

TARTU ÜLIKOOL

Loodus- ja täppisteaduste valdkond

Keemia instituut

Bioorgaanilise keemia õppetool

Elen Laaneväli

**MultiBacMam tehnoloogia kui tõhus biosensoreid kodeerivate  
multigeenide ülekande vahend G-valk seotud retseptorite  
aktivatsiooni uurimiseks**

Magistritöö (30 EAP)

Keemia

Juhendajad:

Santa Veikšina, PhD

Sergei Kopantšuk, PhD

Tartu 2022

## INFOLEHT

### **MultiBacMam tehnoloogia kui tõhus biosensoreid kodeerivate multigeenide ülekande vahend G-valk seotud retseptorite aktivatsiooni uurimiseks**

Käesolevas töös uuriti G-valk seotud retseptorite vahendatud signaaliradu kasutades selleks kimäärseid G-valke (Gs(X)). Kimäärsete G-valkudega võib loomulikke signaaliradu kaaperdada ja ümber suunata cAMP-signaali genereerimiseks, mida saab mõõta Epac biosensoriga. Multigeenseks geeniülekandeks kasutati MultiBacMam tehnoloogiat, mille käigus loodi üheksa uut viirust, mis on võimelised väga efektiivselt samas rakus ekspresseerima kõiki vajalikke biosensori elemente. Sama tehnoloogiaga koekspresseriti GABA<sub>B</sub> retseptorit.

**Märksõnad:** G-valkudega seotud retseptorid, kimäärsed Gs(X) valgud, EPAC biosensor, MultiBacMam tehnoloogia, fluorestsentsmikroskoopia

**CERCS koodid:** P310 Proteiinid, ensüümoloogia; P320 Nukleiinhappesüntees, proteiinisüntees; B220 Geneetika, tsütogeneetika; B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia; B740 Farmakoloogia, farmakognoosia, farmaatsia, toksikoloogia

### **MultiBacMam technology as an efficient biosensor-encoding multigene delivery tool to study G protein-coupled receptors activation**

In the present work, G protein-mediated receptor signalling was investigated using chimeric G proteins (Gs(X)). With chimeric G-proteins, natural signalling pathways can be hijacked and redirected to generate a cAMP signal, which can be measured with the Epac biosensor. MultiBacMam technology was used for multigene gene delivery, creating nine new viruses capable of expressing all the necessary biosensor elements in the same cell with high efficiency. The same technology was used to co-express the GABA<sub>B</sub> receptor.

**Keywords:** G protein-coupled receptors, chimeric Gs(X) proteins, EPAC biosensor, MultiBacMam technology, fluorescence microscopy

**CERCS codes:** P310 Proteins, enzymology; P320 Nucleic acids, protein synthesis; B220 Genetics, cytogenetics; B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology; B740 Pharmacological sciences, pharmacognosy, pharmacy, toxicology

# SISUKORD

1	KASUTATUD LÜHENDID	4
2	SISSEJUHATUS	6
3	KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
3.1	Transmembraanne signaaliülekanne	7
3.1.1	G-valk seotud retseptorid	7
3.1.2	G-valgud ja nende roll signaaliülekanDES	8
3.1.3	Modifitseeritud G-valgud	10
3.1.4	GABA <sub>B</sub> retseptor	11
3.2	Sissejuhatus metoodikatesse	12
3.2.1	MultiBacMam tehnoloogia	12
3.2.2	Bakuloviiruste tiitri määramine	14
3.2.3	Fluoresentsstehnoloogiad retseptorite uurimiseks	15
3.2.3.1	Epac biosensor cAMP-i määramiseks	15
3.2.3.2	GABA <sub>B</sub> retseptori kuvamine raku pinnal	17
4	EKSPERIMENTAALNE OSA	18
4.1	Materjalid ja aparatuur	18
4.2	Rekombinantsete bakmiidide loomine	20
4.3	Bakuloviiruste tootmine Sf9 rakkudes ja kontsentratsiooni määramine	21
4.4	MultiBacMam süsteemi valideerimine imetajarakkudes	22
4.4.1	Geeniülekanne imetajarakkudesse	22
4.4.2	Fluoresentsentspektroskoopia ja -mikroskoopia mõõtmised	23
4.4.2.1	cAMP taseme mõõtmine imetajarakkudes	23
4.4.2.2	GABA <sub>B</sub> retseptori fluorestsentsmärgistamine	23
4.5	Andmete töötlus ja visualiseerimine	25
5	TULEMUSED JA ARUTELU	26
5.1	MultiBacMam süsteemi loomine	26
5.2	Genereeritud bakuloviiruste kontsentratsiooni määramine	27
5.3	Biosensori tase ja jaotus U2OS imetajarakkude populatsioonis	28
5.4	Kimäärsete G-valkude avaldamise mõju cAMP-i signaalile	30
5.5	Retseptorite aktiveerimine ligandidega U2OS rakkudes	32
5.6	GABA <sub>B</sub> retseptori koekspressioonimine biosensoriga	33
6	KOKKUVÕTE	36
7	KASUTATUD KIRJANDUS	37
8	LISAD	41

# 1 KASUTATUD LÜHENDID

AC – adenülaadi tsüklaas

AcMNPV – *Autographa californica* multikapsiidne nukleopolühedroviirus

ATP – adenosiin-5'-trifosfaat

bp – aluspaar (*base pair*)

cAMP – tsükliline adenosiin-3',5'-monofosfaat

CFP – helesiniselt fluorestseeruv valk (*cyan fluorescent protein*)

CRISPR – klasterdatud regulaarsete vahedega lühikesed palindroomsed kordused (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*)

DNA – desoksüribonukleiinhape

DPBS – fosfaatpuhverdatud soolalahus (*Dulbecco's phosphate-buffered saline*)

*E.coli* – *Escherichia coli*, gram-negatiivne bakter

EDTA – etüleendiamiintetraatsetaat

Epac – cAMP efektorvalk (*exchange protein directly activated by cAMP*)

FRET – Försteri resonantsenergia ülekanne

GABA – gamma-aminovõihape

GDP – guansiindifosfaat

GFP – roheliselt fluorestseeruv valk (*green fluorescent protein*)

GPCR – G-valk seotud retseptorid (*G protein-coupled receptor*)

GTP – guansiintrifosfaat

G-valk – guaniinnukleotiide siduv regulaatorvalk

IBMX – 3-isobutüül-1-metüülksantiin

ICSE – pildianalüüsil põhinev raku suuruse hindamine (*image-based cell size estimation*)

IP3 – inositoltrifosfaat

ivp – nakatusvõimeline viirusosake (*infectious viral particle*)

kb – kiloaluspaar (*kilobases*)

LB – kasvusööde (*L-Broth; Luria Bertani*)

MOI – nakatuskordsus (*multiplicity of infection*)

MultiBacMam – multigeeni ülekanne imetajarakkudesse bakuloviiruse abil (*baculovirus gene transfer into mammalian cells*)

NECA - 5'-N-etüülkarboksamidoadenosiin

P – tõstearv (*passage*)

PCR – polümeraas ahelreaktsioon (*polymerase chain reaction*)

PFA – paraformaldehüüd

PKA – cAMP-sõltuv proteiinkinaas A

Sf9 – *Spodoptera frugiperda* putuka munasarjast eraldatud rakuliin

SFCA – pindaktiivsete ainete vaba tselluloosatsetaat (*surfactant-free cellulose acetate*)

SOC – bakterisööde (*super optimal broth with catabolite repression*)

Tris – tris(hüdroksümetüül)aminometaan

U2OS rakuliin – inimese osteosarkoomist algatatud rakuliin

X-Gal – bromo-kloro-indolüül-galaktopüranosiid

YFP – kollaselt fluorestseeruv valk (*yellow fluorescent protein*)

## 2 SISSEJUHATUS

Rakkude normaalse talituse aluseks on rakkudevaheline suhtlus ehk signaaliülekanne, mida vahendavad retseptorid. Kõige levinum membraansete retseptorite klass on G- Valk seotud retseptorid (GPCR), mis omavad keskset rolli nii füsioloogilistes kui ka patoloogilistes protsessides. Muutused retseptori aktiivsuses võivad põhjustada haiguslikke seisundeid, mistõttu on nad olulised ravimite märklauad ja ligikaudu 36% turul olevatest ravimitest on suunatud GPCR-le. GPCR-d vahendavad signaale läbi erinevat tüüpi guaniinnukleotiide siduvate regulaatorvalkude (G-valkude), mis osalevad mitmete signaaliradade aktiveerimisel ja moodustavad keerulise signalosoomi. Rakuline vastus, aga ka laiemalt mõju organismile, sõltub suurel määral signaalraja valikust. Teadlik suunamine ligandidega kindlale rajale võimaldaks arendada välja spetsiifilisemad ravimid, mis on ohutumad, väiksemate kõrvalmõjudega ja omavad suuremat terapeutilist akent. Kahjuks on siiani suur puudus universaalsetest meetoditest, mis võimaldaks lihtsalt ja odavalt mõõta erinevate signaaliradade samaaegset aktivatsiooni.

Varasemalt antud tööühmas on näidatud, et kimäärsete G-valkudega võib loomulikke signaalradu kaaperdada ja ümber suunata cAMP-signaali genereerimiseks, mida saab mõõta Epac biosensoriga. Loodud süsteem eeldas aga mitme viiruse kasutamist samaaegselt ja ei töötanud efektiivselt mõnede rakuliinide peal. Antud puudused elimineeriti käesolevas töös kasutades uut tüüpi multigeenset ülekande süsteemi – MultiBacMam tehnoloogiat. On genereeritud ja iseloomustatud üheksa uut bakuloviirust, mis on võimelised väga efektiivselt samas rakus ekspresseerima kõiki vajalikke biosensori elemente.

Kui leiti, et loodud süsteem on ülimalt efektiivne, tekkis võimalus püstitada veel ambitsioonikam eesmärk – testida obligatoorse GABA<sub>B</sub> retseptori heterodimeeri koossekspressiooni biosensori süsteemiga. Fluorestsentspektroskoopiliste ja -mikroskoopiliste meetoditega kinnitati, et MultiBacMam tehnoloogia tuleb toime nii paljude valkude kõrge ekspressiooniga ühes rakus. Tulevikus saaks esitatud meetodit kohandada GPCR ligandide kõrge tootlikkusega sõeluuringuteks.

