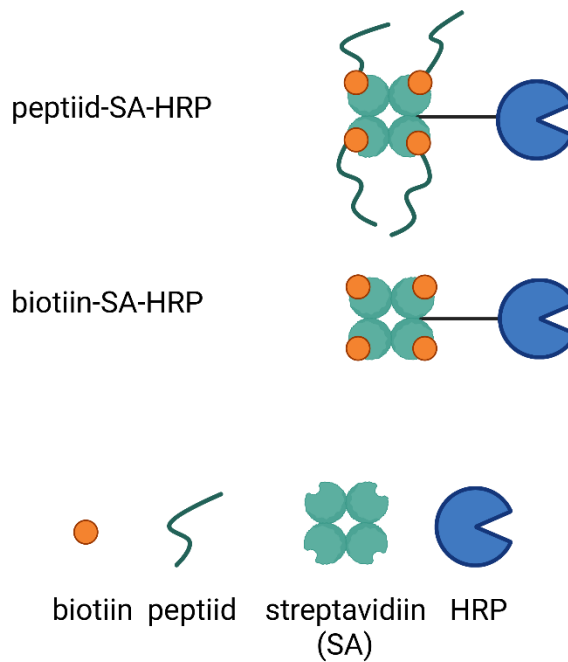
Massispektromeetriliseks analüüsiks inkubeeriti PPC1 rakke 1,5 ml tuubides 0,5 μ M RPAR-HRP või biot-HRP sisaldavas DMEM-is. Reaktsioon viidi läbi vastavalt peatükis 2.2.4 kirjeldatud protokollile ja peatati 100 U/ml katalaasi sisaldava DPBS-iga. Pärast inkubeerimist tsentrifugeeriti rakud viis minutit 300 \times g juures ja külmutati seejärel vedelas lämmastikus. Afiinsuskromatograafia ja massispektromeetriline analüüs viidi läbi Alex Rosa Campose poolt (La Jolla, USA). Andmeanalüüsi viis läbi Karlis Pleiko, kasutades R-programmi RStudio keskkonnas, vastavalt Pleiko et al. (2023) kirjeldatule.

3. Tulemused ja arutelu

Varasemates uuringutes on vaskulaarsete kullerpeptiidide retseptoreid tuvastatud afiinsuskromatograafia abil (Arias et al., 2024; Teesalu et al., 2009). Üheks oluliseks etapiks selles protsessis on rakkude lüüs. Lüüsi käigus purustatakse rakumembraanid, mille tulemusel vabanevad tsütoplasma komponendid, sealhulgas valgud. Rakkude lüüs võib põhjustada soovimatut interaktsiooni peptiidi ja varem ligipääsmatute rakusiseste valkude vahel. Lisaks võib rakumembraani hävimine põhjustada konformatsioonimuutusi rakupinnaretseptorites, mõjutades nende afiinsust uuritava kullerpeptiidi suhtes.

Nende piirangute vältimiseks märgistati käesolevas töös kullerpeptiidi retseptor ja läheduses olevad valgud enne rakkude lüüsimist. Märgistamiseks kasutati kullerpeptiidiga sihitud ja HRP-st sõltuvat lähiligeerimist. Märgistatud valgud isoleeriti seejärel afiinsuskromatograafia abil ning tuvastati, Western blot'i ja massispektromeetriaga. Katsete teostamiseks kasutasime CendR-peptiidi RPARPAR, kuna see on hästi iseloomustatud ja selle sihtretseptor neuropiliin-1 on selgelt määratletud. Lisaks oli RPARPAR meie laboris juba rutiinses kasutuses ning olemas olid vajalikud seadmed ja sobivad rakuliinid.

HRP selektiivsuse tagamiseks konjugeeriti see vaskulaarse kullerpeptiidi RPAR-iga. Konjugatsioon viidi läbi biotiini ja streptavidiini vahelise interaktsiooni abil. HRP oli seotud streptavidiiniga (SA-HRP) ning peptiidile lisatud biotiin võimaldas nende kahe komponendi vahelise kompleksi moodustumise, mille tulemusel saadi RPAR-SA-HRP (RPAR-HRP). Negatiivse kontrollina kasutati SA-HRP-d, mis oli konjugeeritud üksnes biotiinimolekuliga ning ei sisaldanud peptiidi, moodustades biot-SA-HRP (biot-HRP) kompleksi (joonis 4).



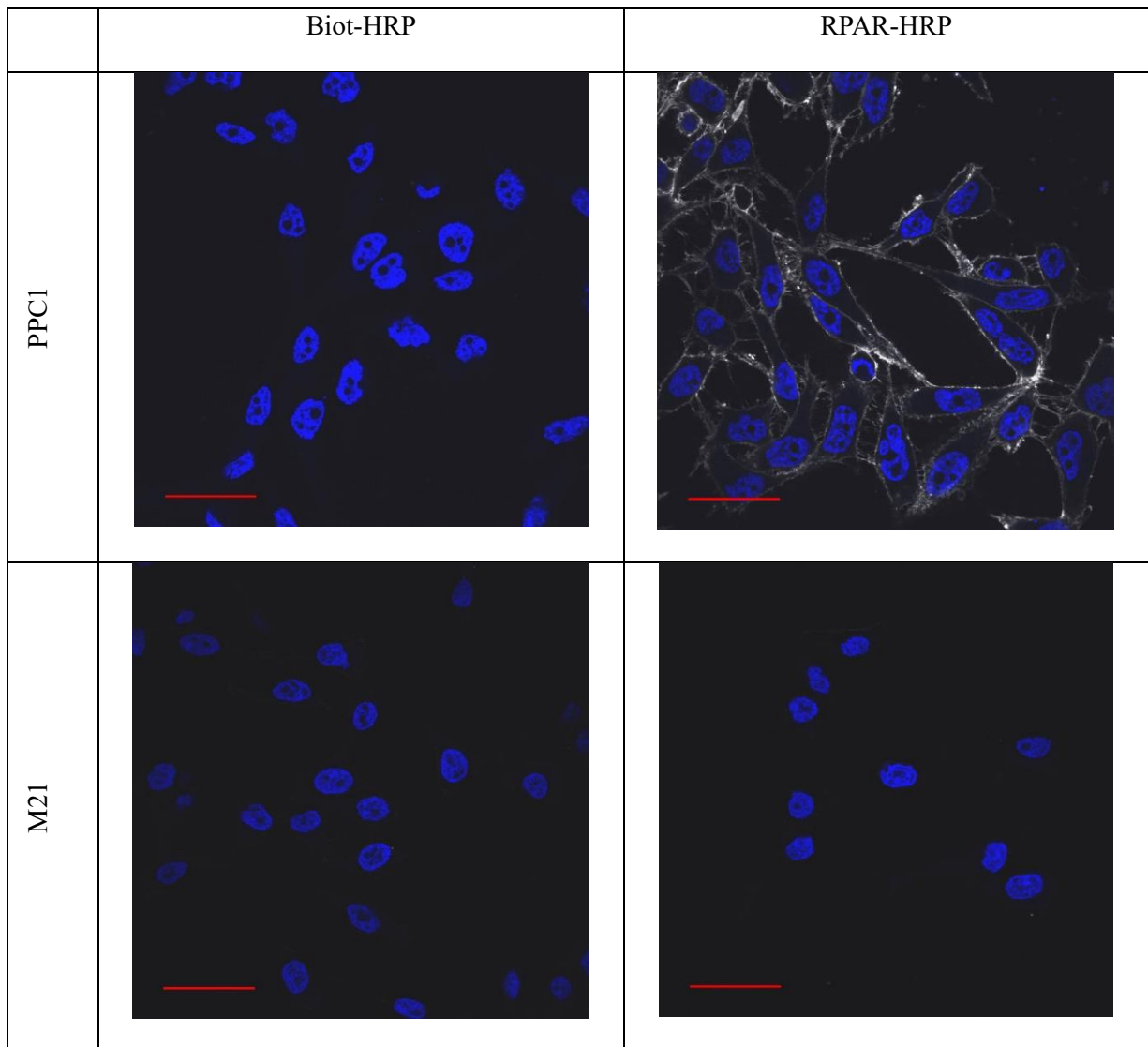
Joonis 4. Peptiid-streptavidiin-mädarõikaperoksüdaas (peptiid-SA-HRP) konjugaadid.
Joonis tehtud programmis BioRender.

3.1.1. RPAR-HRP konjugaat märgistab selektiivselt NRP-1 positiivseid rakke

RPAR-iga konjugeeritud HRP selektiivsuse uurimiseks viidi läbi lähiligeerimise katse NRP-1-positiivsetel ja -negatiivsetel rakuliinidel. RPAR-HRP ja biot-HRP konjugaate inkubeeriti, NRP-1 positiivsete PPC1 rakkude ja NRP-1 negatiivsete M21 rakkudega. Lähiligeerimise reaktsiooni läbiviimiseks inkubeeriti rakke AlexaFluor 647-türamiidi ja H_2O_2 -ga 2 minutit. Reaktsioon peatati katalaasiga, et tagada kontrollitud märgistusperiood. Rakkude analüüsimiseks kasutati konfokaalmikroskoopiat. PPC1 rakkudes, mida inkubeeriti RPAR-HRP-ga, täheldati tugevat fluorestsentsignaali, mis viitab sellele, et HRP säilitab oma ensümaatilise aktiivsuse ka pärast konjugeerimist RPAR-iga. Sellist signaali ei täheldatud PPC1 rakkudes, mida inkubeeriti biot-HRP-ga, ega M21 rakkudes, mis olid inkubeeritud kas RPAR-HRP või biot-HRP-ga. Tulemused kinnitavad RPAR-i selektiivset seondumist PPC1 rakkudega. Fluorestsents lokaliseerus pealtnäha rakupinnale (joonis 5). See võib viidata sellele, et RPAR-HRP kompleks ei tunginud märkimisväärselt raku sisemusse. Teise võimalusena võis kompleks siiski internaliseeruda, kuid nagu varasemates uuringutes on näidatud, puudub HRP-l tsütoplasmas ensümaatiline aktiivsus. Seetõttu ei toimu lähiligeerimise reaktsioon rakusiseses keskkonnas.

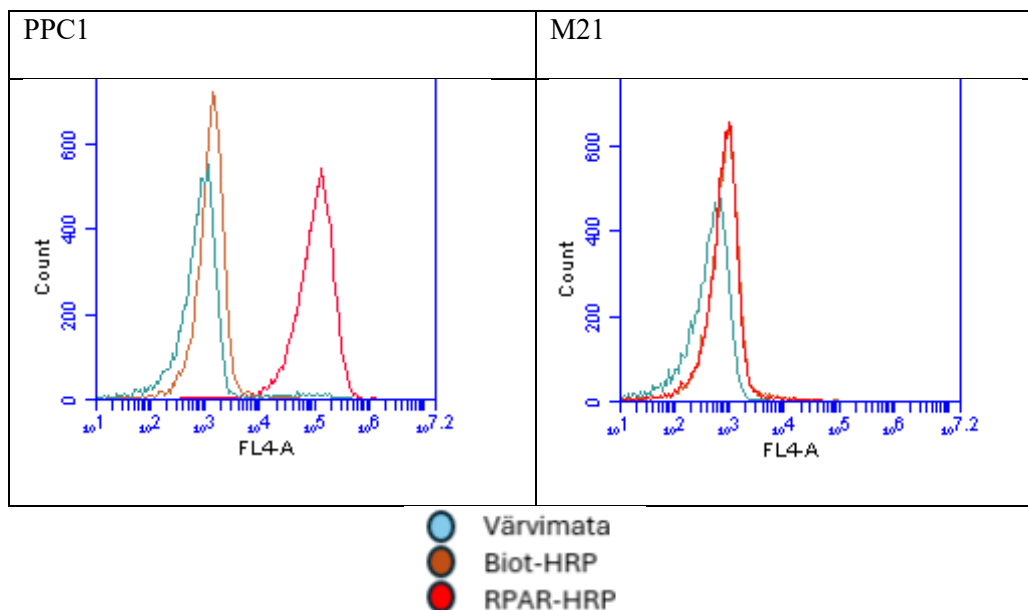
RPAR-HRP kompleksi selektiivsuse ja funktsionaalsuse täiendavaks kinnitamiseks ning kvantitatiivsete andmete kogumiseks korraldati katsed elusate, suspensioonis olevate PPC1 ja M21 rakkudega. Tulemusi analüüsiti voolutsütomeetria abil (joonis 6). Rakususpensioone inkubeeriti RPAR-HRP või biot-HRP-ga 1 tund toatemperatuuril pöörleva segamisega. Lähiligeerimise reaktsiooni läbiviimiseks inkubeeriti rakususpensioone AlexaFluor 647-türamiidi ja H₂O₂-ga 2 minutit. Pärast märgistamist fikseeriti rakud paraformaldehüüdiga (PFA) ja valmistati ette voolutsütomeetriliseks analüüsiks.

RPAR-HRP-ga inkubeeritud PPC1 rakkude lähiligeerimine andis tugevaima fluorestsentsisignaali, kinnitades konjugaadi spetsiifilist ja efektiivset seondumist NRP-1 ekspresseerivatele rakkudele. Statistiline analüüs näitas, et RPAR-HRP-ga töödeldud PPC1 rakkude signaal erines oluliselt teistest rühmadest ($p < 0,001$). PPC1 rakud, mida töödeldi biot-HRP-ga, andsid signaali, mis oli võrreldav fikseeritud värvimata rakkude signaaliga. M21 rakkude puhul andsid mõlemad konjugaadid sarnase signaali värvimata kontrollrakkudega. Koos konfokaalmikroskoopia ja voolutsütomeetria tulemustega kinnitavad need andmed, et nii RPAR kui ka HRP säilitavad oma funktsionaalsuse konjugatsiooni järel ning RPAR-HRP konjugaat võimaldab spetsiifilist märgistamist NRP-1-positiivsetes rakkudes AlexaFluor 647-türamiidi abil.