## 3 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

### 3.1 Transmembraanne signaaliülekanne

#### 3.1.1 G-valk seotud retseptorid

Rakud peavad tajuma ja reageerima stiimulitele väliskeskkonnast, et kohaneda muutustele ja tagada raku normaalne areng. Paljud neist signaalidest on rakuvälised keemilised ühendid – mediaatorid, hormoonid, valgud jt, mis seonduvad spetsiifiliselt membraansete valkudega – retseptoritega. Retseptorite ülesanne on neid signaale tajuda ja ligandi seondumisel käivitada erinevaid signaaliülekanne kaskaade, mis põhjustavad muutusi rakus. Sellist informatsiooni ülekannet väliskeskkonnast raku nimetatakse transmembraaneks signaaliülekanne (Lodish *et al.* 2016).

G-valk seotud retseptorid (GPCR) on kõige suurem ja mitmekesine membraansete retseptorite klass. Kuna nad on tihedalt läbi põimunud inimese (pato)füsioloogiaga ja nende domeenid on oluline sihtmärk ravimitele, on nad intensiivselt uuritud ravimiarenduses. Hetkel on ligi kolmandik ravimitest suunatud neile hõlmates üle saja erineva GPCR-i (Sriram and Insel 2018), aga inimese genoomi poolt on määratud üle 800 GPCR-i, mis on mõjukad näiteks metabolismis ja neurokeemias (Fredriksson *et al.* 2003). Seetõttu nähakse neis potentsiaali haiguste nagu diabeet, vähk ja Alzheimeri tõbi raviks, kus võimalused sageli on piiratud (Hauser *et al.* 2017).

GPCR-i struktuur algab peptiidsest järjestusest raku välispinnal, kus paikneb N-terminaal, millele järgneb transmembraanne osa, kus paikneb seitse paralleelset hüdrofoobset  $\alpha$ -heeliksiit (7TM), ühendatud rakusiseste ja -väliste aasadega ja lõpeb rakus membraani läheduses asuva C-terminaaliga (Bockaert 1999). Vaatamata sarnasele üldstruktuurile, on GPCR-d väga mitmekesised, mis jaotuvad järjestuse ja struktuuri alusel viide klassi: rodopsiin, sekretiin, glutamaat, adhesioon ja Frizzled/Taste2 (Fredriksson *et al.* 2003). Suurimad klassidevahelised erinevused esinevad rakuvälistes aasades, mis määrab sidumistasku kuju, suurust ja interaktsioonide omadusi. Seetõttu saavad retseptori aktivatsiooni esile kutsuda väga erinevate omadustega tegurid: hormoonid, valgud, neurotransmitterid, lipiidid, metallioonid ja isegi valgus. GPCR-de varieteedid tajuvad signaale väga spetsiifiliselt, mis võimaldab juba ühes rakus eksisteerida korraga paljudel GPCR-l (Vsevolod *et al.* 2013; Venkatakrishnan *et al.* 2013).

GPCR-d esinevad rakus dünaamilisena: ebapüsivates konformatsioonides aktiivse ja mitteaktiivse oleku vahel, mida ligandid seondumisel ajutiselt lukustavad. Signaaliülekanne

algatamiseks peab GPCR üle minema aktiivsesse olekusse. Retseptorid aktiveeruvad ka ligandi puudumisel, tuntud kui basaalne aktiivsus. Basaalne aktiivsus on retseptoritel erinev ja mõjutatud ka keskkonna keemiliste omaduste poolt (Lamichhane *et al.* 2015). Näidatud on, et  $Zn^{2+}$  ja  $Cu^{2+}$  ioonid on võimelised basaalse aktiivsuse taset langetama või tõstma (Link *et al.* 2020). Üldiselt toimuvad konformatsioonilised üleminekud efektiivselt ligandi seostumisel. Pöörd-agonist on ligand, mis stabiliseerib inaktiivse konformatsiooni ja langetab retseptori aktiivsuse alla basaalse taseme. Antagonist retseptori aktiivsust ei mõjuta, aga võistlevad agonistiga ja pöörd-agonistiga seondumiskoha pärast. Agonist stabiliseerib aktiivse konformatsiooni, kus on toimunud muudatused transmembraanses ja tsütosoolses osas, mis laseb seonduda rakusisestel partneritel indutseerides signaalradade müriaadi. GPCR-1 on mitmeid eristatavaid partnerite gruppe, mis vahendavad signaaliülekanne (arrestiinid, dishevelled jt), keskne neist on aga G-valgud (Weis and Kobilka 2018).

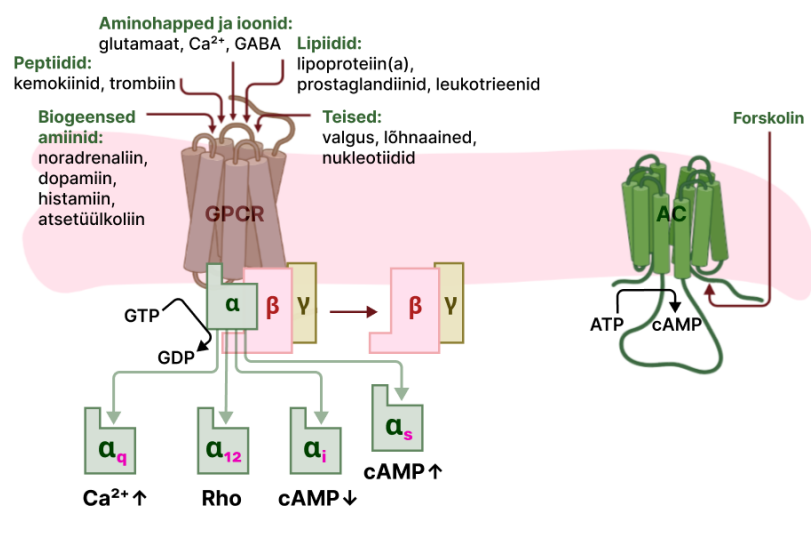
### 3.1.2 G-valgud ja nende roll signaaliüleandes

Guaniinnukleotiide siduvad regulaatorvalgud ehk G-valgud on plasmamembraani läheduses asuvad valgud, mille heterotrimeerne vorm on GPCR-le tähtsaim signaaliüleandes. Heterotrimeersed G-valgud koosnevad  $G\alpha$ ,  $G\beta$  ja  $G\gamma$  allühikust (lisa 1) (Flock *et al.* 2015). Allühikud  $G\beta$  ja  $G\gamma$  esinevad alati dimeerina ( $G\beta\gamma$ ) ja reguleerivad iseseisvalt  $G\alpha$  allühikust, näiteks kaltsiumioonkanalite aktiivsust (Quallo *et al.* 2017). Määrav osa  $G\alpha$  allühikust on guanosiinnukleotiide siduv sait (GTP, guanosiintrifosfaat ja GDP, guanosiindifosfaat) sisaldades madala aktiivsusega GTPaasi (GTP-d hüdrolyüsiv). Aktiveeritud GPCR käitub guaniinnukleotiidi vahetusfaktorina (GEF), vahendades inaktiivses GDP- $G\alpha\beta\gamma$  kompleksis GDP dissotsiatsiooni. GTP kõrgem rakusisene sisaldus põhjustab kiiret seondumist  $G\alpha$  allühikuga ja viib  $G\alpha\beta\gamma$  kompleksi lagunemiseni või ümberkorralduseni. Vabastatud  $G\alpha$  allühik reguleerib signaalikaskaadis efektormolekule (nt ensüüme, ionkanaleid).  $G\alpha$  inaktivatsioon on reguleeritud GTP hüdrolyüsi kiirusega GTPaasi domeenis. Kui GDP-d siduv  $G\alpha$  taastab kompleksi  $G\beta\gamma$  allühikuga, on kogu protsess valmis korduma (Vetter and Wittinghofer 2001; Leipe *et al.* 2002).

GPCR-d on evolutsiooniliselt väga palju muutunud, rikastunud nii geenide arvu kui ka järjestus-põhiselt. Ometi on G-valkude struktuur püsinud kontrastselt konserveerununa jagunedes kõigest nelja perekonda funktsiooni ja homoloogia alusel:  $G_s$  (sisaldab  $G_s$ ,  $G_{olf}$ ),  $G_i$  ( $G_{i1-3}$ ,  $G_o$ ,  $G_t$ ,  $G_z$ ),  $G_q$  ( $G_q$ ,  $G_{11}$ ,  $G_{14}$ ,  $G_{15}$ ) ja  $G_{12}$  ( $G_{12}$ ,  $G_{13}$ ) (joonis 2A). Inimese organismis on 21  $G\alpha$  allühikut, kodeeritud 16 geeni poolt, mis erinevad alternatiivse splaissingu tulemusel (Flock *et al.* 2017). Iga perekonna liige reguleerib signaalradade efektorite aktiivsust (nt

adenülaadi tsüklaas (AC), fosfolipaas C) ja sekundaarsete virgatsainete teket (nt tsükliline adenosiinmonofosfaat (cAMP),  $Ca^{2+}$ , inositoltrisfosfaat (IP3)) (joonis 1). Rakuline vastus võib olla lühiajaline, mõjutades ionide rakusisest kontsentratsiooni, või pikajaliste mõjudega muutes geenide transkriptsiooni. Seetõttu on õige  $G\alpha$  allühiku aktiveerimine kriitilise tähtsusega (Neves *et al.* 2002).

Senini ei teata täpselt kuidas saavutavad GPCR-d spetsiifilise G-valgu sidumise. Arvukad GPCR-G-valk kompleksside struktuurianalüüsid (Koehl *et al.* 2018; Draper-Joyce *et al.* 2018; García-Nafria *et al.* 2018) ja järjestuse joondamised (Flock *et al.* 2017) pole leidnud siduvat GPCR-i järjestust, mis määrab  $G\alpha$  seostumise. Struktuurianalüüsid viitavad palju keerulisemale mustrile, kus struktuursed muudatused, mis toimuvad ligandi sidumisel, määravad rakusisese seondumistasku kuju (TM6 ja TM7 asendi) ja loovad unikaalse keskkonna G-valgu seondumiseks. Ainult järjestuse põhjal ennustamine, millise edastaja kaudu signaal edasi läheb, on praeguseni keerukas. Kuna  $G\alpha$  allühikud on rangemalt konserveeritud struktuuriga, on võimalik luua tugevamaid seoseid järjestuse ja funktsiooni vahel. Perekondade üleselt säilinud  $G\alpha$  põhiosa hoiab struktuuri koos ja vastutab signaalraja aktiveerimise eest. GPCR-ga seostuvad erinevad piirkonnad (GPCR-i poolt äratuntav nn  $G\alpha$  „triipkood“), millest väljapaistvaim on C-terminaali läheduses asuv heeliks (H5) (lisa 1) (Flock *et al.* 2017). Arvatakse et kuni 70% sidumise spetsiifikast on tagatud H5 poolt (Flock *et al.* 2015) ja seda toetavad ka katsed kimäärsete valkudega, kus muudetud H5 järjestusega on suudetud signaalirada ümber suunata (Conklin *et al.* 1993; Inoue *et al.* 2019a). Kindlasti ei ole see GPCR-de seas üldine reegel ja seondumisel on olulised mitmed piirkonnad (Okashah *et al.* 2019).