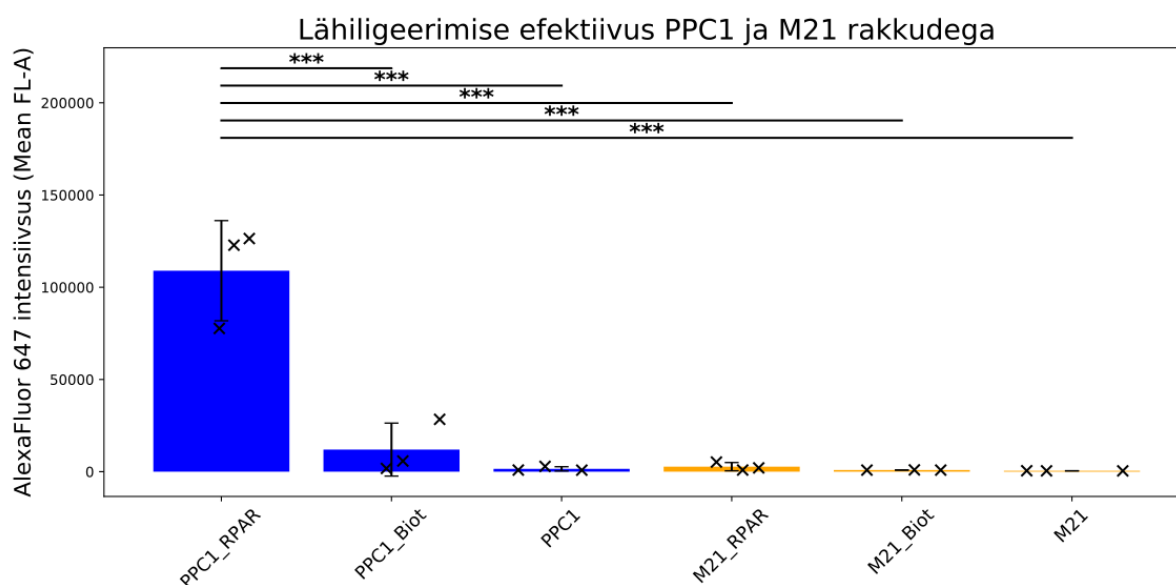


Joonis 5. PPC1 ja M21 rakkude märgistamine AlexaFluor 647 abil HRP-st sõltuva lähiligeerimise kaudu konfokaalmikroskoopia jaoks. PPC1 ja M21 rakud inkubeeriti RPAR-HRP või biot-HRP-ga. Seejärel viidi läbi lähiligeerimisreaktsioon, mille käigus kasutati rakkude märgistamiseks AlexaFluor 647-türamiidi (valge). Rakutuomad värviti DAPI-ga (sinine). Valge signaal viitab rakkude edukale märgistamisele AlexaFluor 647-türamiidiga. N=3 (lisa 1). Skaalajoon 15 µm. Kujutised jäädvustati Olympus FV1200MPE konfokaalmikroskoobiga, kasutades 60× õli-immersiooni objektiivi.

A



B



Joonis 6. PPC1 ja M21 rakkude märgistamine AlexaFluor 647-türamiidiga HRP-st sõltuva lähiligeerimisega voolutsütomeetria analüüsi jaoks.
A) Histogrammid, mis näitavad PPC1 ja M21 rakkude märgistust. PPC1 ja M21 rakud inkubeeriti RPAR-HRP-ga (punane), biot-HRP-ga (pruun) või jäeti töötlemata (helesinine). Seejärel viidi läbi lähiligeerimise reaktsioon, mille käigus kasutati rakkude märgistamiseks AlexaFluor 647-türamiidi. X-telg kujutab fluorestsentsi intensiivsust (AlexaFluor 647) ja Y-telg näitab rakkude arvu. N=3 (lisa 2) **B)** Lähiligeerimise kvantifitseerimine, kasutades AlexaFluor 647-türamiidi. Tulpdiagramm näitab PPC1 ja M21 rakkude keskmist fluorestsentsi intensiivsust (Mean FL-A) pärast inkubeerimist RPAR-HRP-ga, biot-HRP-ga või töötlemata jätmist. Andmed esindavad kolme sõltumatu katse (n=3) keskmisi väärtusi. Märkimisväärne intensiivsuse suurenemine täheldati PPC1 rakkudes, mida töödeldi RPAR-HRP-ga. Andmed on esitatud keskmise ± standardhälbena (SD). Rühmade erinevusi analüüsiti ühefaktorilise dispersioonianalüüsi (ANOVA) abil, millele järgnes Tukey HSD (*Honestly Significant*

Difference) *post hoc* test mitmikvõrdluste jaoks. Statistiline olulisus määrati tasemel $p < 0,05$. Kõik analüüsid viidi läbi Pythonis (v3.10). (***) tähistab statistilist olulisust $p < 0,001$ võrreldes PPC1 rakkudega, mida töödeldi RPAR-HRP-ga (lisa 3).

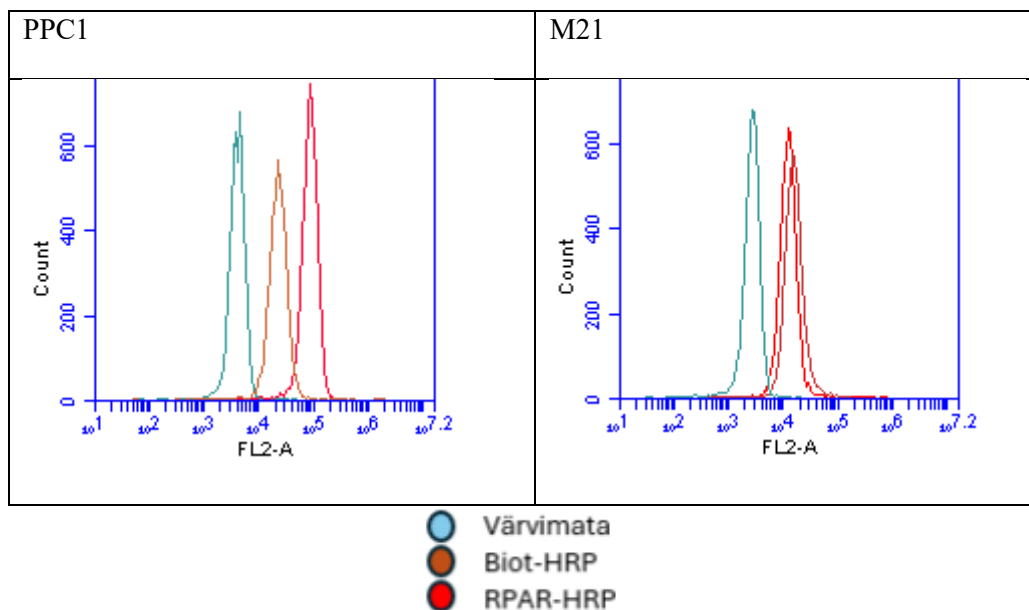
3.1.2. Rakupinna proteoomi selektiivne biotinüleerimine

Pärast RPAR-HRP konjugaadi selektiivse märgistamisvõime kinnitamist NRP-1-positiivsetes rakkudes seati järgmise etapina eesmärgiks katsetada molekule, mis sobivad paremini afiinsuskromatograafia jaoks. Biotiin valiti selle kõrge afiinsuse tõttu streptavidiini suhtes, mis lihtsustab edasist töövoogu. Edukas biotinüleerimine näitab ühtlasi, et RPAR-HRP-ga märgistamisel saab kasutada ka alternatiivseid türamiidi konjugaate.

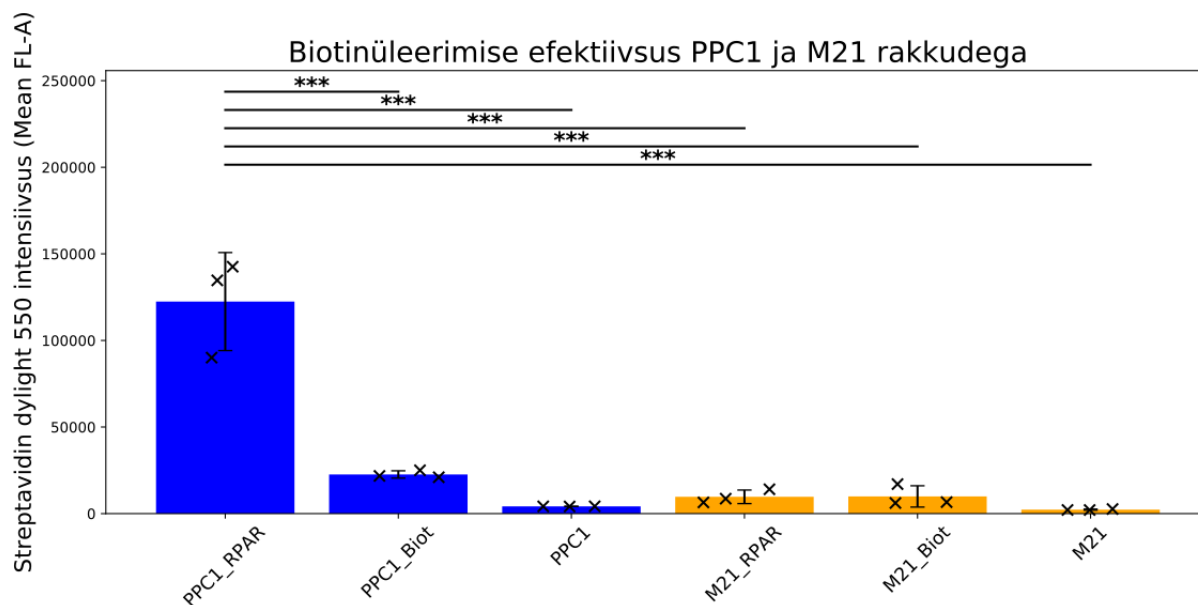
RPAR-HRP ja biot-HRP konjugaate inkubeeriti elusate, suspensioonis olevate PPC1 ja M21 rakkudega. Lähiligeerimise reaktsiooni läbiviimiseks inkubeeriti rakke 2 minutit biotiin-türamiidi ja H_2O_2 -ga, mille järel reaktsioon peatati katalaasiga. Biotinüleeritud rakkude tuvastamiseks inkubeeriti neid streptavidiin-DyLight 550-ga.

Kõrgeim fluorestsentsisignaali täheldati PPC1 rakkudes, mida töödeldi RPAR-HRP-ga, kinnitades konjugaadi efektiivsust ja selektiivsust. Statistiline analüüs näitas, et RPAR-HRP-ga töödeldud PPC1 rakkude signaal erines oluliselt teistest rühmadest ($p < 0,001$). PPC1 rakud, mida töödeldi biot-HRP-ga, näitasid küll fluorestsentsi suurenemist võrreldes värvimata kontrollidega, kuid signaal jäi madalamaks kui RPAR-HRP-ga töödeldud rakkudes. Nagu varasemates katsetes, näitasid M21 rakud mõlemal juhul minimaalset või puuduvat signaali. Võrreldes eelnevate katsetega täheldati kerget taustsignaali suurenemist nii M21 kui ka PPC1 rakkudes (joonis 7). See võib olla tingitud streptavidiin-DyLight 550 mittespetsiifilisest seondumisest rakupinnale, rõhutades põhjalike pesuetappide ja kontrollproovide olulisust, et taustsignaali minimeerida ja tuvastada.

A



B

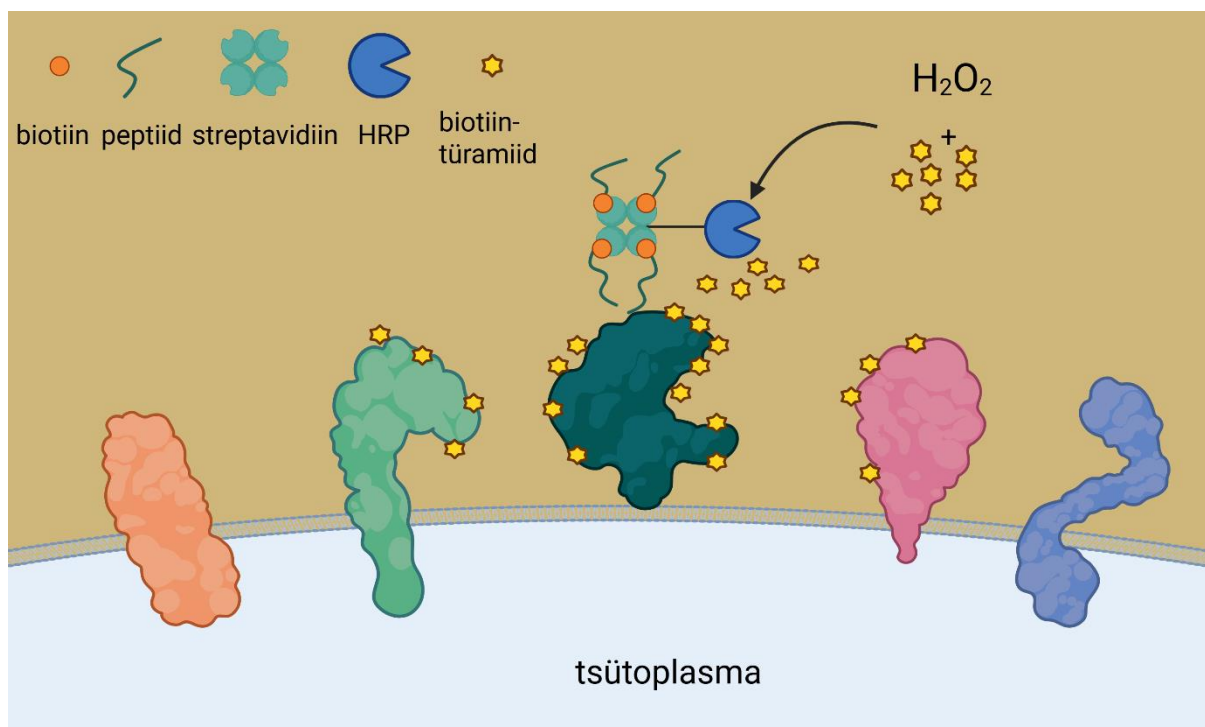


Joonis 7. PPC1 ja M21 rakkude märgistamine biotiiniga HRP-st sõltuva lähiligeerimise kaudu volutsütomeetria analüüsi jaoks.

A) Histogrammid, mis näitavad PPC1 ja M21 rakkude biotinüleerimist. PPC1 ja M21 rakud inkubeeriti RPAR-HRP-ga (punane), biot-HRP-ga (pruun) või jäeti töötlemata (helesinine). Seejärel viidi läbi lähiligeerimise reaktsioon, mille käigus kasutati rakkude biotinüleerimiseks biotiin-türamiidi. Biotinüleerimise efektiivsust mõõdeti rakkude värvimise kaudu streptavidiin-DyLight 550-ga. X-telg kujutab keskmist fluorestsentsintensiivsust (streptavidiin-DyLight 550) ja Y-telg näitab rakkude arvu. N=3 (lisa 4). B) Biotiin-türamiidiga lähiligeerimise kvantifitseerimine. Tulpdiagramm näitab PPC1 ja M21 rakkude keskmist fluorestsentsintensiivsust (Mean FL-A) pärast inkubeerimist RPAR-HRP-ga, biot-HRP-ga või töötlemata jätmist. Andmed esindavad kolme sõltumatu katse (n=3) keskmisi väärtusi. Andmed on esitatud keskmise ± standardhälbena (SD). Rühmade erinevusi analüüsiti ühefaktorilise dispersioonianalüüsi (ANOVA) abil, millele järgnes Tukey HSD (*Honestly Significant*

Difference) *post hoc* test mitmikvõrdluste jaoks. Statistiline olulisus määrati tasemel $p < 0,05$. Kõik analüüsid viidi läbi Pythonis (v3.10). (***) tähistab statistilist olulisust $p < 0,001$ võrreldes PPC1 rakkudega, mida töödeldi RPAR-HRP-ga (lisa 2).

Kokkuvõttes kinnitavad need tulemused, et RPAR-HRP konjugaat säilitab nii sihtmärgile seondumise võime kui ka ensümaatilise aktiivsuse, võimaldades spetsiifilist rakupinnavalkude märgistamist. Lisaks näitavad andmed, et märgistamine ei piirdu fluorestseeruva AlexaFluor-türamiidiga, vaid on edukalt laiendatav ka biotiin-türamiidile, luues võimaluse kasutada seda süsteemi edasiseks afiinsuspõhiseks isolatsiooniks ja proteoomika-analüüsiks (joonis 8).



Joonis 8. Kullerpeptiidiga sihitud, HRP-st sõltuv lähiligeerimine biotiin-türamiidiga. HRP-kompleks lokaliseerub retseptori juurde kullerpeptiidi abil. Lähiligeerimise reaktsiooni läbiviimiseks lisatakse segule biotiin-türamiid ja vesinikperoksiid. HRP katalüüsib H_2O_2 toimel biotiin-türamiidis sisalduva türamiidrühma oksüdeerumist reaktiivseks radikaaliks, mis on võimeline moodustama kovalentseid sidemeid läheduses asuvate valkude türosiini jääkidega. Läheduses olevad valgud märgistatakse. Joonis tehtud programmis BioRender.

3.1.3. Biotinüleeritud valkude afiinsuskromatograafia.

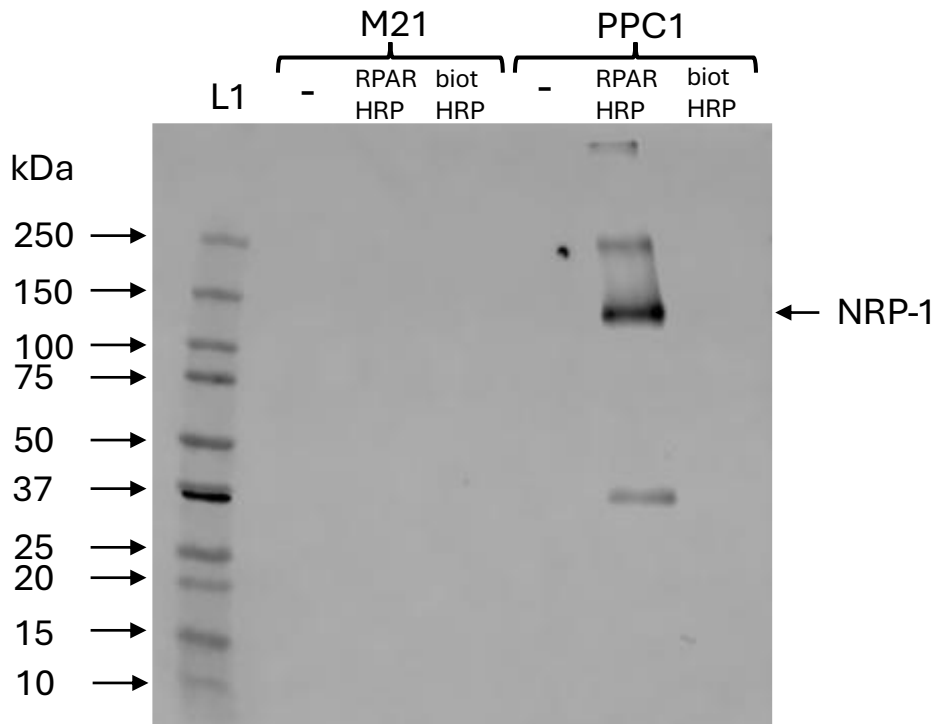
Pärast selektiivse biotinüleerimise kinnitamist PPC1 rakkudes viidi läbi märgistatud valkude isoleerimine afiinsuskromatograafia abil. Selleks inkubeeriti elusad PPC1 ja M21 rakususpensioone RPAR-HRP, biot-HRP või ilma HRP-ta (negatiivne kontroll) lahustes. Lähiligeerimine viidi läbi biotiin-türamiidi ja vesinikperoksiidi abil ning reaktsioon peatati katalaasiga. Pärast märgistamist lüüsi rakud 1% DDM-i sisaldava lüüsipuhvriga ning biotinüleeritud valkude eraldamiseks lisati lüsaadid MagStrep® Strep-Tactin® XT magnetkerakestele. Elueerimiseks inkubeeriti magnetkerakesi 50 μ M biotiinilahusega ja kuumatati 5 minutit 95°C.

Elueeritud fraktsioone analüüsi Western blot'i abil. Western blot'is kasutati primaarse antikehana küüliku monoklonaalset anti-NRP-1 antikeha, millele järgnes HRP-konjugeeritud küülikuvastane sekundaarne antikeha. Signaali ilmutamiseks membraanil kasutati SuperSignal™ West Pico PLUS kemiluminescentsubstraati

PPC1 rakkudes, mida oli töödeldud RPAR-HRP-ga, ilmnes Western bloti analüüsis ~130 kDa-le vastav selge valgubänd (joonis 9). See signaal puudus biot-HRP-ga töödeldud proovides, töötlemata proovides ning kõigis M21 rakuproovides. Signaali molekulmassi ja reaktsiooni põhjal NRP-1 antikehaga järeldati, et tegu on neuropiliin-1-ga. Lisaks täheldati RPAR-HRP-ga töödeldud PPC1 proovides madalama intensiivsusega lisabände, mis on tõenäoliselt põhjustatud primaarse või sekundaarse antikeha mittespetsiifilisest seondumisest.

Tulemused kinnitavad, et RPAR-HRP konjugaat võimaldab spetsiifiliselt märgistada ja isoleerida rakupinnal paikneva RPAR-i retseptori neuropiliin-1, pakkudes tugevat tõendit sihitud lähiligeerimise rakendatavuse kohta retseptorite isoleerimisel. Biot-HRP ja M21 rakuproovides signaalide puudumine viitab, et märgistamine ei ole põhjustatud HRP üldisest aktiivsusest ega mittespetsiifilisest biotinüleerimisest, vaid peegeldab spetsiifilist koostoimet RPAR-i ja NRP-1 vahel.

Western blot'i kasutamine eeldab spetsiifilise antikeha olemasolu, mistõttu peab sihtvalgu identiteet olema eelnevalt teada. Seetõttu ei sobi Western blot iseseisvalt uute vaskulaarsete kullerpeptiidide retseptorite täpseks tuvastamiseks ilma täiendavate analüüside või valideerivate katseteta. Meie tulemused näitavad siiski, et peptiidiga suunatud ja HRP-st sõltuva lähiligeerimise abil on võimalik retseptorit märgistada ja isoleerida. Retseptori täpseks tuvastamiseks on vaja kasutada meetodeid, mis ei eelda eelnevaid teadmisi retseptori kohta, näiteks massispektromeetrilist analüüsi.



Joonis 9. Western blot-analüüs Neuropiliin-1 (NRP-1) tuvastamiseks. PPC1 ja M21 rakke inkubeeriti RPAR-HRP-ga, biot-HRP-ga või jäeti töötlemata. Seejärel viidi läbi lähiligeerimise reaktsioon, mille käigus kasutati rakkude valkude märgistamiseks biotiin-türamiidi. Biotinüleeritud valgud eraldati affiinsuskromatograafia abil. Valgud lahutati kasutades SDS-PAGE-i ja kanti PVDF membraanile. Western blot teostati NRP-1 vastase antikehaga. L1 tähistab valgumarkerit.

3.1.4. Mass spektrometria

Massispektrometrilise (MS) analüüsi jaoks inkubeeriti suspensioonis olevaid PPC1 rakke RPAR-HRP või biot-HRP konjugaatidega. Lähiligeerimise reaktsioon viidi läbi kasutades biotiin-türamiidi, mille tulemusel biotinüleeriti RPAR-HRP või biot-HRP läheduses asuvad rakupinna valgud. Reaktsioon peatati katalaasi lisamisega. Seejärel tsentrifugeeriti rakud 5 minutit $300 \times g$ juures ja külmutati vedelas lämmastikus. Sellisel viisil valmistati ette kaheksa proovi: neli RPAR-HRP-ga ja neli biot-HRP-ga töödeldud rakkude proovikomplekti. Katse sooritas Maarja Haugas. Proovid saadeti kuival jääl Alex Rosa Campos'ele La Jollasse, USA-sse, kus viidi läbi valgupuhastus ja massispektrometriline analüüs.

Saadud andmeid analüüsiti Karlis Pleiko poolt, kasutades programmeerimiskeelt R RStudio keskkonnas. Kõik kaheksa proovi jaotati kaheks rühmaks: RPAR-HRP ja biot-HRP töödeldud rühmad. Eesmärgiks oli tuvastada valgud, mis esinesid ühtlaselt kõigis neljas kordusproovis ja mille kogus oli kõrgem RPAR-HRP-ga töödeldud proovides.

Tuvastatud valgud järjestati valepositiivse määramise määra (ingl. *false discovery rate*, FDR) alusel. Madalam FDR väärtus näitab väiksemat varieeruvust proovide vahel ja kõrgemat

usaldusväarsust. Lisaks arvutati logaritmiline korduse muutus (ingl. *logarithmic fold change*, \log_2FC), et võrrelda erinevate valkude hulka RPAR-HRP ja biot-HRP proovides. Positiivne \log_2FC väärtus viitab kõrgemale valgusisaldusele RPAR-HRP proovides, samas negatiivne väärtus näitab suuremat valguhulka biot-HRP proovides.

Teades, et RPAR-i retseptoriks on NRP-1, eeldati, et NRP-1 on massispektromeetrias üks enim tuvastatud valkudest. NRP-1 oli neljanda kõige madalama FDR-i väärtusega ning selle \log_2FC oli ligikaudu 4,3. Ligikaudu 4,3 suurune \log_2FC väärtus viitab sellele, et NRP-1 sisaldus oli RPAR-HRP-ga töödeldud proovides umbes 20 korda suurem kui biot-HRP proovides. NRP-1 madal FDR ja kõrge \log_2FC kinnitavad, et valk oli järjepidevalt ja selektiivselt märgistatud RPAR-HRP-ga töödeldud proovides, tõestades nii märgistamise spetsiifilisust kui ka meetodi usaldusväarsust sihtretseptori tuvastamisel (joonis 10).