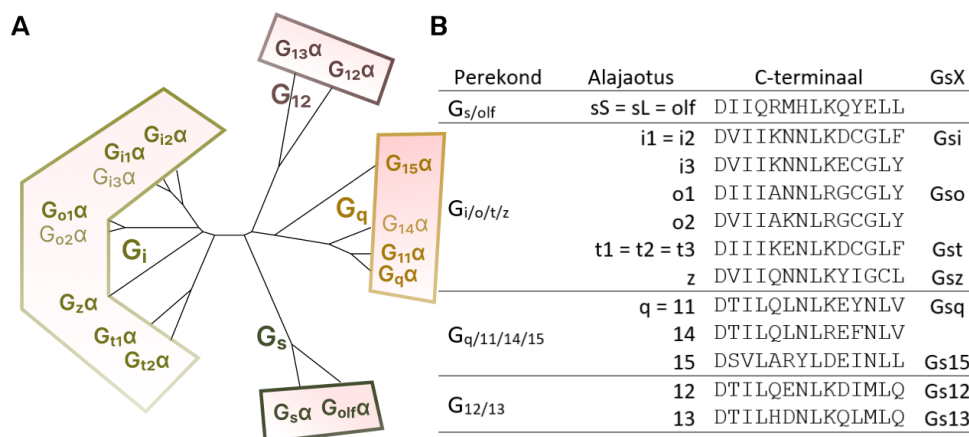
**Joonis 1. Ülevaade erinevatest G-valkude perekondade poolt reguleeritud signaaliradadest.** Joonis on kohandatud artiklist (Dorsam and Gutkind 2007).

Varasemates uuringutes, kus mõõdeti tavaliselt ühte rakulist vastust, kujunes arusaam, et üks GPCR annab signaali edasi läbi ühe G-valgu (või arrestiini). Hiljutised katsed, kus on mõõdetud ulatuslikult GPCR ja G-valk interaktsioone (Avet *et al.* 2022) või kasutatud kimäärseid G-valke (Inoue *et al.* 2019b), on paljastanud palju keerulisema seondumise profiili: üks GPCR on võimeline aktiveerima erinevaid G-valke ja ka arrestiine erineval määral. Rakuline vastus, aga ka laiemalt mõju organismile, sõltub suurel määral raja valikust. Nüüdseks on teada, et ligandidega on võimalik kallutada, milline signaalrada aktiveeritakse (tuntud kui kallutatud agonism, *biased agonism*) (Lamichhane *et al.* 2020). See annab võimaluse arendada välja teadlikumalt spetsiifilisemad ravimid, mis on ohutumad, väiksemate kõrvalmõjudega ja omavad suuremat terapeutilist akent (Schmid *et al.* 2017). Selle eelduseks on uurimismeetod, mis võimaldab eristada erinevate G-valkude signaale.

### 3.1.3 Modifitseeritud G-valgud

Et ületada GPCR-de reguleeritud signaalradade uurimisega seotud probleeme, on üks võimalus konstrueerida G-valkude C-terminalised kimäärid. Liitvalgud ehk kimäärseid valgud on valgud, mis tekivad kahe või enama geeni ühendamisel, mis on algselt kodeeritud eraldi. Kimäärsetel G-valkudel on  $G\alpha$  allühiku C-terminalis muudetud lühike valguline järjestus, mis on oluline  $G\alpha$ /GPCR interaktsioonide piirkond ja omane vastavale  $G\alpha$  allühikule. Samas kui G-valgu allühiku  $G\alpha$  põhiosa (*core*) vastutab kindla signaaliülekanne raja aktiveerimise eest. Ekspresseerides rakus kimäärseid G-valke, on võimalik kaaperdada ehk üle võtta loomulikke signaalradu ja ümber suunata nad ühele rajale, mis lihtsustab signaalide amplituudide võrdlust (Conklin *et al.* 1993; Inoue *et al.* 2019b).

Ballisteri töörühmas loodud kaheksa  $G_s$  valgu kimääri ( $G_sX$ ) omavad C-terminalis spetsiifilisi 14 aminohappelisi järjestusi (joonis 2B), mis pärinevad  $G_s$ -välisest perekonnast (joonis 2A), aga aktiveerudes stimuleerivad adenülaadi tsüklaasi, mis katalüüsib adenosiin-5'-trifosfaadist (ATP) cAMP-i. See võimaldab cAMP-i taseme järgi võrrelda erinevate GPCR-de aktivatsiooni, mis ei ole tingimata seostunud  $G_s$  allühikuga. Konstruktides  $G_{si}$ ,  $G_{so}$  ja  $G_{st}$  on -4 positsioonis tsüsteiin asendatud seriiniga, mis muudab neid pertussis-toksiini suhtes mittetundlikuks. Pertussis toksiin katalüüsib  $G_i$  perekonna valgujärjestuse ADP-ribosüülumist, mis ei lase  $G\alpha$  allühikul retseptoriga seostuda. Seeläbi on võimalik vajadusel vähendada endogeensete  $G_i$  perekonna allühikute segavat mõju (Ballister *et al.* 2018).



**Joonis 2. Imetajate G-valkude homoloogia ja kimäärsete  $G\alpha$  allühikute muudetud aminohappelised järjestused C-terminaalis.** A: Jooniste võrdlusest on näha, et GsX konstruktid hõlmavad suurt osa perekondadest. Joonis on kohandatud artiklist (Milligan and Kostenis 2006). B: Modifitseeritud järjestused on grupeeritud  $G\alpha$  perekondadesse. Alajaotused, mis omavad C-terminaalis ühist järjestust, on sisse kantud ühekordselt. (Ballister *et al.* 2018)

### 3.1.4 GABA<sub>B</sub> retseptor

Erinevate retseptorite uurimine on erineva raskustasemega. Retseptorid, mis moodustavad ka komplekse teiste retseptoritega, vajavad nõudlikke meetodeid ja raskendavad nende uurimist. GABA retseptorid on retseptorite klass, mis reageerivad neurotransmitterile gamma-aminovõihape (GABA). GABA retseptorid jagunevad kahte klassi: GABA<sub>A</sub> ja GABA<sub>B</sub>. GABA<sub>A</sub> retseptorid on ligand-reguleeritud ioonkanalid ja GABA<sub>B</sub> on GPCR, mille puhul eeldati, et esineb kahe tüüpilise allvormina (GABA<sub>B1</sub> ja GABA<sub>B2</sub>). Selgus aga, et GABA<sub>B</sub> esineb obligatoorse heterodimeerinä (Kaupmann *et al.* 1998). Kuigi GABA<sub>B2</sub> allühikuga ei seonu ükski teadaolev ligand, tagab heterodimeerne kompleks kõrge ligandi afiinsuse GABA<sub>B1</sub> allühikule ja G-valgu seondumise (lisa 1) (Pin *et al.* 2004). Endoplasmaatilise retiikulumi (ER) retentsioonijärjestuse olemasolu tõttu C-terminalis ei jõua GABA<sub>B1</sub> iseseisvalt plasmamembraani. GABA<sub>B2</sub> maskeerib GABA<sub>B1</sub> retentsioonijärjestuse, mis võimaldab heterodimeeril jõuda raku pinnale (Galvez 2001).

GABA<sub>B</sub> retseptor on ahvatlev sihtmärk neuroloogiliste ja vaimse tervise häirete raviks. Uuringud on kinnitanud GABA<sub>B</sub> ligandide mõju ärevuse, depressiooni ja nikotiinisõltuvuse leevendamiseks. Paraku piiravad ebasoodsad kõrvaltoimed GABA<sub>B</sub> retseptorite ligandide kasutamist teraapias, millest seni on heaks kiidetud ravimiametite poolt ainult baclofen (Jacobson *et al.* 2018).

## 3.2 Sissejuhatus metoodikatesse

### 3.2.1 MultiBacMam tehnoloogia

Valgud on väljundiks informatsioonile, mis on talletatud geenidesse ja mRNAsse. Harva on valgud isoleeritud – rakus toimimiseks moodustavad valgud keerulisi komplekse (valkudega, desoksüribonukleiinhapetega (DNAga), madalamolekulaarsete molekulidega), osa neist struktuurselt stabiilsed, aga sama olulised on ka nende hetkelised kokkupuuted, mis ühiselt loovad dünaamilise võrgustiku (interaktoomi) (Luck *et al.* 2020).

Retseptorite ja kimäärsete G-valkude samaaegne avaldumine rakus võimaldab uurida nende omavahelisi interaktsioone ja mõju rakkude talitusele. Lisaks on vaja rakus avaldada fluorestreeruvaid valke, mis võimaldab rakulist vastust või retseptori esinemist optiliste meetoditega kvantifitseerida. Nende valkude ekspresseerimine imetajarakkudes tagab õige posttranslatoorse modifikatsiooni ja võimaldab maksimaalselt imiteerida loomulikku keskkonda (Harrison and Jarvis 2006).