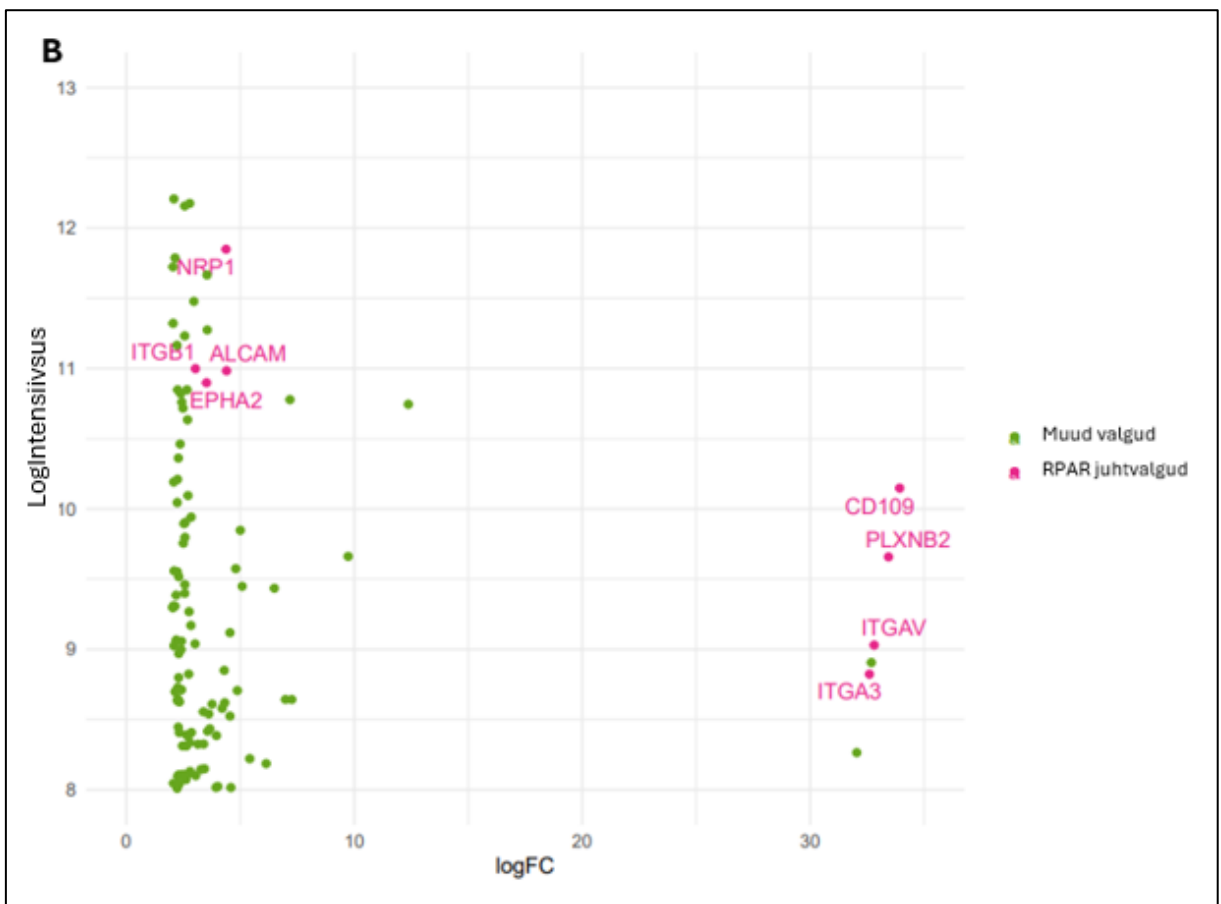
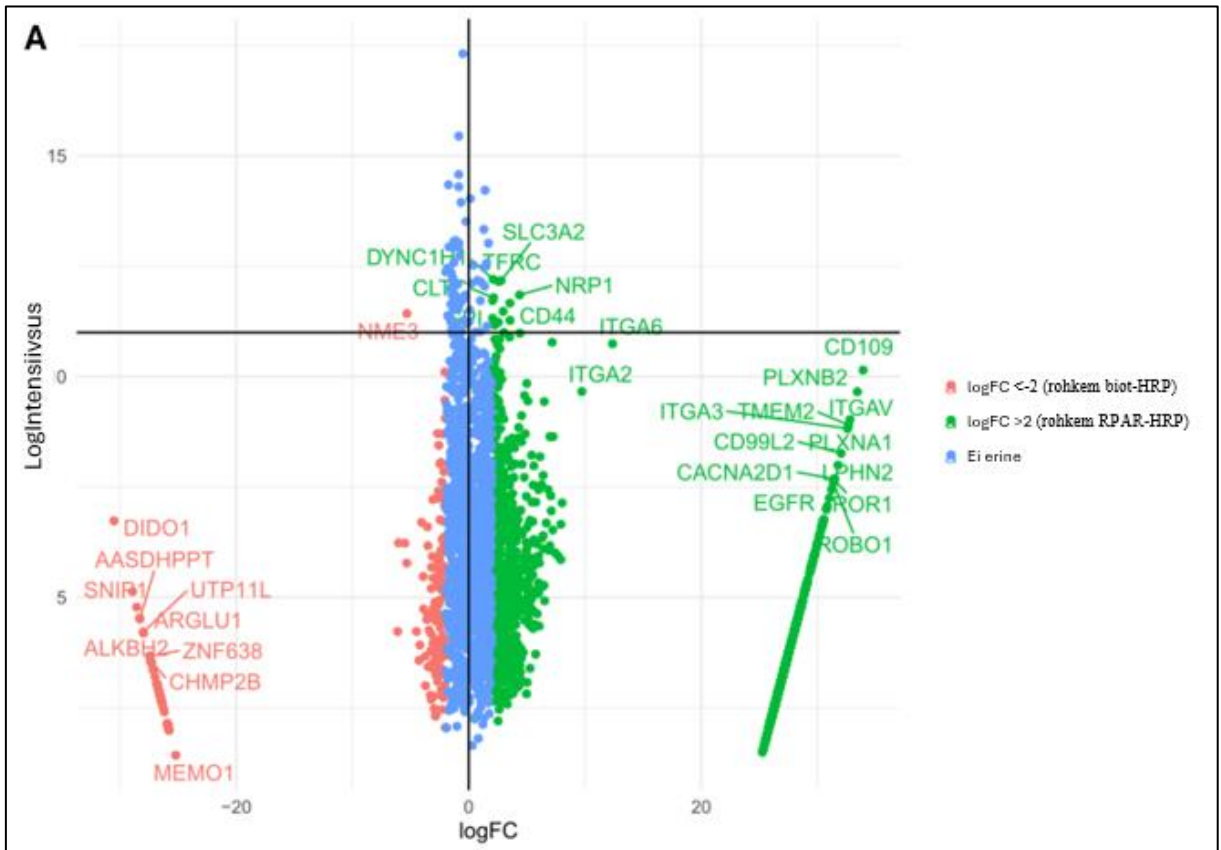
Järjestades valgud FDR alusel, leidsime lisaks NRP-1-le mitmeid teisi valke, mille esinemismuster ja statistilised näitajad viitavad sellele, et need märgistati ja isoleeriti samuti lähiligeerimise ning afiinsuskromatograafia käigus (joonis 9). Aktiveeritud leukotsüütide adhesioonimolekul (ingl. *activated leukocyte cell adhesion molecule*, ALCAM), ephriini tüüp-A retseptor 2 (ingl. *ephrin type-A receptor 2*, EPHA2) ja integriin beeta 1 (ingl. *integrin beta 1*, ITGB1) näitasid NRP-1-le sarnast \log_2FC väärtust, mis viitab sellele, et need valgud märgistati lähiligeerimisega ja isoleeriti sellele järgnenud afiinsuskromatograafia käigus. Samuti avastasime valke, mille FDR oli madal, kuid \log_2FC väärtus oli kõrgem kui NRP-1-l ($\log_2FC > 30$). Nende hulka kuulusid integriin alfa 3 (ingl. *integrin alpha 3*, ITGA3), pleksiin-B2 (ingl. *plexin-B2*, PLXNB2), diferentseerumismarker 109 (ingl. *cluster of differentiation 109*, CD109) ja integriin alfa V (ingl. *integrin alpha V*, ITGAV). Toorandmete täpsemal ülevaatusel selgus, et nende valkude puhul oli kõrge \log_2FC põhjuseks nende valkude täielik puudumine biot-HRP proovidest, kuid samas kõrge esinemissagedus RPAR-HRP töödeldud proovides.

Kirjanduses on varem kirjeldatud ALCAM-i, PLXNB2 ja mitme integriini koostoimeid NRP-1-ga (Benwell et al., 2024; Bye et al., 2019; Gui et al., 2024; Kim et al., 2017; Takahashi et al., 1999). EPHA2 ja CD109 koostoimet NRP-1-ga ei ole seni kirjeldatud, kuid nende valkude omadused on huvipakkuvad ning võivad viidata seotusele NRP-1-ga. Sarnaselt NRP-1-le, on ka EPHA2 angiogeneesis osalev valk, mis aktiveerub ligandi seondumisel (Baharuddin et al., 2018; Ferrara et al., 2013; Singh et al., 2018). CD109 on tuvastatud biomarkerina mitmes vähivormis ning selle kõrge tase on seotud metastaaside ja raviresistentsusega kopsuvähis (Adachi et al., 2022; Lee et al., 2020). Käesoleva töö tulemused viitavad võimalusele, et RPAR seondub neuropiliin-1-le mitte üksnes lihtsa ligand-retseptor interaktsioonina, vaid initsieerib kõrgema järgu proteiinikompleksi moodustumise rakupinnal või selle läheduses.

Massispektromeetria abil tuvastatud valgud võivad olla osa sellest dünaamilisest ja funktsionaalsest nanostruktuurist, mis vastutab CendR-tee signalisatsiooni ja/või endotsütoosi eest. Selle mehhanismi parem mõistmine võiks aidata kaasa täppisravimite väljatöötamisele, mis rakendavad NRP-1 vahendatud sisestusteid. Et seda eeldust kinnitada, on vaja täiendavaid biokeemilisi ja mikroskoopiapõhiseid ko-lokaliseerimise katseid, et iseloomustada komplekside koostist ja dünaamikat. Lisaks viitavad MS-tulemused sellele, et lähiligeerimine on väärtuslik meetod kullerpeptiidide seondumismehhanismi ja rakku sisenemise mehhanismi täpsemaks kirjeldamiseks.

Massispektromeetria tulemused näitavad, et kullerpeptiidi retseptori tuvastamine ei piirdu MS-analüüsiga. MS-andmetes võib esineda mitu valku sarnaste FDR- ja \log_2FC -väärtustega, mis raskendab kullerpeptiidi retseptori täpset määramist. Uute, seni määramata retseptoritega peptiidide puhul on retseptori täpseks tuvastamiseks vajalikud täiendavad katsed, näiteks rakuvabad seondumiskatsed. Sellegipoolest võimaldab HRP-st sõltuv lähiligeerimine koos biotinüleeritud valkude eraldamise ja MS-analüüsiga oluliselt kitsendada potentsiaalsete sihtmärkide valikut. Kuigi meetodit saab rakendada vaskulaarsete kullerpeptiidide sihtretseptorite määramiseks, eeldab see siiski teatavaid eelnevaid teadmisi, näiteks rakuliini, millega konkreetne peptiid seondub. Sobiva rakuliini tuvastamine võib osutuda keeruliseks, eriti kui teada on vaid koe päritolu. Samuti ei ole kõikidest kudedest ja organitest pärit rakuliine alati olemas või on need raskesti kättesaadavad. Lisaks võib *in vitro* keskkond oluliselt erineda elusorganismis toimuvatest tingimustest. Kõik eelnev rõhutab vajadust meetodi järele, mis võimaldaks sihtretseptorite määramist ka *in vivo* või *ex vivo* tingimustes. Käesoleva töö tulemused viitavad, et peptiidiga suunatud ja HRP-st sõltuvat lähiligeerimist on võimalik rakendada retseptorite märgistamiseks ka *in vivo* või *ex vivo* tingimustes. *In vivo* ja *ex vivo* retseptorite tuvastamine võib toimuda sarnaselt käesolevas töös kirjeldatud protokollile, kuid see eeldab täiendavaid uuringuid.

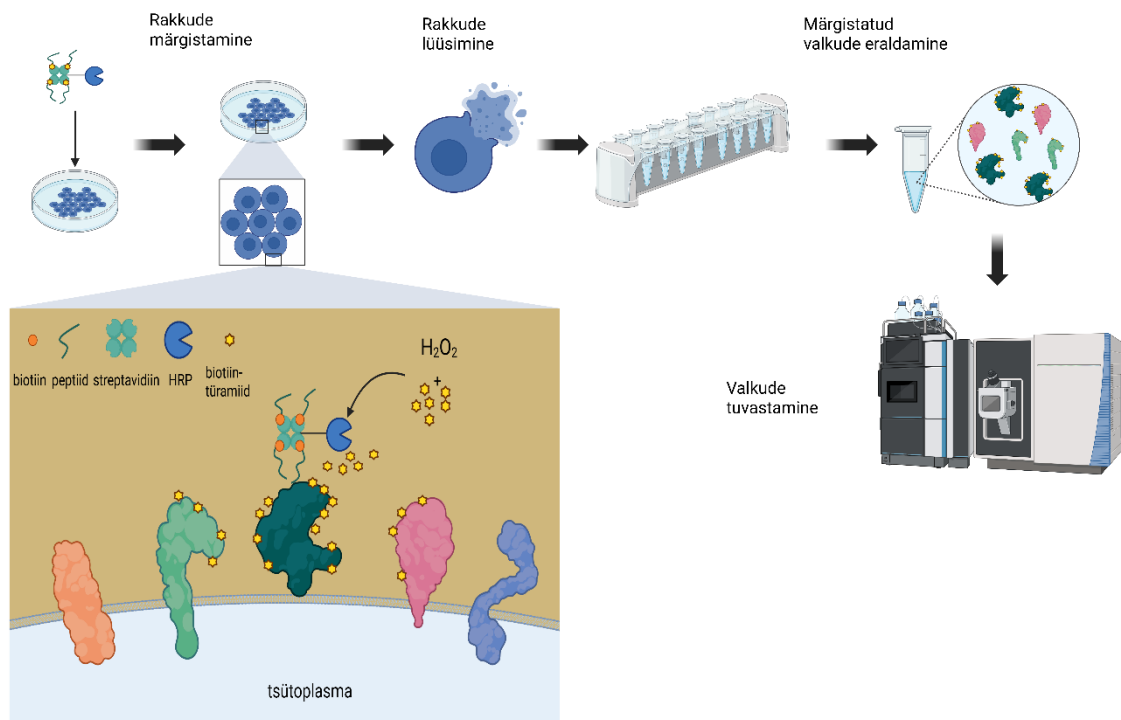
Kokkuvõttes kinnitavad saadud tulemused, et peptiidiga suunatud ning HRP-st sõltuv lähiligeerimine koos sellele järgneva afiinsuskromatograafia ja massispektromeetriaga, moodustavad sobiva töövoos (joonis 11) vaskulaarsete kullerpeptiidide sihtretseptorite märgistamiseks, isoleerimiseks ja tuvastamiseks. Tulevastes uuringutes on oluline rakendada välja töötatud lähiligeerimismeetodit ka teiste kullerpeptiidide retseptorite tuvastamiseks. Eesmärk peaks olema nii uute peptiid-retseptor interaktsioonide valideerimine kui ka meetodi kohandamine keerukamatesse eksperimentaaltingimustesse. Eriti oluline on meetodi rakendamine *in vivo* ja *ex vivo* süsteemides. Need võimaldavad ületada töös kirjeldatud *in vitro* protokolliga seotud piirangu, milleks on sobiva rakuliini olemasolu vajadus.



C	Valk	log ₂ FC	Log ₂ intensiivsus	P-väärtus	FDR
1	ALCAM	4,396849	10,98313	2,70E-10	6,39E-07
2	EPHA2	3,519984	10,89764	9,95E-10	1,18E-06
3	ITGB1	3,033646	10,99826	4,32E-09	3,03E-06
4	NRP1	4,37643	11,84859	6,40E-09	3,03E-06
5	ITGA3	32,59986	8,822525	7,16E-09	3,03E-06
6	PLXNB2	33,43521	9,657876	7,68E-09	3,03E-06
7	CD109	33,92525	10,14791	1,23E-08	3,77E-06
8	ITGAV	32,8071	9,029759	1,28E-08	3,77E-06

Joonis 10. Massispektrometriaal põhinev PPC1 rakkude diferentsiaalse valgurohkuse analüüs pärast töötlemist RPAR-HRP või biot-HRP-ga.