Paraku ei leitud mitme valgu koosavaldamiseks imetajarakus laialdaselt meetodeid. Järjestus on võimalik raku viia genoomi integreerides (püsiliini loomine) või viiruslikul vektoril (plasmiidil). Viirusliku vektori korral on võimalik jagada valke kodeerivad geenid eraldiseisvatesse plasmiididesse transfektsioonil, aga nii on keeruline tagada ühtlane ekspressioonitase, mis oleks ka korratav. Tulemuseks on ebavõrdne geenide avaldumine rakkude vahel mis ei sobi meetoditeks, kus uuritakse tervet rakkude populatsiooni (Phan and Wodarz 2015). Nende puuduste vältimiseks on tõhusam valkude geenid koondada ühte plasmidi (*multigene assay*) (Kriz *et al.* 2010). Järjestuse kasvades muutuvad erinevad keemilised ja füüsikalised meetodid (nt transfektsioonireagendid ja elektroporatsioon) geenide sisestamiseks ebatõhusamaks, mis ei ole tingimata takistus kui eesmärk on luua rakkude püsiliini. Rakkude püsiliinis, kus geenid on integreeritud genoomi, ei võimaldaks samaväärset paindlikkust, kus on vajalik üleminek ühelt rakuliinilt teisele suurema pingutuseta. Oluliselt efektiivsemalt saaks viiruste, muuhulgas bakuloviirustega (putukarakkudes paljunevad DNA viirused), vahendusel kanda geene üle imetajarakkudesse.

Antud töö raames on mitme valgu koossekspeereerimiseks kasutatud modifitseeritud MultiBacMam™ süsteemi (Geneva Biotech 2021), mille saab jagada järgmisteks etappideks:

#### **1. Rekombinantsete plasmiidide loomine, mis sisaldavad huvipakkuvate valkude järjestusi**

Kõikide valkude järjestused on vaja esmalt kloonida aktseptor- ja doonorvektoritele, mis sisaldavad vajalikke multikloonimissaite (MCS), unikaalseid endonukleasid lõikesaite

(*homing endonuclease*) ja LoxP-järjestust koos resistentsusmarkeritega, mis on vajalikud selektiivseks kombinatsiooniks. LoxP palindroomsetele aladele seondub spetsiifiliselt Cre-rekombinaas (rekombinatsiooniensüüm bakteriofaagist P1), ühildades erinevad plasmiidid, mis sisaldavad valkude järjestusi. Et tagada kõrge valkude kontsentratsioon imetajarakkudes, on vaja need viia tugevate promootorite alla (CAG, CMV), mida aktiveeritakse imetajarakkudes. Kui tahetakse valke ekspresseerida nii putuka- kui imetajarakkudes, võiksid need asuda nn topelt funktsiooniga hübriidse promootori all, mida tunnevad ära nii putuka- kui ka imetajarakkude faktorid.

Töös avaldati koos järgnevaid valke:

- 1) kaheksa kimäärset G-valku (üldnimetusega Gsi, Gso, Gst, Gsq, Gsz, Gs12, Gs13, Gs15 – lühendatult GsX) ja metsiktüüpi Gs allühik,
- 2) Epac-S<sup>H187</sup> (lühendatult H187) biosensor, millega saab mõõta cAMPi taseme muutusi rakus,
- 3) vesikulaarse stomatiidi viiruse glükoproteiin G (VSVG, *vesicular stomatitis virus glycoprotein G*), mis asuvad bakuloviiruse pinnal ja aitab bakuloviirustel väljuda imetajarakkude rakusisestest vesiikulitest ja muudab nakatamise väga efektiivseks ja laiendab rakuliinide valikut (Ci et al. 2018; Barsoum et al. 1997),
- 4) GABA<sub>B</sub> retseptori heterodimeeri allühik GABA<sub>B1</sub>, mis on liidetud SNAP ja CLIP-märgisega, mida saab märgistada valgu ilmutamiseks membraanis ja
- 5) GABA<sub>B2</sub> allühik, mis on vajalik GABA<sub>B</sub> retseptori toimimiseks (Masharina et al. 2012).

## **2. Rekombinantse plasmidi ühildamine bakuloviiruse genoomiga (bakmiidiga)**

Geenide ülekandeks imetajarakkudesse kasutati putukaviirust – modifitseeritud bakuloviirust. Enim uuritud ja kasutatud leidnud on modifitseeritud *Autographa californica* multikapsiidne nukleopolühedroviirus (AcMNPV). AcMNPV sisaldab kaheahelalist tsirkulaarset 134 kiloaluspaari (kb) suurust bakuloviiruse genoomi, mis sisaldab kogu informatsiooni viirusosakeste tootmiseks ja millega saab üle kanda vähemalt 100 kb suurust geneetilist materjali imetajarakku (Mansouri et al. 2016). Töös on kasutusel sellest välja arendatud DH10MultiBac genoomi. Rekombinantne plasmiid ühildatakse bakmiidiga transpositsioonelementide (Tn7L ja Tn7R) kaudu, mida viib läbi nn abistajaplasmiid. Sini-valge selektsiooniga on võimalik valida bakterikolooniad, mis sisaldavad uuritavaid gene.

## **3. Rekombinantsete bakuloviiruste genereerimine**

Rekombinantne bakmiid transfekteeritakse putukarakkudesse bakuloviiruste tootmiseks. Bakuloviirused suudavad paljuned ainult putukarakkudes, mistõttu laialdaselt levinud putukarakuliin nende paljundamiseks on *Spodoptera frugiperda* putuka munasarjast eraldatud Sf9 rakuliin. Bakuloviirused suudavad siseneda ka imetajarakkudesse, kandes nendesse geneetilist materjali, aga mitte paljunema, mis teeb nende käsitlemise ohutuks (bioohutus tase 1). Töös kasutatakse ära Sf9 rakkude omadust kasvada suspensioonis, mis võimaldab suhteliselt odavalt kasvatada suuri rakukoguseid ning toota rohkem bakuloviiruseid.

#### **4. Imetajarakkude nakatamine rekombinantsete bakuloviirustega**

Nakatades imetajarakke rekombinantse bakuloviirusega on võimalik rakkudes soovitud valke avaldada. Ekspressiooni taseme kontrollimiseks imetajarakus on võimalik varieerida viiruse kogust ja lisada kemikaale, nagu naatriumbutüraat, mis on deatsetülaasi mittespetsiifiline inhibiitor ja muudab DNA struktuuri transkriptsiooni jaoks avatumaks (Barka 1998). Ülevaade üldisest MultiBacMam süsteemi töövoost on leitav lisast 2.

##### **3.2.2 Bakuloviiruste tiitri määramine**

Ekspressioonitaset mõjutavad mitmed faktorid nagu infektsiooniaeg ja rakkude arv nakatamise alghetkel, aga kriitilisem on viirusosakeste osakaal rakkude suhtes ehk MOI (*multiplicity of infection*). MOI määramise eelduseks on nakatamisvõimeliste viirusosakeste kontsentratsiooni ehk tiitri mõõtmine, et tagada optimaalne ekspressioonitase ja katse korratavus. Erinevad viiruse tiitri määramise meetodid – naastude analüüs, mis on ajalooliselt olnud kõige levinum meetod (Hink and Vail 1973), või Q-PCR (reaalaja polümeraasahelreaktsioon), on vastavalt kas liiga töö- ja ajamahukas või ei suuda eristada nakatamisvõimetuid viirusosakesi funktsionaalsetest. Rakkude nakatamisjärgse diameetri muutusel põhinev meetod on optimaalne standardvigade, ajakulu (kuni 24 t) ning hinna poolest (Roldão *et al.* 2009).

Meetod põhineb nähtusel, et bakuloviirustega nakatatud putukarakud lõpetavad jagunemise ning rakkude diameetri suurenemine 24 t möödudes on põhjustatud valdavalt esmakordsest nakatamisest. Sellest tulenevalt on võimalik leida seos viirusosakeste kontsentratsiooni ja rakkude diameetri vahel – mida rohkem on lahuses viirusosakesi, seda suurem on rakkude diameeter. Diameetri muutus peale esmakordset nakatamist jääb hinnanguliselt vahemikku 20 - 40% (Janakiraman *et al.* 2006). Käesolevas töös on rakkude diameeter määratud pildianalüüsil kasutades ICSE-tööriista (pildianalüüsil põhinev raku

suuruse hindamine; *image-based cell size estimation*), mis on välja arendatud Tartu Ülikooli Bioorgaanilise keemia õppetooli töörühmas (Laasfeld *et al.* 2017).

### 3.2.3 Fluorestsentsstehtehnoloogiad retseptorite uurimiseks

Valkude paiknemise, interaktsioonide ja mikrokeskkonna detailne ajalis-ruumiline tuvastamine naturaalses olekus on vajalik nende funktsioonide mõistmiseks. Fluorestsentsi ja bioluminestsentsresonantsenergia ülekande (FRET ja BRET) tehnoloogiad võimaldavad nanomeetri skaalal tundlikult jälgida kahe märgise vahelisi kaugusi. Olenevalt märgiste paigutusest võimaldab see analüüsida konformatsioonilisi muutusi ühe valgussees (näiteks retseptoris) või jälgida valk-valk interaktsioone.

#### 3.2.3.1 Epac biosensor cAMP-i määramiseks

Leidub väga kinnistunud ja laia määramisalaaga meetodeid cAMP-i mõõtmiseks rakus, mis võimaldavad saavutada tundlikuse pikomolaarsel tasemel. Neist levinuimad on näiteks radioimmuunanaluüs (RIA) (Brooker *et al.* 1979) või meetodid, mis määravad [<sup>3</sup>H]-cAMP hulka rakus (Gilman 1970). Paraku kõik sarnased meetodid ei võimalda ajaliselt mõõta cAMP-i taseme muutusi elusates rakkudes nagu seda saab teha fluorestsentsil (ja bioluminestsentsil) põhinevate biosensoritega.