A) Diagramm, mis näitab valkude jaotust proovides, mida töödeldi RPAR-HRP-ga (n=4) ja biot-HRP-ga (n=4). Iga punkt esindab individuaalset valku, mis on kaardistatud logaritmilise voldimuutuse (log₂FC) ja loendite logaritmilise intensiivsuse (log₂intensiivsus) alusel. Valgud, mis on RPAR-HRP-ga töödeldud proovides rikkalikumalt esindatud (log₂FC > 2), on märgitud rohelisega. Valgud, mis on biot-HRP-ga töödeldud proovides rikkalikumalt esindatud (log₂FC < -2), on märgitud punasega. Valgud, mille rohkus ei erinenud oluliselt kummaski proovis, on märgitud sinisega. **B)** Suurendatud diagramm, mis keskendub piirkonnale, kus asuvad valgud, mis on rohkem esindatud RPAR-HRP-ga töödeldud proovides. RPAR-HRP-ga töödeldud proovide juhtvalgud on märgitud roosaga. **C)** Kokkuvõtlik tabel kaheksa valgu kohta (juhtvalgud), mille diferentsiaalne rohkus on tugevaima statistilise tõendusmaterjaliga, järjestatud valepositiivse määramise määra (FDR) alusel. NRP-1 tähistatud sinisega. Valgud, mille interaktsiooni NRP-1ga on kirjanduses kirjeldatud tähistatud rohelisega. Valgud, mille interaktsiooni pole kirjeldatud tähistatud valgega.



Joonis 11. Peptiidiga juhitud, HRP-st sõltuva lähiligeerimise töövoog. Rakud märgistatakse kasutades peptiid-streptavidiin-HRP kompleksi. Rakud lüüsitakse ja märgistatud valgud eraldatakse. Eraldatud valgud tuvastatakse massispektrometria abil. Joonis tehtud programis BioRender.

Kokkuvõte

Töö eesmärgiks oli arendada usaldusväärsem ja tõhusam meetod vaskulaarsete kullerpeptiidide retseptorite määramiseks. Protokollid väljatöötamiseks ja valideerimiseks kasutati mudelsüsteemina hästi iseloomustatud peptiidi RPARPAR ja selle retseptorit NRP-1. Töö tugines kolmele hüpoteesile: (1) Kullerpeptiide saab konjugeerida SA-HRP kompleksiga, kasutades biotiin-streptavidiini seondumismehhanismi; (2) peptiid-SA-HRP konjugaat märgistab *in vitro* läheduses paiknevaid valke; (3) märgistatud valgud on isoleeritavad afiinsuskromatograafia ja tuvastatavad massispektromeetria abil, võimaldades määrata peptiidi retseptorit.

Esimese ja teise hüpoteesi kinnitamiseks valmistati RPAR-HRP konjugaat, konjugeerides biotiin-ahx-RPARPAR-OH peptiid SA-HRP-ga. Mittespetsiifilise märgistuse ja taustsignaali hindamiseks kasutati biotiin-HRP-d, mis saadi konjugeerides biotiin SA-HRP-ga. RPAR-HRP konjugaadi selektiivsust NRP-1 positiivsete rakkude suhtes hinnati lähiligeerimise katsetes. Lähiligeerimiseks kasutati AlexaFluor 647-türamiidi ja biotiin-türamiidi. Tulemusi analüüsiti konfokaalmikroskoopia ja voolutsütomeetria abil. Märgistus ilmnis ainult NRP-1 ekspresseerivates PPC1 rakkudes, kinnitades nii RPAR-peptiidi sihtmärgispetsiifilisust kui ka HRP ensümaatilise aktiivsuse säilimist pärast konjugatsiooni. Tulemused näitavad, et RPAR-HRP võimaldab efektiivselt ja selektiivselt märgistada NRP-1 positiivseid rakke erinevate türamiidi konjugaatidega. Valkude selektiivne märgistamine biotiin-türamiidiga võimaldab valkude edasist isoleerimist ja proteoomikaanalüüsi.

Kolmanda hüpoteesi kontrollimiseks viidi läbi biotiin-türamiidiga märgistatud valkude isoleerimine afiinsuskromatograafia abil. Isoleeritud valke analüüsiti Western blot'i ja massispektromeetria abil. RPAR-HRP-ga töödeldud proovides tuvastati Western blot'is selge ~130 kDa valgubänd, mis vastas neuropiliin-1-le, kinnitades märgistuse spetsiifilisust ja meetodi toimivust. Massispektromeetria tulemused näitasid NRP-1 tugevat rikastumist RPAR-HRP proovides võrreldes kontrollidega, tõestades meetodi usaldusväärsust sihtretseptori tuvastamisel. Lisaks tuvastati massispektromeetria abil mitmeid teisi valke, mille omadused ja varasemad uuringud viitavad võimalikule seotusele NRP-1-ga, vihjates komplekssemale retseptorivõrgustikule. Meetodi usaldusväärsust ja potentisaali kinnitab nii NRP-1 edukas tuvastamine kui ka uute võimalike NRP-1 interaktsioonipartnerite avastamine. Tulemused viitavad ka võimalusele rakendada HRP-st sõltuvat lähiliigierimist ka *in vivo* või *ex vivo* märgistamiseks, laiendades metoodika kasutsvõimalusi biomarkerite ja sihtretseptorite tuvastamisel ning aidates vältida *in vitro* protokolliga seotud piiranguid, nagu sobiva rakuliini olemasolu vajadust.

Summary

Vascular endothelial cells (VECs) play a critical role in numerous physiological processes. VECs express a unique ZIP code in each tissue, organ and pathological condition, which can be targeted using circulating probes. To target receptors on the surface of VECs, vascular homing peptides (VHP) are used, which are identified via *in vivo* phage display. Due to the nature of the *in vivo* phage display discovery process, the receptors for these homing peptides are often unknown. However, identifying these receptors is essential for understanding the biological properties of the peptides.

Current methods for identifying homing peptide receptors rely on affinity chromatography. To perform affinity chromatography, cells must first be lysed. Cell lysis releases numerous intracellular molecules that are not normally accessible to homing peptides. In addition, membrane disruption may alter the receptor's conformation, which can influence peptide binding.

To overcome these issues, this study developed a proximity ligation method dependent on horseradish peroxidase (HRP), targeted with a homing peptide. In the presence of hydrogen peroxide, HRP oxidizes tyramide into a highly reactive form that covalently binds to tyrosine residues on nearby proteins. For the visualization and isolation of labeled proteins, AlexaFluor 647-tyramide and biotin-tyramide were used.

To selectively label receptors, the homing peptide RPARPAR (RPAR) was conjugated to HRP via a streptavidin-biotin linkage. RPARPAR was chosen as a model system because both the peptide and its receptor, neuropilin-1 (NRP-1), are well-characterized in the literature. The RPAR-HRP conjugate selectively bound to cells expressing NRP-1 and labeled their surface proteins with AlexaFluor 647-tyramide or biotin-tyramide. Biotinylated proteins were isolated using affinity chromatography, and NRP-1 was identified by Western blotting, and mass spectrometry (MS).

In addition to NRP-1, mass spectrometry identified several other proteins whose characteristics and previous studies suggest a potential association with NRP-1, indicating a more complex receptor network. The results also suggest that HRP-dependent proximity ligation could be applied for *in vivo* or *ex vivo* labeling, thereby expanding the applicability of the method for the identification of biomarkers and target receptors.

In summary, this study presents a targeted, HRP-dependent proximity labeling approach as a viable alternative to conventional receptor identification methods that rely on cell lysis and may alter native receptor conformations. The method enabled the successful labeling and

identification of neuropilin-1 as the receptor for the RPARPAR peptide, as well as the discovery of additional candidate proteins potentially involved in the same receptor network. These findings not only validate the specificity and functional applicability of the developed approach but also demonstrate its potential to reveal new molecular targets in a physiologically relevant context. As such, this methodology offers a promising tool for advancing receptor discovery, particularly in cases where maintaining membrane integrity and native protein interactions is critical.

Tänuõnad

Eelkõige soovin tänada oma juhendajaid prof. Tambet Teesalut, Kristina Põšnograjevat ja prof. Juhan Sedmanit, kelle toetus ja suunised olid magistritöö valmimisel hindamatu väärtusega. Erilised tänuõnad kuuluvad Kristina Põšnograjevale, kes tutvustas metoodikat ning aitas katsete planeerimise ja läbiviimisega. Samuti tänan Karlis Pleikot, Maarja Haugast ja Alex Rosa Campost massispektromeetria analüüsi teostamise eest. Suur tänu kuulub ka laborispetsialist Kaarel Kurmile, kelle hool oli tagada vajalike reaktiivide ja vahendite olemasolu laboris. Tänan ka täppis- ja nanomeditsiini töörühma liikmeid toetuse ja valmisoleku eest küsimustele vastata. Lõpetuseks avaldan sügavat tänu oma perekonnale ja sõpradele, kelle julgustus ja toetus saatsid mind kogu selle teekonna vältel.

Kirjanduse loetelu

AAT Bioquest. (2020). *What is Tyramide Signal Amplification (TSA)?* | AAT Bioquest.

<https://www.aatbio.com/resources/faq-frequently-asked-questions/What-is-Tyramide-Signal-Amplification-TSA>

Acevedo, L. M., Barillas, S., Weis, S. M., Göthert, J. R., & Cheresh, D. A. (2008). Semaphorin 3A suppresses VEGF-mediated angiogenesis yet acts as a vascular permeability factor. *Blood*, *111*(5), 2674–2680. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-08-110205>

Acikara, Ö. B., Çitoğlu, G. S., Özbilgin, S., Ergene, B., Acikara, Ö. B., Çitoğlu, G. S., Özbilgin, S., & Ergene, B. (2013). Affinity Chromatography and Importance in Drug Discovery. In *Column Chromatography*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/55781>

Adachi, K., Sakurai, Y., Ichinoe, M., Tadehara, M., Tamaki, A., Kesen, Y., Kato, T., Mii, S., Enomoto, A., Takahashi, M., Koizumi, W., & Murakumo, Y. (2022). CD109 expression in tumor cells and stroma correlates with progression and prognosis in pancreatic cancer. *Virchows Archiv*, *480*(4), 819–829. <https://doi.org/10.1007/s00428-021-03230-2>

Arias, A. G., Tovar-Martinez, L., Ascitutto, E., Mann, A., Posnograjeva, K., Gracia, L. S., Royo, M., Haugas, M., Teesalu, T., Smulski, C., Ruoslahti, E., & Scodeller, P. (2024). A CYCLIC PEPTIDE TARGETS GLIOBLASTOMA BY BINDING TO ABERRANTLY EXPOSED SNAP25. *bioRxiv*, 2024.09.18.613627. <https://doi.org/10.1101/2024.09.18.613627>

Avens, H. J., Berron, B. J., May, A. M., Voigt, K. R., Seedorf, G. J., Balasubramaniam, V., & Bowman, C. N. (2011). Sensitive immunofluorescent staining of cells via generation of fluorescent nanoscale polymer films in response to biorecognition. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, *59*(1), 76–87. <https://doi.org/10.1369/jhc.2010.955948>

Baharuddin, W. N. A., Yusoff, A. A. M., Abdullah, J. M., Osman, Z. F., & Ahmad, F. (2018). Roles of EphA2 Receptor in Angiogenesis Signaling Pathway of Glioblastoma

- Multiforme. *The Malaysian Journal of Medical Sciences : MJMS*, 25(6), 22–27.
<https://doi.org/10.21315/mjms2018.25.6.3>
- Benwell, C. J., Johnson, R. T., Taylor, J. A. G. E., Lambert, J., & Robinson, S. D. (2024). A proteomics approach to isolating neuropilin-dependent $\alpha 5$ integrin trafficking pathways: Neuropilin 1 and 2 co-traffic $\alpha 5$ integrin through endosomal p120RasGAP to promote polarised fibronectin fibrillogenesis in endothelial cells. *Communications Biology*, 7(1), 1–19. <https://doi.org/10.1038/s42003-024-06320-4>
- Bio-Rad. (2025). *HRP Substrate | Bio-Rad*. <https://www.bio-rad.com/en-ee/feature/hrp-substrate.html>
- Bobrow, M. N., Harris, T. D., Shaughnessy, K. J., & Litt, G. J. (1989). Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. Application to immunoassays. *Journal of Immunological Methods*, 125(1–2), 279–285. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(89\)90104-x](https://doi.org/10.1016/0022-1759(89)90104-x)
- Bosch, J. A., Chen, C.-L., & Perrimon, N. (2021). Proximity-dependent labeling methods for proteomic profiling in living cells: An update. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Developmental Biology*, 10(1), e392. <https://doi.org/10.1002/wdev.392>
- Bye, C. R., Rytova, V., Alsanie, W. F., Parish, C. L., & Thompson, L. H. (2019). Axonal Growth of Midbrain Dopamine Neurons is Modulated by the Cell Adhesion Molecule ALCAM Through Trans-Heterophilic Interactions with L1cam, Ch11, and Semaphorins. *The Journal of Neuroscience*, 39(34), 6656–6667. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0278-19.2019>
- Cantuti-Castelvetri, L., Ojha, R., Pedro, L. D., Djannatian, M., Franz, J., Kuivanen, S., van der Meer, F., Kallio, K., Kaya, T., Anastasina, M., Smura, T., Levanov, L., Szivovics, L., Tobi, A., Kallio-Kokko, H., Österlund, P., Joensuu, M., Meunier, F. A., Butcher, S. J., ... Simons, M. (2020). Neuropilin-1 facilitates SARS-CoV-2 cell entry and infectivity. *Science (New York, N.Y.)*, 370(6518), 856–860. <https://doi.org/10.1126/science.abd2985>