Försteri resonantsenergia ülekande on füüsikaline nähtus, kus doonorfluorofoor oma ergastatud olekus kannab mittekiirguslikult osa oma ergastusenergiast üle aktseptorfluorofoorile, põhjustades sellega aktseptorfluorofoori fluorestsentsi (Forster 1946). Fluorofoorideks saavad olla kvanttpiigid (*quantum dots*, QDs) fluorestseeruvad orgaanilised molekulid ning valgud, aga ainult valke on võimalik lihtsasti geneetiliselt kombineerida (Masharina *et al.* 2012). FRET-i toimumiseks on vajalik fluorofooride lähedus (kuni 10 nm), dipoolide orientatsioonid, mis soodustavad ülekannet ja doonori kiirgus- ning aktseptori ergastusspektri kattumine. Energia ülekande efektiivsus ( $E$ ) väljendub valemiga:

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6} \text{ (Valem 1)}$$

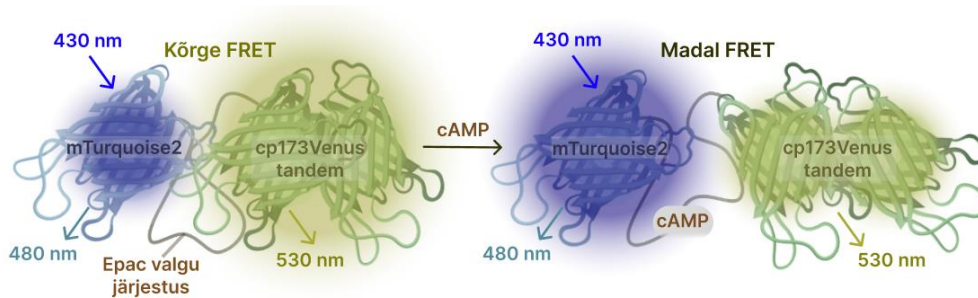
millest järeldub, et ülekande efektiivsus on väga tundlik fluorofooride omavahelise kauguse ( $r$ ) suhtes. Försteri raadius ( $R_0$ ) ehk vahekaugus, kus ülekande efektiivsus on pool maksimaalsest, sõltub fluorofooride dipoolsest orientatsioonist ja doonori kiirgus- ning aktseptori ergastusspektri kattumisest. FRET-il põhinevad cAMP-biosensorid tuginevad energia ülekande efektiivsuse muutusel fluorofooride kaugenemisel, mida põhjustab cAMP-i seondumine (joonis 3). Esineb kaks levinud viisi, kuidas efektiivsuse muutusi esitada:

doonori ja aktseptori fluorestsentsi intensiivsuse suhtena (*sensitized emission*, SE) ja doonori fluorestsentsi eluea kaudu (*fluorescence lifetime imaging*, FL). SE meetodis ergastatakse doonorit sobival lainepikkusel ja FRET-i efektiivsus väljendub doonori ja aktseptori kiirguse intensiivsuse suhtena. FL sõltub ainult doonori signaalist ja ülekande efektiivsus saadakse doonori emissiooni eluea muutusest (Lakowicz 2006).

Varasem fluorestsentsnähtusel põhinev biosensor cAMP-i määramiseks baseerus FRET-i efektiivsusel cAMP-sõltuva proteiinkinaas A (PKA) allühikute vahel. PKA keerukas dissotsiatsioonimehhanism, mis nõuab nelja cAMP molekuli koordineeritud seondumist, muutis andmete analüüsi keeruliseks (Adams *et al.* 1991). Selleks hetkeks polnud veel tuvastatud geeni, mis kodeerib rohelist fluorestsentsvalku (GFP, *green fluorescent protein*), meduusilt *Aequorea victoria*. Paraku oli valkude märgistamine fluorofooridega üldtuntult vaevaline ja sondi sisestamine rakkudesse mikrosüstimise läbi tehniliselt keerukas. Pärast GFP kloonimist (Prasher *et al.* 1992), ja ka hiljem kui tuvastati homoloogsed valgud teistest organismidest, on välja arendatud fluorestsentsvalk-FRET biosensorid (FP-FRET), mis võimaldavad otseselt visualiseerida dünaamilisi protsesse elusrakkudes. Esialgsel fluorestsentsvalkudel oli palju puudusi: madal eredus, vastupidavus pH muutustele ja fotostabiilsus ning ergastus UV-spektraalses alas, mis on rakkudele tsütotoksiline. Nende puuduste kõrvaldamiseks on läbi mutatsioonide on välja arendatud lai spekter erinevate omadustega fluorestsentsvalke (Piston and Kremers 2007).

Varasemad cAMP efektorvalgud (Epac valgud, *exchange protein directly activated by cAMP*) põhinevad biosensorid koosnesid kollasest (*yellow fluorescent protein*, YFP, aktseptor) ja tsüano fluorestsentsvalgust (*cyan fluorescent protein*, CFP, doonor), mis olid omavahel seotud Epac valgu sidumisdomeeni polüpeptiidahelaga. Kõikide sarnaste biosensorite tuumikuks on Epac valk, mis cAMP-i seondumisel kujundab biosensori konformatsiooni ümber ja seeläbi kahandab FRET-i efektiivsust. (Ponsioen *et al.* 2004). Esialgsel CFP-YFP paaril oli mitmeid puudusi: CFP lai kiirgusspekter kattub osaliselt YFP omaga, mistõttu mõõdetud YFP intensiivsus ei tulene ainult FRET-st ja ka YFP madal eredus ning pH-tundlikkus (van der Krogt *et al.* 2008). Biosensoris Epac-S<sup>H187</sup> on CFP asendatud doonoriga mTurquoise2, mis on tunduvalt eredam ja fotostabiilsem ja võimaldab pikema aja jooksul mõõtmisi teostada. Doonori suurem eredus võimaldab rakke ergastada väiksema intensiivsusega, mis vähendab fototoksilisust. YFP on asendatud aktseptoriga cp173Venus tandem, mis on vastupidavam pH taseme kõikumistele. Epac1 valgus tehtud mutatsioon (glutamiini asendus glutamaadiga), suurendab cAMP-i afiinsust 2,5 korda, mis sobib

kasutamiseks rakkudes, kus cAMP-i tase on tavalisest madalam (joonis 3) (Klarenbeek et al. 2015).



**Joonis 3. Epac-S<sup>H187</sup> cAMP biosensori tööpõhimõte.** Ergastades doonorit (mTurquoise2) lainepikkusel 430 nm olukorras, kus cAMP ei ole sensoriga seostunud, on FRET-i efektiivsus kõrge ja aktseptori (cp173Venus tandem) fluorestsentsi intensiivsus lainepikkusel 530 nm on suur. cAMP-i seostumisel muutub sensori konformatsioon, fluorofoorid kaugenevad üksteisest, FRET-i efektiivsus langeb ja seetõttu domineerib doonori kiirgus lainepikkusel 480 nm.

### 3.2.3.2 GABA<sub>B</sub> retseptori kuvamine raku pinnal

Valkude selektiivseks märgistamiseks rakus on kasutusel erinevad orgaanilised madalamolekulaarsed fluorestsivärvid. Värvet saab suure tundlikusega mõõta juba väga madalatel kontsentratsioonidel, sest nad on reeglina eredamad, on ajas stabiilsed ega häiri rakulisi protsesse. GABA B<sub>1A</sub> allühik on seotud 20 kDa suuruse SNAP-märgisega, muteeritud O<sup>6</sup>-alküülguaniin-DNA alküültransferaasiga (O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase, AGT), mida saab selektiivselt märgistada (Masharina et al. 2012).

O<sup>6</sup>-alküülguaniin-DNA alküültransferaasid on rakkudes olevad ensüümid, mis parandavad O<sup>6</sup>-alküleeritud guaniinjääke DNAs. AGTd parandusmehhanism on enesehävituslik: guaniinjäägi küljes olev alküülrühm liidatakse kovalentselt AGT reaktiivse tsüsteiiniga, mis inaktiveerib reaktsioonitsentri (lisa 3). Seetõttu on nad tõmmanud esialgu tähelepanu keemiaravis kuna AGT inhibeerimine suurendaks hetkel kasutatavate DNAd alküülivate ravimite efektiivsust (Damoiseaux et al. 2001). SNAP-märgise loomisel on ära kasutatud AGT madalat selektiivsust, mis võimaldab arendada varieeruvate omadustega O<sup>6</sup>-bensüülguaniini derivaate. Vältimaks olukorda, kus endogeensed AGTd tuleb enne märgistamist inhibeerida, et tagada spetsiifiline seondumine, on SNAP-märgise loomisel AGT muteeritud (Juillerat et al. 2003; Keppler et al. 2003).

## 4 EKSPERIMENTAALNE OSA

### 4.1 Materjalid ja aparatuur

MultiBacMam ülekandevektorid (pACEBac1, pUCDM-VSVG, pIDC, pIDK, pMDS ja pSPL-IM) on saadud ettevõttest Geneva Biotech. Kimäärsete G-valkude (Gsi, Gso, Gst, Gsz, Gs12, Gs13, Gs15, Gsq) ja metsiktüüpi Gs cDNA-d sisaldavad pEM705 plasmiidid on tellitud *E.coli* (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  tüve rakkudes Addgene'st (Robert Lucas Lab). G-valgu  $\gamma_2$  ja  $\beta_1$  allühiku plasmiidid on tellitud cDNA Resource Center-st. GABA<sub>B</sub> retseptori allühikute järjestused koos SNAP ja CLIP-märgistega on saadud Kai Johnssoni laborist. GABA<sub>B</sub>-SNAP bakuloviirus on loodud antud õppetooli (Santa Veikšina) koostöös Läti Orgaanilise Sünteesi Instituudiga (Edijs Vavers). Epac-S<sup>H187</sup> biosensori pcDNA3.1-H187 on saadud Kees Jalinki laborist. pMDS-H187 plasmidi on loonud Santa Veikšina pMDS ja pcDNA3.1- H187 ühildamisel.

Plasmiidide paljundamiseks kasutati *E.coli* tüvesid DH5 $\alpha$  (NEB) ja PirHC (Geneva Biotech), mille RbCl kompetentsed vormid on valmistatud antud õppetoolis. Bakmiidide loomiseks kasutati *E.coli* tüve DH10MultiBac (GenevaBiotech) rakke. Selektiooniplaatide tegemiseks on kasutatud söödet L-Broth (AppliChem), agarooši (Sigma), IPTG-d (Fermentas), X-Gal-i (bromo-kloro-indolüül-galaktopüranosiid) (Thermo Scientific) ja antibiootikume ampitsilliin (AppliChem), kanamütsiin (Gibco), tetratsükliin (Sigma), gentamütsiin (MP Biomedicals), klooramfenikool (Sigma) ja spektinomütsiin (Sigma). Bakterite transformeerimisel on kasutatud SOC meediumit (2% trüpton (Lab M), 0,5% pärmiekstrakt (Lab M), 10 mM NaCl (AppliChem), 2,5 mM KCl (AppliChem), 10 mM MgCl<sub>2</sub> (AppliChem), 10 mM MgSO<sub>4</sub> (AppliChem), 20 mM glükoos (KEBO)). Bakmiidide ja rekombinantsete plasmiidide puhastamisel kasutati Midiprep Kit-i (Favorgen). Plasmiidide ja bakmiidide kontsentratsioonid ja puhtus määrati Thermo Scientific NanoDrop 1000 spektromeetriga lainepikkustel 260 ja 280 nm.