- Cho, K. F., Branon, T. C., Udeshi, N. D., Myers, S. A., Carr, S. A., & Ting, A. Y. (2020). Proximity labeling in mammalian cells with TurboID and split-TurboID. *Nature Protocols*, *15*(12), 3971–3999. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0399-0>
- Chodosh, L. A. (2001). Purification of DNA-binding proteins using biotin/streptavidin affinity systems. *Current Protocols in Molecular Biology*, Chapter 12, Unit 12.6. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1206s36>
- Cines, D. B., Pollak, E. S., Buck, C. A., Loscalzo, J., Zimmerman, G. A., McEver, R. P., Pober, J. S., Wick, T. M., Konkle, B. A., Schwartz, B. S., Barnathan, E. S., McCrae, K. R., Hug, B. A., Schmidt, A. M., & Stern, D. M. (1998). Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*, *91*(10), 3527–3561.
- Conyers, S. M., & Kidwell, D. A. (1991). Chromogenic substrates for horseradish peroxidase. *Analytical Biochemistry*, *192*(1), 207–211. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(91\)90208-b](https://doi.org/10.1016/0003-2697(91)90208-b)
- Culica, M. E., Chibac-Scutaru, A.-L., Mohan, T., & Coseri, S. (2021). Cellulose-based biogenic supports, remarkably friendly biomaterials for proteins and biomolecules. *Biosensors and Bioelectronics*, *182*, 113170. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113170>
- Cytiva. (2025). *Chromatography troubleshooting*. Cytiva. <https://www.cytivalifesciences.com/en/us/solutions/protein-research/knowledge-center/protein-purification-methods/chromatography-troubleshooting?srsltid=AfmBOopsKqd93So5ovwCa0H3-Q050gwwG7y3w8GuEg30DPnYmqQcITYo'>
- Czarnek, M., & Bereta, J. (2020). Proteolytic Processing of Neuregulin 2. *Molecular Neurobiology*, *57*(4), 1799–1813. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-01846-9>
- d'Avanzo, N., Sidorenko, V., Simón-Gracia, L., Rocchi, A., Ottonelli, I., Ruozi, B., Longo, F., Celia, C., & Teesalu, T. (2024). C-end rule peptide-guided niosomes for prostate cancer

- cell targeting. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, *91*, 105162.
<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.105162>
- Daly, J. L., Simonetti, B., Klein, K., Chen, K.-E., Williamson, M. K., Antón-Plágaro, C., Shoemark, D. K., Simón-Gracia, L., Bauer, M., Hollandi, R., Greber, U. F., Horvath, P., Sessions, R. B., Helenius, A., Hiscox, J. A., Teesalu, T., Matthews, D. A., Davidson, A. D., Collins, B. M., ... Yamauchi, Y. (2020). Neuropilin-1 is a host factor for SARS-CoV-2 infection. *Science (New York, N.Y.)*, *370*(6518), 861–865.
<https://doi.org/10.1126/science.abd3072>
- D’Onofrio, N., Caraglia, M., Grimaldi, A., Marfella, R., Servillo, L., Paolisso, G., & Balestrieri, M. L. (2014). Vascular-homing peptides for targeted drug delivery and molecular imaging: Meeting the clinical challenges. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, *1846*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2014.03.004>
- Dumrongprechachan, V., Salisbury, R. B., Soto, G., Kumar, M., MacDonald, M. L., & Kozorovitskiy, Y. (2021). Cell-type and subcellular compartment-specific APEX2 proximity labeling reveals activity-dependent nuclear proteome dynamics in the striatum. *Nature Communications*, *12*(1), 4855. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25144-y>
- Ferrara, L., De Erkenez, A., Fassbender, E., Shen, S., Woolfenden, A., Qiu, Y., Poor, S., Anderson, K., & Jaffee, B. (2013). EphA2 Stimulation of Angiogenesis is Dependent on VEGFR2. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *54*(15), 5613.
- Folkman, J. (1971). Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. *New England Journal of Medicine*, *285*(21), 1182–1186. <https://doi.org/10.1056/NEJM197111182852108>
- Fujiyama, K., Takemura, H., Shibayama, S., Kobayashi, K., Choi, J. K., Shinmyo, A., Takano, M., Yamada, Y., & Okada, H. (1988). Structure of the horseradish peroxidase isozyme C genes. *European Journal of Biochemistry*, *173*(3), 681–687.
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1988.tb14052.x>

- Gajhede, M., Schuller, D. J., Henriksen, A., Smith, A. T., & Poulos, T. L. (1997). Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 Å resolution. *Nature Structural Biology*, 4(12), 1032–1038. <https://doi.org/10.1038/nsb1297-1032>
- Glinka, Y., Stoilova, S., Mohammed, N., & Prud'homme, G. J. (2011). Neuropilin-1 exerts co-receptor function for TGF-β-1 on the membrane of cancer cells and enhances responses to both latent and active TGF-β. *Carcinogenesis*, 32(4), 613–621. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgq281>
- Goel, H. L., & Mercurio, A. M. (2012). Enhancing integrin function by VEGF/neuropilin signaling. *Cell Adhesion & Migration*, 6(6), 554–560. <https://doi.org/10.4161/cam.22419>
- Gorris, H. H., & Walt, D. R. (2009). Mechanistic Aspects of Horseradish Peroxidase Elucidated through Single-Molecule Studies. *Journal of the American Chemical Society*, 131(17), 6277–6282. <https://doi.org/10.1021/ja9008858>
- Gui, J., Yang, L., Liu, J., Li, Y., Zou, M., Sun, C., Huang, L., Zhu, X., & Huang, K. (2024). Identifying the prognosis implication, immunotherapy response prediction value, and potential targeted compound inhibitors of integrin subunit α3 (ITGA3) in human cancers. *Heliyon*, 10(2), e24236. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e24236>
- Hanahan, D., & Folkman, J. (1996). Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis. *Cell*, 86(3), 353–364. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80108-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80108-7)
- Hendrickson, W. A., Pähler, A., Smith, J. L., Satow, Y., Merritt, E. A., & Phizackerley, R. P. (1989). Crystal structure of core streptavidin determined from multiwavelength anomalous diffraction of synchrotron radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(7), 2190–2194. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.7.2190>

- Hopkins, C., Gibson, A., Stinchcombe, J., & Futter, C. (2000). Chimeric molecules employing horseradish peroxidase as reporter enzyme for protein localization in the electron microscope. *Methods in Enzymology*, *327*, 35–45. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(00\)27265-0](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(00)27265-0)
- Jacobs, C. B., Peairs, M. J., & Venton, B. J. (2010). Review: Carbon nanotube based electrochemical sensors for biomolecules. *Analytica Chimica Acta*, *662*(2), 105–127. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.01.009>
- Kim, Y.-J., Jung, K., Baek, D.-S., Hong, S.-S., & Kim, Y.-S. (2017). Co-targeting of EGF receptor and neuropilin-1 overcomes cetuximab resistance in pancreatic ductal adenocarcinoma with integrin β 1-driven Src-Akt bypass signaling. *Oncogene*, *36*(18), 2543–2552. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.407>
- Klaesson, A., Grannas, K., Ebai, T., Heldin, J., Koos, B., Leino, M., Raykova, D., Oelrich, J., Arngården, L., Söderberg, O., & Landegren, U. (2018). Improved efficiency of in situ protein analysis by proximity ligation using UnFold probes. *Scientific Reports*, *8*(1), 5400. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23582-1>
- Kostelnik, K. B., Barker, A., Schultz, C., Mitchell, T. P., Rajeeve, V., White, I. J., Aurrand-Lions, M., Nourshargh, S., Cutillas, P., & Nightingale, T. D. (2019). Dynamic trafficking and turnover of JAM-C is essential for endothelial cell migration. *PLOS Biology*, *17*(12), e3000554. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000554>
- Krainer, F. W., & Glieder, A. (2015). An updated view on horseradish peroxidases: Recombinant production and biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *99*(4), 1611–1625. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6346-7>
- Lee, K., Shueng, P., Chou, C., Lin, B., Lin, M., Kuo, D., Tsai, I., Wu, S., & Lin, C. (2020). Elevation of CD109 promotes metastasis and drug resistance in lung cancer via activation of EGFR-AKT-mTOR signaling. *Cancer Science*, *111*(5), 1652–1662. <https://doi.org/10.1111/cas.14373>

- Leung, K. K., Schaefer, K., Lin, Z., Yao, Z., & Wells, J. A. (2025). Engineered Proteins and Chemical Tools to Probe the Cell Surface Proteome. *Chemical Reviews*. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.4c00554>
- Li, J., Han, S., Li, H., Udeshi, N. D., Svinkina, T., Mani, D. R., Xu, C., Guajardo, R., Xie, Q., Li, T., Luginbuhl, D. J., Wu, B., McLaughlin, C. N., Xie, A., Kaewsapsak, P., Quake, S. R., Carr, S. A., Ting, A. Y., & Luo, L. (2020). Cell-Surface Proteomic Profiling in the Fly Brain Uncovers Wiring Regulators. *Cell*, *180*(2), 373-386.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.12.029>
- Liao, R., Mondal, M., Nazaroff, C. D., Mastroeni, D., Coleman, P. D., Labaer, J., & Guo, J. (2020). Highly Sensitive and Multiplexed Protein Imaging With Cleavable Fluorescent Tyramide Reveals Human Neuronal Heterogeneity. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *8*, 614624. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.614624>
- Lisata Therapeutics. (2025). *Lisata Therapeutics and WARPINE Announce Encouraging Preliminary Results from the Phase 1b/2a iLSTA Trial Evaluating Certepetide in Locally Advanced Non-Resectable Pancreatic Ductal Adenocarcinoma* | Lisata Therapeutics, Inc. <https://ir.lisata.com/news-releases/news-release-details/lisata-therapeutics-and-warpine-announce-encouraging/>
- Loh, K. H., Stawski, P. S., Draycott, A. S., Udeshi, N. D., Lehrman, E. K., Wilton, D. K., Svinkina, T., Deerinck, T. J., Ellisman, M. H., Stevens, B., Carr, S. A., & Ting, A. Y. (2016). Proteomic analysis of unbounded cellular compartments: Synaptic clefts. *Cell*, *166*(5), 1295-1307.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.041>
- Marangoni, J. M., Wu, S.-C., Fogen, D., Wong, S.-L., & Ng, K. K. S. (2020). Engineering a disulfide-gated switch in streptavidin enables reversible binding without sacrificing binding affinity. *Scientific Reports*, *10*, 12483. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69357-5>

- Marzocchi, E., Grilli, S., Della Ciana, L., Prodi, L., Mirasoli, M., & Roda, A. (2008). Chemiluminescent detection systems of horseradish peroxidase employing nucleophilic acylation catalysts. *Analytical Biochemistry*, 377(2), 189–194. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.03.020>
- Mehta, V., Fields, L., Evans, I. M., Yamaji, M., Pellet-Many, C., Jones, T., Mahmoud, M., & Zachary, I. (2018). VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) Induces NRP1 (Neuropilin-1) Cleavage via ADAMs (a Disintegrin and Metalloproteinase) 9 and 10 to Generate Novel Carboxy-Terminal NRP1 Fragments That Regulate Angiogenic Signaling. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 38(8), 1845–1858. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.311118>
- Merck. (2025). *Affinity Chromatography Troubleshooting*. <https://www.sigmaaldrich.com/EE/en/technical-documents/technical-article/protein-biology/protein-purification/affinity-chromatography-troubleshooting?srsId=AfmBOoruWBLLccpv15417ANJhVQaGhK3Qx-o6F2V3W3to-8Z7PLG3eVy%27>
- Nguyen, T. M. T., Kim, J., Doan, T. T., Lee, M.-W., & Lee, M. (2020). APEX Proximity Labeling as a Versatile Tool for Biological Research. *Biochemistry*, 59(3), 260–269. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00791>
- Pang, H.-B., Braun, G. B., Friman, T., Aza-Blanc, P., Ruidiaz, M. E., Sugahara, K. N., Teesalu, T., & Ruoslahti, E. (2014). An endocytosis pathway initiated through neuropilin-1 and regulated by nutrient availability. *Nature Communications*, 5(1), 4904. <https://doi.org/10.1038/ncomms5904>
- Pasqualini, R., & Ruoslahti, E. (1996). Organ targeting In vivo using phage display peptide libraries. *Nature*, 380(6572), 364–366. <https://doi.org/10.1038/380364a0>

- Passardi, F., Cosio, C., Penel, C., & Dunand, C. (2005). Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Reports*, 24(5), 255–265.
<https://doi.org/10.1007/s00299-005-0972-6>
- Planche, L. A. (1810). Note sur la sophistication de la résine de jalap et sur les moyens de la reconnaître. *Bull. Pharmacie*, 2, 578–580.
- Pleiko, K., Haugas, M., Parfejevs, V., Pantelejevs, T., Parisini, E., Teesalu, T., & Riekstina, U. (2023). Targeting triple-negative breast cancer cells with a β 1-integrin binding aptamer. *Molecular Therapy. Nucleic Acids*, 33, 871–884.
<https://doi.org/10.1016/j.omtn.2023.08.015>
- Pleiko, K., Põšnograjeva, K., Haugas, M., Paiste, P., Tobi, A., Kurm, K., Riekstina, U., & Teesalu, T. (2021). In vivo phage display: Identification of organ-specific peptides using deep sequencing and differential profiling across tissues. *Nucleic Acids Research*, 49(7), e38. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1279>
- Rampado, R., Giordano, F., Moracci, L., Crotti, S., Caliceti, P., Agostini, M., & Taraballi, F. (2022). Optimization of a detergent-based protocol for membrane proteins purification from mammalian cells. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 219, 114926. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2022.114926>
- Rees, J. S., Li, X.-W., Perrett, S., Lilley, K. S., & Jackson, A. P. (2015). Selective Proteomic Proximity Labeling Assay Using Tyramide (SPPLAT): A Quantitative Method for the Proteomic Analysis of Localized Membrane-Bound Protein Clusters. *Current Protocols in Protein Science*, 80, 19.27.1-19.27.18.
<https://doi.org/10.1002/0471140864.ps1927s80>
- Rodriguez, E. L., Poddar, S., Iftekhhar, S., Suh, K., Woolfork, A. G., Ovbude, S., Pekarek, A., Walters, M., Lott, S., & Hage, D. S. (2020). Affinity Chromatography: A Review of Trends and Developments over the Past 50 Years. *Journal of Chromatography. B*,

- Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1157, 122332.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122332>
- Ruoslahti, E. (2017). Tumor penetrating peptides for improved drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 110–111, 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.03.008>
- Sato, S., & Nakamura, H. (2019). Protein Chemical Labeling Using Biomimetic Radical Chemistry. *Molecules*, 24(21), 3980. <https://doi.org/10.3390/molecules24213980>
- Savini, F., Mutter, N., Baumgartner, K., & Barišić, I. (2023). A Simple Biosensor Based on Streptavidin-HRP for the Detection of Bacteria Exploiting HRPs Molecular Surface Properties. *Applied Biosciences*, 2(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/applbiosci2030032>
- Sears, R. M., May, D. G., & Roux, K. J. (2019). BioID as a Tool for Protein-Proximity Labeling in Living Cells. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2012, 299–313. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9546-2_15
- Singh, D. R., Kanvinde, P., King, C., Pasquale, E. B., & Hristova, K. (2018). The EphA2 receptor is activated through induction of distinct, ligand-dependent oligomeric structures. *Communications Biology*, 1(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s42003-018-0017-7>
- Staquicini, D. I., Cardó-Vila, M., Rotolo, J. A., Staquicini, F. I., Tang, F. H. F., Smith, T. L., Ganju, A., Schiavone, C., Dogra, P., Wang, Z., Cristini, V., Giordano, R. J., Ozawa, M. G., Driessen, W. H. P., Proneth, B., Souza, G. R., Brinker, L. M., Nouredine, A., Snider, A. J., ... Arap, W. (2023). Ceramide as an endothelial cell surface receptor and a lung-specific lipid vascular target for circulating ligands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 120(34), e2220269120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2220269120>
- Starzec, A., Vassy, R., Martin, A., Lecouvey, M., Di Benedetto, M., Crépin, M., & Perret, G. Y. (2006). Antiangiogenic and antitumor activities of peptide inhibiting the vascular

- endothelial growth factor binding to neuropilin-1. *Life Sciences*, 79(25), 2370–2381.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.08.005>
- Staton, C. A., Kumar, I., Reed, M. W. R., & Brown, N. J. (2007). Neuropilins in physiological and pathological angiogenesis. *The Journal of Pathology*, 212(3), 237–248.
<https://doi.org/10.1002/path.2182>
- Takahashi, T., Fournier, A., Nakamura, F., Wang, L. H., Murakami, Y., Kalb, R. G., Fujisawa, H., & Strittmatter, S. M. (1999). Plexin-neuropilin-1 complexes form functional semaphorin-3A receptors. *Cell*, 99(1), 59–69. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80062-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80062-8)
- Takashima, S., Kitakaze, M., Asakura, M., Asanuma, H., Sanada, S., Tashiro, F., Niwa, H., Miyazaki, J., Hirota, S., Kitamura, Y., Kitsukawa, T., Fujisawa, H., Klagsbrun, M., & Hori, M. (2002). Targeting of both mouse neuropilin-1 and neuropilin-2 genes severely impairs developmental yolk sac and embryonic angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(6), 3657–3662.
<https://doi.org/10.1073/pnas.022017899>
- Teesalu, T., Sugahara, K. N., Kotamraju, V. R., & Ruoslahti, E. (2009). C-end rule peptides mediate neuropilin-1-dependent cell, vascular, and tissue penetration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(38), 16157–16162. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908201106>
- Teesalu, T., Sugahara, K. N., & Ruoslahti, E. (2012). Chapter two—Mapping of Vascular ZIP Codes by Phage Display. In K. D. Wittrup & G. L. Verdine (Eds.), *Methods in Enzymology* (Vol. 503, pp. 35–56). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396962-0.00002-1>
- Thermo Fisher Scientific. (2025). *ELISA Enzyme Substrates—EE*.
<https://www.thermofisher.com/tr/en/home/life-science/antibodies/immunoassays/elisa-kits/elisa-enzyme-substrates.html>

- Tobi, A., Willmore, A.-M. A., Kilk, K., Sidorenko, V., Braun, G. B., Soomets, U., Sugahara, K. N., Ruoslahti, E., & Teesalu, T. (2021). Silver Nanocarriers Targeted with a CendR Peptide Potentiate the Cytotoxic Activity of an Anticancer Drug. *Advanced Therapeutics*, 4(1), 2000097. <https://doi.org/10.1002/adtp.202000097>
- UniProt, NRP1_HUMAN, 014786. (n.d.). UniProt. Retrieved 4 May 2025, from <https://www.uniprot.org/uniprotkb/O14786/entry>
- UniProt, SAV_STRAV, P22629. (n.d.). *UniProt*. UniProt. Retrieved 4 May 2025, from https://www.uniprot.org/uniprotkb/P22629/entry?utm_source=chatgpt.com
- Urh, M., Simpson, D., & Zhao, K. (2009). Chapter 26 Affinity Chromatography: General Methods. In R. R. Burgess & M. P. Deutscher (Eds.), *Methods in Enzymology* (Vol. 463, pp. 417–438). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63026-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63026-3)
- Valdembri, D., Caswell, P. T., Anderson, K. I., Schwarz, J. P., König, I., Astanina, E., Caccavari, F., Norman, J. C., Humphries, M. J., Bussolino, F., & Serini, G. (2009). Neuropilin-1/GIPC1 Signaling Regulates $\alpha 5\beta 1$ Integrin Traffic and Function in Endothelial Cells. *PLoS Biology*, 7(1), e1000025. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000025>
- Veitch, N. C. (2004). Horseradish peroxidase: A modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*, 65(3), 249–259. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2003.10.022>
- Vilen, Z., Reeves, A. E., O’Leary, T. R., Joeh, E., Kamasawa, N., & Huang, M. L. (2023). Cell Surface Engineering Enables Surfaceome Profiling. *ACS Chemical Biology*, 18(4), 701–710. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.1c00865>
- Welinder, K. G. (1979). Amino Acid Sequence Studies of Horseradish Peroxidase. *European Journal of Biochemistry*, 96(3), 483–502. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1979.tb13061.x>
- Willmore, A.-M. A., Simón-Gracia, L., Toome, K., Paiste, P., Kotamraju, V. R., Mölder, T., Sugahara, K. N., Ruoslahti, E., Braun, G. B., & Teesalu, T. (2016). Targeted silver

nanoparticles for ratiometric cell phenotyping. *Nanoscale*, 8(17), 9096–9101.

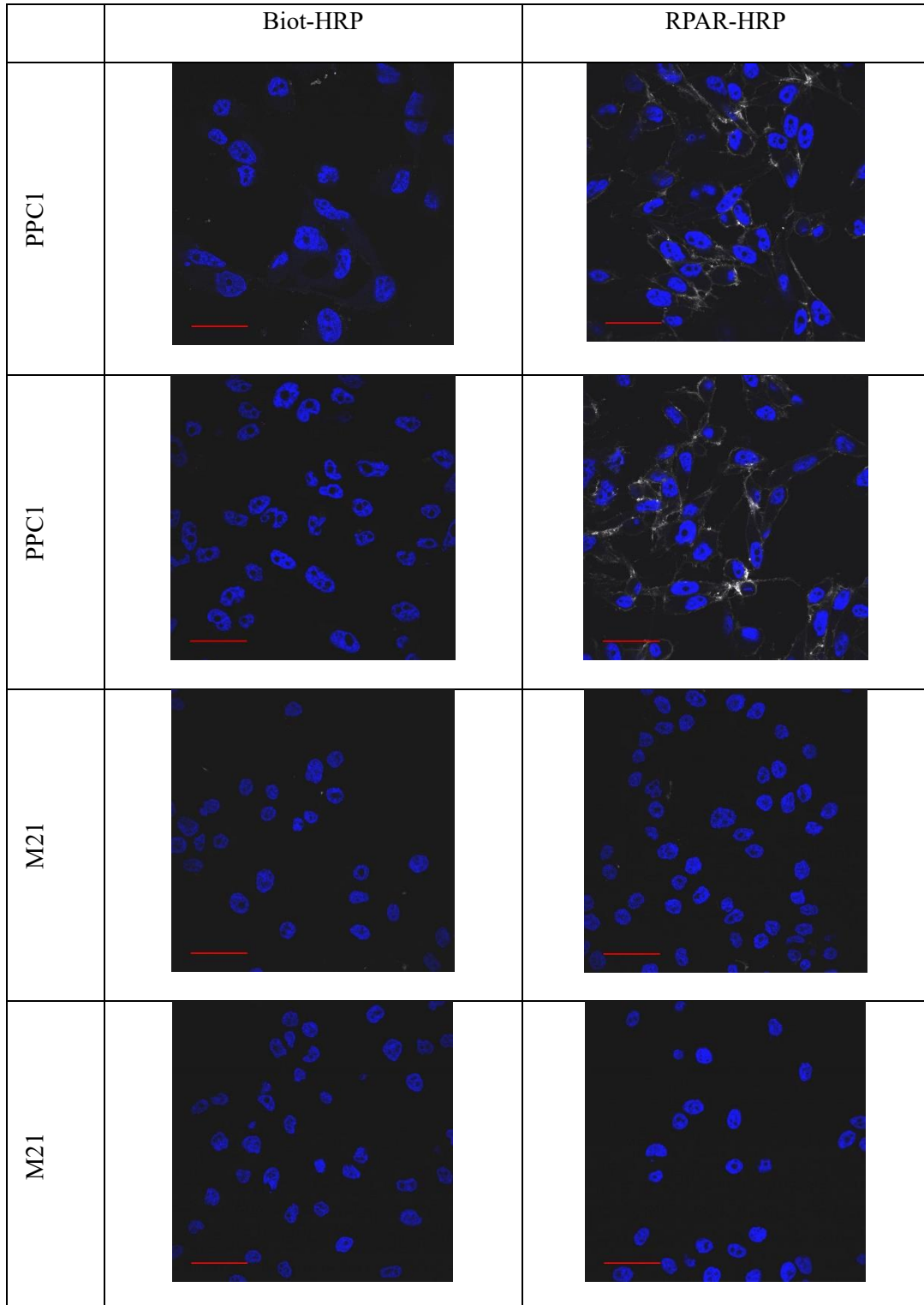
<https://doi.org/10.1039/c5nr07928d>

Wu, G., Nagala, M., & Crocker, P. R. (2017). Identification of lectin counter-receptors on cell membranes by proximity labeling. *Glycobiology*, 27(9), 800–805.

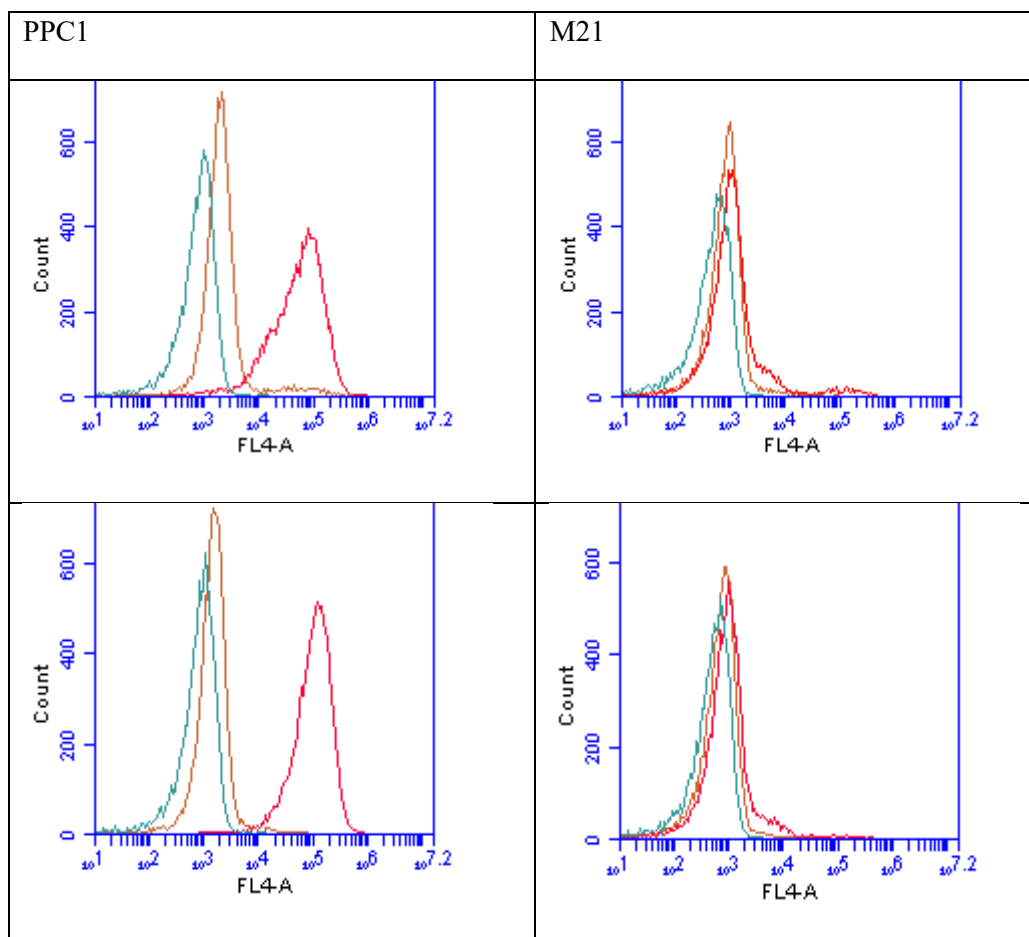
<https://doi.org/10.1093/glycob/cwx063>

Lisad

Lisa 1. Joonis 5 lisa. PPC1 ja M21 rakkude märgistamine AlexaFluor 647 abil HRP-st sõltuva lähiligeerimise kaudu konfokaalmikroskoopia jaoks.



Lisa 2. Joonis 6A lisa PPC1 ja M21 rakkude märgistamine AlexaFluor 647 abil HRP-st sõltuva lähiligeerimise kaudu konfokaalmikroskoopia jaoks.