Plasmiidide lõikamiseks on valitud järgmised restriктаasid: FD (*Fast Digest*) RruI (pIDC), FD XmaJI (pSPL-IM, pACEBac1, pUCDM-VSVG, pIDC), FD Bsu15I (pIDK, pSPL-IM, pACEBac1), FD MssI (pIDK, pSPL-IM, pUCDM-VSVG), FD NheI (pIMDK-CMV, Gs(X) PCR produkt), Mph1103I (Gs(X) PCR produkt, pIMDK-CMV) ja BstXI (Thermo Scientific). Ligeerimiseks kasutati T4 DNA ligaasi komplekti (Thermo Scientific). Plasmiidide ühildamiseks LoXP järjestuste kaudu kasutati Cre-rekombinaasi (NEB). Geelelektroforeeside tegemisel on kasutatud agarooši (Sigma), Tris-atsetaat- etüleendiamiintetraatsetaat (EDTA) (TAE) puhvrit (1 mM EDTA (Merck), 40 mM Tris

(Sigma), pH 8,3 saavutati 30% äädikhappe (Lachner) lisamisega), etiidiumbromiidi (10 mg/ml), 6X TriTrack laadimisvärvi (Thermo Scientific) ja GeneRuler 1 kb DNA massiredelit (Thermo Scientific). Kõik geelelektrofooresid teostati kasutades Sub-Cell GT süsteemi (Bio-Rad). DNA ilmutamiseks geelis on kasutatud UV-transillumiinatorit (CleverScientific Ltd) ja fragmentide puhastamiseks Silica Bead DNA Gel Extraction Kit-i (Thermo Scientific).

Praimerite disain ja plasmiidide konstrueerimine teostati tarkvara SnapGene abil. pEM705-GsX järjestuse amplifitseerimiseks kasutati Phusion HF (*High-Fidelity*) DNA polümeraasi komplekti (Thermo Scientific) ning praimereid GsX\_NheI\_*forward* ja GsX\_Mph1103I\_*reverse* (eritellimusel, Integrated DNA Technologies, IDT). Punktmutatsioon G<sub>γ</sub>2 geeni järjestuses teostati praimeritega Gamma2\_A12sm\_*forward*, Gamma2\_A12sm\_*reverse*, CMV\_*forward* ja BGH\_*reverse* (IDT) (lisa 4). Kõik PCR-i reaktsioonid viidi läbi termotsükleris Mastercycler Gradient (Eppendorf). Rekombinantsete plasmiidid on sekveneeritud Tartu Ülikooli Genoomika Instituudi tuumiklaboris.

Bakuloviiruste tootmiseks kasutati liblikalise *Spodoptera frugiperda* munasarjakoest eraldatud rakuliini (Sf9) (Invitrogen), transfektsioonireagenti Lipofectamine LTX ja reagenti PLUS (Thermo Scientific), seerumivaba raku söödett Insectagro™ Sf9 (Corning) ja 6-süvendilist rakukasvatusplaati (Nunc). Rakkude arv ja elusrakkude osakaal määrati 0,4% trüpaansinisega (Sigma) ja rakke loendati Bio-Rad TC10™ Automated Cell Counter-l. Viiruste filtreerimiseks kasutati 0,45 µm poori suurusega SFCA (pindaktiivsete ainete vaba tselluloosatsetaat) filtrit (VWR). Bakuloviiruste kontsentratsioon määrati raku diameetri muutusel põhineva meetodiga BioTek Cytation™ 5 plaadilugejaga.

Töös kasutatud viiruseid ekspresseeriti U2OS (inimese osteosarkoomi rakud) rakuliinis (DSMZ). U2OS rakke kasvatati söötmes McCoy's 5A (Sigma) (+ L-glutamiin (Sigma) + 10% FBS (Gibco) + streptomütsiin 0,1 mg/ml (PAA) + penitsilliin 100 U/ml (PAA)). Rakke kasvatati polülüsiiniga kaetud 6-süvendilistel rakukasvatusplaatidel (Nunc). Rakkude lahtivõtmiseks kasutati 0,125% trüpsiini-EDTA (Sigma) lahust. Rakkude infekterimisega sisaldas naatriumbutüraati (1 mM) (Sigma). Rakukultuuri rutiinseteks vaatlusteks kasutati Olympus CKX31 mikroskoopi.

Kõik katsed ligandide mõju ja cAMP taseme hindamiseks teostati U2OS rakkudes plaadilugejaga PHERAstar™ (BMG Labtech) 96-süvendilises läbipaistva lameda põhjaga mustas rakukasvatusplaadis (Corning). Kõik mõõtmised teostati fosfaatpuhverdatud soolalahuses (DPBS), mis sisaldas Ca<sup>2+</sup> ja Mg<sup>2+</sup> ioone (Corning). Töös kasutatud ligandid: forskolin (Tocris), 3-isobutüül-1-metüülksantiin (IBMX) (Tocris), 5'-N-etiülkarboksamidoadenosiin (NECA) (Tocris), apomorfiin (Tocris), noradrenaliin (Sigma),

GABA(Sigma) ja Baclofen (Sigma). Ligandide varulahuste valmistamisel vastavalt vajadusele on kasutatud DMSO-d (AppliChem) või Milli-Q vett (Millipore Milli-Q, 18 M $\Omega$ /cm).

Mikroskoopiakatsetes kasutati 8-süvendilisi kambreid (Imaging Chamber CG, Zell-Kontakt). Rakkude fikseerimiseks kasutati 3% gliüksaali (Sigma Aldrich) lahust 20%-lises etanoolis, mille pH oli viidud 4,5-ni äädikhappe lisamisega (Sigma Aldrich). Ülejäänud gliüksaali pleegitamiseks kasutati 100 mM NH<sub>4</sub>Cl lahust ja lisati ibidi paigalduslahust (Ibidi). GABA<sub>B</sub> retseptorite märgistamiseks kasutati SNAP-Surface 649 (NEB) DMSO lahuses. Biosensori tase rakus jäädvustati Cytation 5 (BioTek) mikroplaadilugejasse sisseehitatud fluorestsentsmikroskoobiga. Kõik teised mikroskoopiapildistamised tehti kasutades Till iMIC (Till Photonics/FEI) invertteeritud mikroskoobiga.

#### 4.2 Rekombinantsete bakmiidide loomine

Kõik lähteplasmide sisaldavad rakud (glütserooli varus, *stock*) (sõltuvalt kas DH5 $\alpha$  või pirHC rakuliinis) kanti selektsiooniplaadile vastava antibiootikumiga: pEM705-Gs(X) (ampitsilliin), pIDK (kanamütsiin), pSPL-IM (spektomütsiin), pACEBac1 (gentamütsiin), pUCDM-VSVG (klooramfenikool) ja pIDC (klooramfenikool). Plaate inkubeeriti 24 t 37 °C juures. Plaadilt eraldati kolooniad ja kasvatati LB söötmes sobiva antibiootikumiga 37 °C juures 16 t. Bakterisuspensioon tseentrifugeeriti (14 000 g, 1 min), lüüsi ja plasmiidid puhastati lüsaadist Favorgen Midiprep Kit-ga vastavalt tootja protokollile. DNA puhtus ja kontsentratsioon on siin ja edaspidi määratud spektromeetriga NanoDrop 1000 lainepikkustel 280 ja 260 nm.

Kimäärsete G-valkude järjestuste amplifitseerimiseks pEM705-Gs(X) plasmiididest teostati PCR. Reaktsioonisegu sisaldas lähteplasmidi, Phusion HF DNA polümeraasi komplekti ning praimereid GsX\_NheI\_*Forward* ja GsX\_Mph1103I\_*Reverse*. Seejärel viidi reaktsioon läbi termotsükleris, ning teostati agaros-elektrofoores produktide suuruste kontrollimiseks. Produktide visualiseerimiseks geelis kasutati UV-transilluminaatorit etiidiumbromiidi (1  $\mu$ g/ml) juuresolekul. Amplifitseeritud järjestuse otsad lõigati ensüümidega FD Mph1103I ja FD NheI, ning ühildati samade ensüümidega pIMDK-CMV plasmiidiga (aktseptor). pIMDK-CMV järjestus on saadud plasmiidide pIDK ja pSPL-IM ühildamisel ensüümidega Bsu15I ja MssI. Ka edaspidi on aktseptorplasmiid eelnevalt defosforüleeritud FastAP fosfataasiga vastavalt tootja protokollile, et vältida aktseptorplasmidi ühildumist endaga. Kõikide töös kasutatud FD ensüümide töötemperatuur on 37 °C ja inkubatsiooni aeg ligikaudu pool tundi.

Ülejäänud lähteplasmide lõigati ensüümidega vastavalt skeemile, mida on kujutatud joonisel 4. Lõigatud fragmentid lahutati agaros-elektroforeesil, õige pikkusega fragmendid lõigati välja ja puhastati vastavalt FavorPrep GEL/PCR Purification Kit protokollile. Puhastatud produktid ligeeriti T4 DNA ligaasiga vastavalt tootja protokollile ja ligeeritud produkt transformeeriti kompetentsetesse pirHC või DH5 $\alpha$  (vastavad ori-piirkonnale) rakkudesse kuumašoki teel. Kuumašokk viidi läbi 35 s jooksul 42 °C vesivannis, peale mida asetati rakud 5 min jääle ja seejärel lisati toasooja SOC söödet ning inkubeeriti 6 t 37 °C juures horisontaalses asendis, loksutamiskiirusega 250 rpm (ELMI DOS-10M Digital Orbital Shaker). Transformeeritud rakud selekteeriti agar-plaatidelt vastava antibiootikumi resistentsuse alusel.

Kasutades Cre-rekombinaasi ühendati genereeritud plasmiidid, et saada pEmpty-VSVG-Gs(X)-H187 produktid (kokku 9 plasmidi) (Joonis 4). Ühildatud plasmiid transformeeriti kompetentsetesse DH5 $\alpha$  rakkudesse kuumašoki teel. Selekteerimiseks kasutati plaate, mis sisaldasid antibiootikume spektinomütsiin (50  $\mu$ g/mg), klooramfenikool (25  $\mu$ g/ml), gentamütsiin (7  $\mu$ g/ml) ja kanamütsiin (50  $\mu$ g/ml) LB kasvusöötmes. Puhastatud plasmiididega teostati restriksioonanalüüs ensüümidega NheI ja MunI vastavalt tootja protokollile.