Lisa 3. Püütoni kood tulpdigrammi genereerimiseks.

Järgnev kood genereerib tulpdigrammi koos statistilise analüüsiga vastavalt kasutaja poolt sisestatud andmetele. Kood genereeritud koostöös OpenAI GPT-4-turboga. Koodi kasutati selle töö joonis 6B ja 7B genereerimiseks. Genereeritud jooniseid korrigeeriti programmis Inkscape.

Sisestanud andmed joonise 6B genereerimiseks (Proovi nimi Fluorestsentsi intensiivsus):

PPC1 1 2864.63

PPC1 2 828.34

PPC1 3 882.36

PPC1_RPAR 1 77667.72

PPC1_RPAR 2 126397.86

PPC1_RPAR 3 122799.47

PPC1_Biot 1 5788.52

PPC1_Biot 2 1766.29

PPC1_Biot 3 28382.69

M21 1 440.22

M21 2 463.92

M21 3 513.87

M21_RPAR 1 891.68

M21_RPAR 2 5220.02

M21_RPAR 3 2053.58

M21_Biot 1 966.39

M21_Biot 2 860.88

M21_Biot 3 856.92

Sisestatud andmed joonise 7B genereerimiseks (Proovi nimi Fluorestsentsi intensiivsus):

PPC1 1 4117.6

PPC1 2 4214.87

PPC1 3 4174.58

PPC1_RPAR 1 90067.38

PPC1_RPAR 2 142570.77

PPC1_RPAR 3 134694.94

PPC1_Biot 1 25011.91

PPC1_Biot 2 21767.49

PPC1_Biot 3 21006.23

M21 1 2645.45

M21 2 2087.54

M21 3 2102.62

M21_RPAR 1 14048.79

M21_RPAR 2 8621.88

M21_RPAR 3 6461.78

M21_Biot 1 6620.22

M21_Biot 2 6114.99

M21_Biot 3 17037.03

Kood algab siit:

```
import pandas as pd
```

```
import numpy as np
```

```
import matplotlib.pyplot as plt
```

```
from statsmodels.stats.multicomp import pairwise_tukeyhsd
```

```
import tkinter as tk
```

```
from tkinter import scrolledtext, messagebox, ttk, filedialog
```

```
group_config = {}
```

```
group_colors = {}
```

```
group_positions = {}
```

```
df = None
```

```
graph_title = ""
```

```
panel_label = ""
```

```
y_axis_label = ""
```

```

prefixes = []

color_choices = ['blue', 'gray', 'red', 'green', 'orange', 'purple', 'cyan']

def get_group_config_ui():
    config_window = tk.Toplevel(window)
    config_window.title("Group Setup")

    tk.Label(config_window, text="Assign group name, color, and position:").pack(pady=(10,
5))
    position_options = [str(i + 1) for i in range(len(prefixes))]

    ref_frame = tk.Frame(config_window)
    ref_frame.pack(pady=(5, 10))
    tk.Label(ref_frame, text="Reference group for significance testing:").pack(side=tk.LEFT,
padx=(5, 5))
    ref_dropdown = ttk.Combobox(ref_frame, textvariable=ref_group_var, values=prefixes,
width=20, state='readonly')
    ref_dropdown.set(prefixes[0])
    ref_dropdown.pack(side=tk.LEFT)

    for prefix in prefixes:
        group_frame = tk.LabelFrame(config_window, text=prefix, padx=10, pady=5)
        group_frame.pack(fill="x", padx=10, pady=5)

        name_var = tk.StringVar(value=prefix)
        color_var = tk.StringVar(value='blue')
        pos_var = tk.StringVar(value=str(prefixes.index(prefix) + 1))

        group_config[prefix] = name_var
        group_colors[prefix] = color_var
        group_positions[prefix] = pos_var

    tk.Label(group_frame, text="Group Name:").grid(row=0, column=0, sticky="w")
    tk.Entry(group_frame, textvariable=name_var, width=30).grid(row=0, column=1,

```

```
padx=5)
```

```
tk.Label(group_frame, text="Color:").grid(row=1, column=0, sticky="w")
```

```
tk.Combobox(group_frame, textvariable=color_var, values=color_choices, width=15,  
state='readonly').grid(row=1, column=1, padx=5)
```

```
tk.Label(group_frame, text="Position:").grid(row=1, column=2, sticky="e")
```

```
tk.Combobox(group_frame, textvariable=pos_var, values=position_options, width=5,  
state='readonly').grid(row=1, column=3, padx=5)
```

```
def confirm():
```

```
    config_window.destroy()
```

```
    plot_graph()
```

```
tk.Button(config_window, text="Generate Graph", command=confirm).pack(pady=10)
```

```
def process_input():
```

```
    title = title_entry.get().strip()
```

```
    label = panel_entry.get().strip()
```

```
    ylabel = ylabel_entry.get().strip()
```

```
    if not title:
```

```
        messagebox.showerror("Missing Title", "Please enter a graph title.")
```

```
        return
```

```
raw_text = text_area.get("1.0", tk.END).strip()
```

```
lines = raw_text.split("\n")
```

```
raw_data = []
```

```
seen = []
```

```
for line in lines:
```

```
    try:
```

```
        parts = line.strip().split()
```

```
        if len(parts) != 3:
```

```
            raise ValueError("Expected format: Prefix SampleNumber Value")
```

```
        prefix = parts[0]
```

```

    value = float(parts[2].replace(",", "."))
    raw_data.append((prefix, value))
    if prefix not in seen:
        seen.append(prefix)
except Exception as e:
    messagebox.showerror("Input Error", "Invalid line:\n'{}'\n{}".format(line, e))
    return

if not raw_data:
    messagebox.showwarning("No Data", "Please enter some data.")
    return

global df, graph_title, panel_label, y_axis_label, prefixes
df = pd.DataFrame(raw_data, columns=['Prefix', 'Value'])
graph_title = title
panel_label = label
y_axis_label = ylabel
prefixes = seen
get_group_config_ui()

def plot_graph():
    df['Group'] = df['Prefix'].apply(lambda p: group_config[p].get())
    df['Position'] = df['Prefix'].apply(lambda p: int(group_positions[p].get()))
    df['Color'] = df['Prefix'].apply(lambda p: group_colors[p].get())

    means = df.groupby('Group')['Value'].mean()
    stds = df.groupby('Group')['Value'].std()
    values_by_group = df.groupby('Group')['Value'].apply(list)
    colors_by_group = df.groupby('Group')['Color'].first()
    positions_by_group = df.groupby('Group')['Position'].first().astype(int)

    sorted_groups = positions_by_group.sort_values().index.tolist()

    fig, ax = plt.subplots(figsize=(12, 6))

```

```

for i, group in enumerate(sorted_groups):
    ax.bar(i, means[group], yerr=stds[group], color=colors_by_group[group], capsize=5,
zorder=1)
    x_vals = np.random.normal(i, 0.12, size=len(values_by_group[group])) # Wider spread
    ax.scatter(x_vals, values_by_group[group], color='black', s=60, marker='x', zorder=3)

ax.set_xticks(range(len(sorted_groups)))
ax.set_xticklabels(sorted_groups, fontsize=13, rotation=45)
if y_axis_label:
    ax.set_ylabel(y_axis_label, fontsize=16)
full_title = "{} {}".format(panel_label, graph_title) if panel_label else graph_title
ax.set_title(full_title, fontsize=20)

tukey = pairwise_tukeyhsd(df['Value'], df['Group'])
results_df = pd.DataFrame(tukey.summary().data[1:], columns=tukey.summary().data[0])
results_df["p-adj"] = results_df["p-adj"].astype(float)

selected_ref = group_config[ref_group_var.get()].get()
y_max = df['Value'].max() + df['Value'].std()
y_step = (df['Value'].max() - df['Value'].min()) * 0.1
line_y = y_max + y_step
epsilon = 1e-12
plotted_pairs = 0
significance = []

for _, row in results_df.iterrows():
    g1, g2, pval = row['group1'], row['group2'], float(row['p-adj'])
    if selected_ref not in (g1, g2):
        continue

    label = 'ns'
    if pval < 0.001 + epsilon:
        label = '***'
    elif pval < 0.01 + epsilon:
        label = '**'

```

```

elif pval < 0.05 + epsilon:
    label = '*'
else:
    continue

print("Comparison: {} vs {} | p = {:.20f} | label = {}".format(g1, g2, pval, label))
i1, i2 = sorted_groups.index(g1), sorted_groups.index(g2)
x1, x2 = min(i1, i2), max(i1, i2)
height = line_y + plotted_pairs * y_step * 0.75
ax.plot([x1, x1, x2, x2], [height - 0.2, height, height, height - 0.2], color='black', lw=1.5)
ax.text((x1 + x2) / 2, height + 0.05, label, ha='center', va='bottom', fontsize=16,
fontweight='bold')
plotted_pairs += 1
significance.append({"Group1": g1, "Group2": g2, "p-value": pval, "Significance":
label})

fig.tight_layout()

def save_outputs():
    filename = filedialog.asksaveasfilename(defaultextension=".png", filetypes=[("PNG",
"*.png")])
    if not filename:
        return
    fig.savefig(filename, dpi=300)
    fig.savefig(filename.replace(".png", ".svg"))
    pd.DataFrame(significance).to_csv(filename.replace(".png", "_tukey.csv"), index=False)
    messagebox.showinfo("Saved", "Figure and results exported successfully.")

export_button = tk.Button(window, text="Export Graph (PNG + SVG + CSV)",
command=save_outputs)
export_button.pack(pady=10)

plt.show()

# GUI setup

```

```
window = tk.Tk()
window.title("Bar Graph Generator with Export")

ref_group_var = tk.StringVar()

tk.Label(window, text="Graph Title:").pack(pady=(10, 2))
title_entry = tk.Entry(window, width=50)
title_entry.pack(padx=10, pady=(0, 5))

tk.Label(window, text="Panel Label (optional, e.g. A):").pack()
panel_entry = tk.Entry(window, width=10)
panel_entry.pack(padx=10, pady=(0, 5))

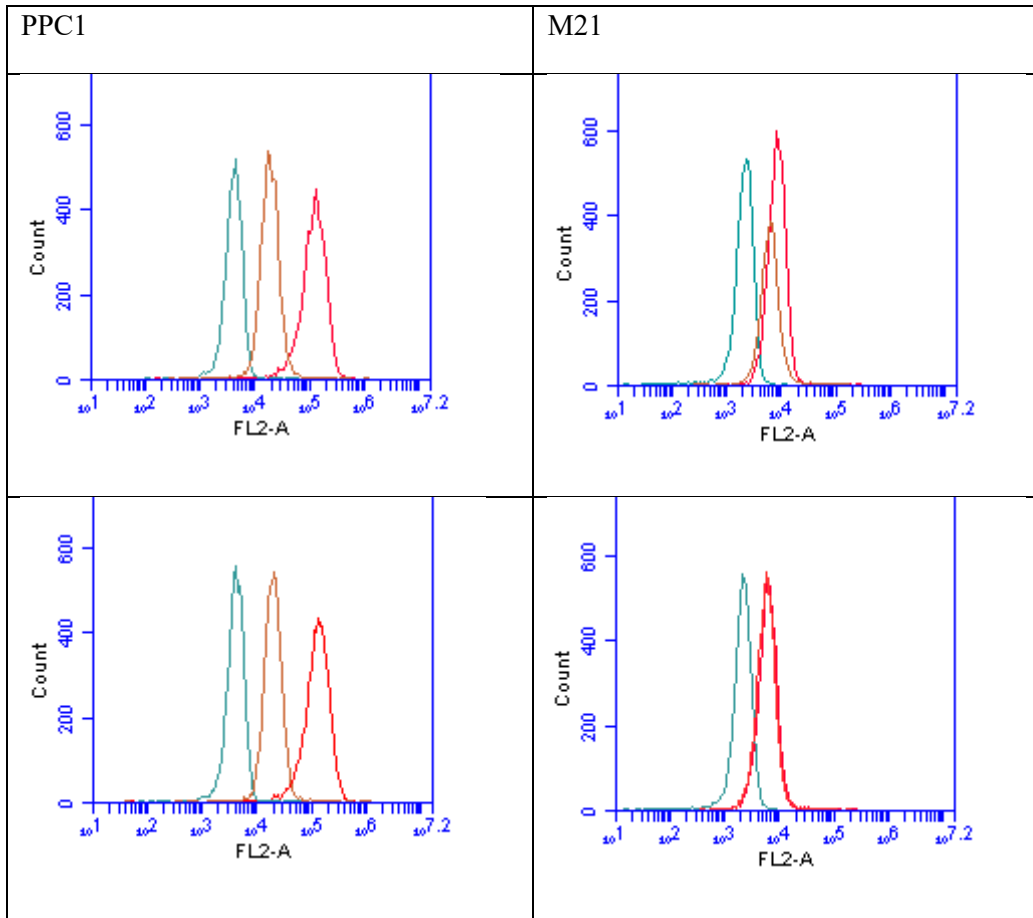
tk.Label(window, text="Y-axis Label (optional):").pack()
ylabel_entry = tk.Entry(window, width=40)
ylabel_entry.pack(padx=10, pady=(0, 10))

tk.Label(window, text="Paste your data (Prefix SampleNumber Value):").pack()
text_area = scrolledtext.ScrolledText(window, width=60, height=12)
text_area.pack(padx=10, pady=5)

tk.Button(window, text="Next: Define Groups & Generate",
command=process_input).pack(pady=10)

window.mainloop()
```

Lisa 4. Joonis 7A lisa. PPC1 ja M21 rakkude märgistamine biotiiniga HRP-st sõltuva lähiligeerimise kaudu voolutsütomeetria analüüsi jaoks.



Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Rasmus Enno ,

(autori nimi)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

Kullerpeptiidi retseptori identifitseerimine lähiligeerimise meetodil ,

(lõputöö pealkiri)

mille juhendaja(d) on Prof. Tambet Teesalu, Kristina Põšnograjeva, prof. Juhan ,
Sedman

(juhendaja nimi)

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada Tartu Ülikooli digitaalarhiivi kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;

2. annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;
3. olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile;
4. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Rasmus Enno

28.05.2025