Rekombinantsete bakmiidide loomiseks transformeeriti 200 ng eelnevalt genereeritud MultiBac plasmiidid kompetentsetesse E.coli tüve DH10MultiBac rakkudesse. Seleksiooniks kasutati plaate, mis sisaldasid antibiootikume kanamütsiin 50  $\mu$ g/ml, tetratsükliin 10  $\mu$ g/ml, gentamütsiin 7  $\mu$ g/ml ning sini-valge koloonia seleksiooniks vajalikke ühendeid X-Gal 100  $\mu$ g/ml ja IPTG 40  $\mu$ g/ml. Plaat inkubeeriti 24 t 37 °C juures. Sini-valge seleksioon võimaldas eristada kolooniaid, mis ei sisalda soovitud geenijärjestust (sinised), huvipakkuvatest (valged). Rekombinantsete bakmiidid eraldati bakteritest MidiPrep Kit-iga vastavalt tootja protokollile.

#### 4.3 Bakuloviiruste tootmine Sf9 rakkudes ja kontsentratsiooni määramine

Bakuloviiruste tootmiseks kasutati Sf9 rakuliini, mida kasvatati spetsiaalsetes rakukasvatus-Erlenmeyer'i kolbides, seerumivabas rakusöötmes Insectagro™ Sf9, temperatuuril 27 °C ja CO<sub>2</sub>-vabas keskkonnas. Rakkude loendamiseks segati rakud esmalt 0,4% trüpaansinisega suhtes 1:1 ning rakkude koguarv (sh ka elusrakkude osakaal) määrati läbivalt kogu töös Bio-Rad TC10 Automated Cell Counter-iga. Putukarakkude transfekteerimiseks lisati esmalt rakud 6-süvendilisele rakukasvatusplaadile kontsentratsiooniga 0,6 mln rakku süvendis. 6-süvendilisele rakukasvatusplaadile lisatud

rakke inkubeeriti 24 t. Inkubeerimisjärgne transfekteerimine viidi läbi vastavalt transfektsioonireagendi Lipofectamine LTX ja reagendi PLUS transfektsiooniprotokollile. Transfekteeritud rakke inkubeeriti kolm kuni viis päeva, mille jooksul jälgiti nakatumismärke: rakkude elumuse vähenemine, diameetri kasv ning rakukasvatusplaadi täituvus. Süvendist kogutud tõstearvuga  $P_0$  (*passage*) viiruse edasiseks amplifitseerimiseks lisati viiruslahust 10 ml-le aktiivses kasvufaasis olevate rakkude suspensioonile (1 mln rakku/ml).  $P_1$  viirus koguti rakkude 50%-lise või madalama elumuse juures. Viiruse kogumiseks tsentrifugeeriti rakkususpensiooni 10 min 3000 rpm juures (CM6.03 tsentrifuug), mille järel filtreeriti pealisklahus läbi 0,45  $\mu\text{m}$  poori suurusega SFCA filtri. Kogutud viiruseid säilitati valguskindlalt 4 °C juures. Edasisteks katseteks optimaalse viiruse kontsentratsiooni saavutamiseks amplifitseeriti  $P_1$  viirused vajadusel kõrgema tiitriini.

Viiruste tiitri leidmiseks lisati Sf9 rakud 24-süvendi rakukasvatusplaadile Insectagro™ Sf9 söötmes (0,2 mln rakku/süvend). Rakkude kinnitumiseks inkubeeriti plaati pool tundi. Viirusest valmistati üksteist kolmekordset seerialahjendust Insectagro™ Sf9 söötmes. Seejärel lisati rakkudele viiruste lahjendused ja tühiproov (ainult sööde) duplikaatidena ja inkubeeriti 24 t. Igast süvendist tehti erinevatest kohtadest 4 pilti kasutades Cytation™ 5 plaadilugejat. Saadud piltide põhjal kasutati nakatamisjärgse rakkude diameetri suurenemise mõõtmiseks Apareciumi tarkvara ICSE tööriista (Laasfeld et al. 2017). Koostati eksperimentaalandmete graafik rakkude diameetri sõltuvuse kohta viirusosakeste kontsentratsioonist (lahjendusfaktorist). Kaheparameetrilise logistilise funktsiooni regressioonianalüüsil leiti  $EC_{50}$  väärtused ehk pool maksimaalsest efektiivsest viirusosakeste kontsentratsioonist.  $EC_{50}$  väärtus on (valem 1) kaudu seotud viiruse kontsentratsiooniga  $c$ , millest omakorda saab arvutada MOI-indeksi valem 2 põhjal.

$$c = \frac{N}{2 \cdot EC_{50} \cdot V} \text{ (Valem 2)}, \quad c = MOI \cdot \frac{N}{V} \text{ (Valem 3)}$$

kus  $c$  on viiruse kontsentratsioon ühikutes ivp/ml (nakatusvõimeliste viirusosakeste arv/ml),  $N$  on rakkude arv süvendis nakatamise alghetkel,  $V$  on lahusti ruumala süvendis ja  $EC_{50}$  väärtus on pool maksimaalsest efektiivsest viirusosakeste kontsentratsioonist (Laasfeld *et al.* 2017).

#### 4.4 MultiBacMam süsteemi valideerimine imetajarakkudes

##### 4.4.1 Geeniülekanne imetajarakkudesse

Kõik imetajarakkude nakatamised bakuloviirustega viidi läbi sarnasel viisil; esmalt lisati U2OS rakud 6-süvendilisele plaadile kasvamiseks sobivas söötmes kuni süvend oli

täitunud ligikaudu 70%. Sööde asendati infekterimisseguga (2 ml), mis sisaldas naatriumbutüraati (1 mM), MultiBacMam viirust (kuni 200 µL, milles MOI varieerus vahemikus 2 – 20) ja vastavat söödet mahuni. Rakke inkubeeriti 37 °C juures 24 t, 5%-s CO<sub>2</sub> keskkonnas. Rakud pesti kaltsiumi- ja magneesiumivaba DPBS puhvriga ja võeti lahti 0,125% trüpsiin-EDTA lahusega. Igas katses oli olemas kontrollproov, kuhu viirust ei lisatud.

#### 4.4.2 Fluorestsentspektroskoopia ja -mikroskoopia mõõtmised

##### 4.4.2.1 cAMP taseme mõõtmine imetajarakkudes

Rakususpensioon lisati söötmes mustale läbipaistva põhjaga 96-süvendilisele rakukultuuri plaadile (100 µL süvendi kohta) ja inkubeeriti 24 t. Pool tundi enne mõõtmist eemaldati sööde ja loputati DPBS puhvriga. Igasse süvendisse lisati 90 µL DPBS puhvrit. Mõõtmised teostati PHERAstar (BMG) plaadilugejaga fokaalkõrgusel 4,5 mm ja temperatuuril 25 °C. Detektori võimendust varieeriti vastavalt katsele, aga ühes katseseerias säilitati konstantne võimendus. Biosensorit ergastati, kasutades optilisi filtreid, lainepikkusel 427 ± 10 nm ja intensiivsusi mõõdeti emissioonikanalites 530 ± 10 nm ja 480 ± 10 nm. Enne ligandide lisamist teostati vähemalt viis mõõtmistsükli, mida kasutati tausta korrektuuriks, ja seejärel lisati 10 µL retseptori spetsiifilist ligandi või forskolini lahjendust. Tulemuste analüüsil ja graafilisel esitamisel kasutati andmetöötlusprogrammi GraphPad Prism 5.0. FRET-i efektiivsus arvutati vastava valemiga:

$$\Delta FRET = \frac{\frac{I_{t=0}^{530 \text{ nm}}}{I_{t=0}^{480 \text{ nm}}} - \frac{I^{530 \text{ nm}}}{I^{480 \text{ nm}}}}{\frac{I_{t=0}^{530 \text{ nm}}}{I_{t=0}^{480 \text{ nm}}}} \quad (\text{Valem 4})$$

kus  $I_{t=0}^{530 \text{ nm}}$  ja  $I_{t=0}^{480 \text{ nm}}$  on intensiivsused vastavalt kollases ja sinises emissioonikanalis enne ligandide lisamist.  $I^{530 \text{ nm}}$  ja  $I^{480 \text{ nm}}$  on intensiivsused vastavates kanalites teatud ajahetkel.

##### 4.4.2.2 GABA<sub>B</sub> retseptori fluorestsentsmärgistamine

Eelnevalt lisati rakud söötmes 8-kambrilisele mikroskoopiaplaadile (40 000 rakku/süvend) ja inkubeeriti 24 t. SNAP-märgise märgistamiseks fluorestseeruva substraadiga SNAP-Surface 649, valmistati esmalt substraadi lahus DMSOs (1 mM). Rakkude märgistamiseks lahjendati SNAP-Surface 649 lahust vahetult enne lisamist rakusöötmes (lõppkontsentratsioon 2,5 µM). Enne lisamist pesti rakke kolm korda DPBS-ga ja seejärel lisati 100 µL süvendi kohta substraadi lahust. Rakke inkubeeriti pool tundi 37 °C juures. Seejärel pesti hoolikalt substraadilahus rakkudelt maha DPBS-ga ja lisati 400 µL süvendi kohta DPBSi.

Rakkude morfoloogia säilitamiseks pikaajaliste mikroskoopia mõõtmiste vältel fikseeriti imetajarakud glüoksaali lahusega. Fikseerimissegu valmistamiseks kasutati 3% glüoksaali (Sigma Aldrich) lahust 20%-lises etanoolis, mille pH oli viidud 4,5-ni äädikhappe lisamisega. Rakke inkubeeriti fikseerimissegus esmalt 30 minutit jääl, millele järgnes inkubeerimine 30 minutit toatemperatuuril. Seejärel pesti rakud DPBS lahusega. Ülejäänud glüoksaali pleegitamiseks kasutati 100 mM NH<sub>4</sub>Cl lahust DPBSs, mis toimus 20 min jooksul toatemperatuuril. Rakud pesti seejärel DPBS lahusega ja lisati säilitamiseks kolm tilka ibidi paigalduslahust.

Bakuloviiruste transfekteerimise efektiivsuse jäädvustamiseks viidi mikroskoopiapildistamine läbi Cytation 5 (BioTek) mikroplaadilugejasse sisseehitatud fluorestsentsmikroskoobiga, kasutades GFP filterkuubikut, GFP LEDi ning 10x ja 4x objektiivi. Ülejäänud mikroskoopiapildistamised tehti kasutades Till iMIC (Till Photonics/FEI) inverteeritud mikroskoopi, mis oli varustatud TIRF APON 60x õli (NA 1,49) ja UPLSAPO 20x õli (NA 0,85) objektiividega (Olympus Corp.). Elavatele imetajarakkudele naturaalse elukeskkonna tagamiseks on mikroskoopi sisse ehitatud kamber, milles hoitakse temperatuur 37 °C juures ning 5%-e CO<sub>2</sub> sisaldusega. Proovid ergastati järjestikku PhoxX laserdiodidega (Omicron-Laserage), mis olid kombineeritud SOLE-6 laserkombainerisse (Omicron-Laserage): 445 nm (100 mW) (mTurquoise2), 515 nm (80 mW) (cp173Venus tandem) ja 638 nm (150 mW) (SNAP-Surface 649). Ergutusvalgus suunati Yanuse skaneerimispeale (*scan head*), mida koos Polytrope'i galvanomeetrilise peegli (Till Photonics/FEI) kasutati laseri positsioneerimiseks laivälja epifluorestsents mikroskoopiaks. Ergastus- ja emissioonvalgus eraldati spektraalselt pildistusfiltri kuubikutega, mis sisaldasid kiirtejagajat zt405/488/561/640rpc või zt 442/514/561 TIRF ja emissioonfiltrit ET 405/488/561/640TIRF või ZET 442/514/561m TIRF (Chroma). Lisaks kasutati rakupiiride määramiseks heleda välja kanalit. Pildistamiseks kasutati elektronmultiplikaatoriga (EM) laengupõhist kaamerat iXon Ultra 897 (Andor Technology), mis paigaldati mikroskoobi külge 2-kordse suurendusega TuCam-adapteri (Andor Technology) abil. Kaamerat jahutati -100 °C-ni vedeliku ringluskütte Oasis 160 (Solid State Cooling Systems) abil. Kõik mõõtmised viidi läbi kaheksast süvendites koosnevates CG kambrites ja vähemalt viis valitud piirkonda iga süvendi kohta jäädvustati 16-bitise OME-TIFF multivärviliste Z-pakkidega (*Z-stack*) (100 kaadrit, 200 nm piesofookuse sammuga 60× objektiivi puhul või 500 nm sammuga 20× objektiivi puhul). Ekspositsiooni aeg oli 20 ms ja EM-võimendus 300. Erinevate fluorestsentsvärvide puhul varieeriti laseri võimsust, et võimaldada optimaalset

signaalitaset (tagati kanalites tuvastatava ristsignaali puudumine). Iga fluorestseeruva ligandi/värvi puhul tehti kaks sõltumatut katset.

#### 4.5 Andmete töötlus ja visualiseerimine

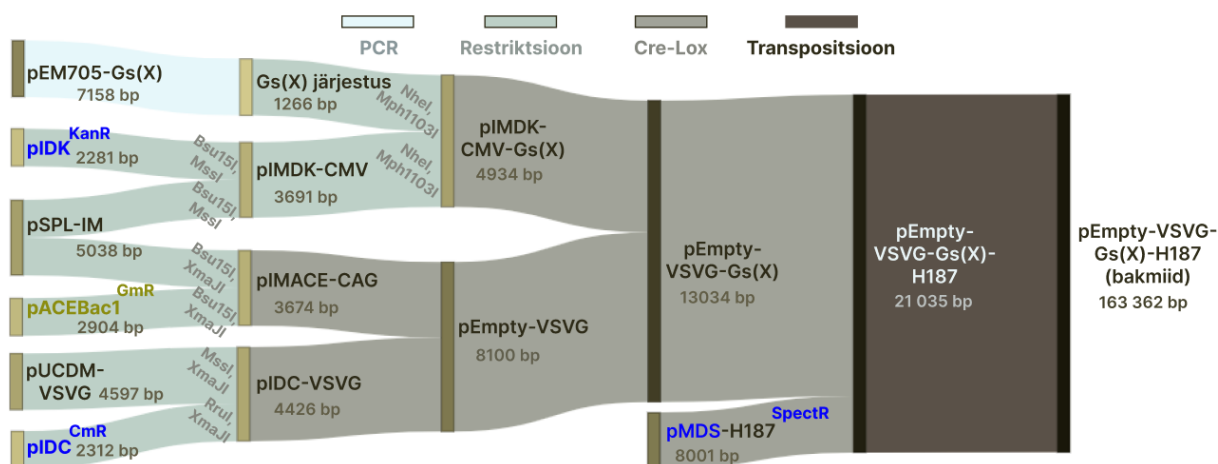
Mittelineaarseteks regressioonanalüüside ja andmete visualiseerimiseks kasutati GraphPad Prism 5 programmi. Piltide analüüsiks kasutati vabavaralist programmi ICY. Laivälja epifluorestsentsi Z-pakid dekonvolveeriti EpiDEMICi plugin-ga (Soulez et al. 2012). Jooniste tegemisel on kasutatud Biorenderi keskkonda

## 5 TULEMUSED JA ARUTELU

### 5.1 MultiBacMam süsteemi loomine

GPCR-de uurimiseks on Tartu Ülikooli Bioorgaanilise keemia õppetoolis loodud modifitseeritud MultiBacMam tehnoloogial (Geneva Biotech) põhinev plasmiidide raamatukogu. Raamatukokku kuuluvaid plasmide on võimalik kasutada eraldiseisvalt või omavahel kombineerituna, et ekspresseerida soovitud valke imetaja- või putukarakkudes. Eesmärk on avardada võimalusi GPCR-de uurimiseks ja muuta uute meetodite integreerimist võimalikult lihtsaks. Töö käigus on laiendatud plasmiidide raamatukogu kimäärsete G-valkude koguga, mis on ühildatud cAMP-biosensoriga ja VSVG valguga. Antud kogumiku plasmide saab efektiivselt kombineerida teiste vektoritega raamatukogus (nt retseptorite järjestustega) LoxP elementide abil.

Kombineerimise teevad võimalikuks MultiBacMam süsteemi kuuluvad doonorplasmiidid (pIDK, pIDC, pMDS ja nende tuletised), mis sisaldavad resistentsusmarkereid selektsiooniks ja LoxP elemente. Doonorplasmiididega ühildati huvipakkuvate valkude geenijärjestused: Gs(X) (kaheksa kimäärset valku ja metsiktüüp), Epac-S<sup>H187</sup> ja VSVG. Selleks, et oleks võimalus avaldada kimäärseid G-valke ka putukarakkudes, on Gs(X) järjestused viidud hübriidpromootori alla (võetud pSPL-IM plasmiidist). Mida suuremaks muutuvad plasmiidid, seda keerulisem on neid ühildada restriksiooni ja ligeerimise teel. Seetõttu suurte plasmiidide tõhusaks ühildamiseks on kasutatud Cre-LoxP saite. Kõik rekombinantsed doonorplasmiidid liideti seejärel Cre-LoxP järjestuste kaudu aktseptorplasmiidiga pIMACE-CAG, mis sisaldas bakmiidide loomiseks transpositsioonelemente Tn7L ja Tn7R (Joonis 4).

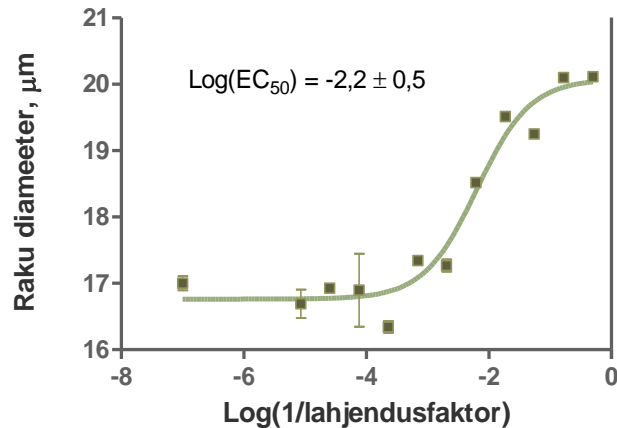


**Joonis 4. Ülevaade kogumiku loomisest.** Sinise ja kollase kirjaga on vastavalt tähistatud MultiBacMam süsteemi doonor- ja aktseptorplasmiidid koos resistentsusmarkeritega. Erinevate taustvärvidega on välja toodud meetod, mida kasutati kas järjestuse eraldamiseks või plasmidi ühildamiseks. Restriksiooni korral on eraldi välja toodud ka kasutatud restriктаasid, kasutati järjestuse eraldamiseks. Iga plasmidi nime all on toodud ka lõplik suurus.

Enne bakmiidide loomist tagati, et on saadud rekombinantne plasmid, mis sisaldab kõiki vajaminevaid järjestusi: VSVG, H187 ja Gs(X). Töö käigus veenduti esmalt iga vahepealse järjestuse korrektsuses restriksioonianalüüsiga. Kriitiline oli pärast Cre-Lox kombineerimist kindlaks teha, et ei oleks liitunud mitu aktseptorplasmidi, mis võimaldaks soovimatute geenijärjestuste transpositsiooni bakmiidi. pEmpty-VSVG-Gs(X)-H187 plasmiidide kontrolliks valiti restriктаasid NheI ja MunI, mille lõikeproduktide suurused kinnitavad järjestuse korrektsust (lisa 5). Plasmiidide kombineerimisel LoxP järjestuste kaudu esineb sageli olukord, kus liidetaval plasmiidil on rohkem kui üks LoxP sait kuhu liituda. Tekivad mitteidentsed järjestused, millest loodud viirused on funktsionaalselt samasugused. Täpsed ühildatud plasmiidide järjekorrad on toodud lisa 6. Saadud ühildatud plasmide kasutati edasi bakmiidide loomiseks. Plasmiidid transformeeriti bakterirakkudesse, kus järjestus integreeriti DH10MultiBac genoomi. Selekteeritud bakteritest puhastatud bakmiide sai kasutada bakuloviiruste tootmiseks. Kokku on saadud üheksa uut bakuloviirust.

## 5.2 Genereeritud bakuloviiruste kontsentratsiooni määramine

Selleks, et tagada edaspidistes katsetes korratavad nakatamistingimused, määrati viiruste kontsentratsioonid ehk tiitrid. Kasutades ICSE meetodit, on kokku määratud tiiter kaheksal GsX kodeerival viirusel, metsiktüüpi Gs ja GABA<sub>B</sub>-SNAP viirusel. Joonisel 5 esitatud graafik – raku diameetri sõltuvus viiruse kontsentratsioonist, on näide eksperimentaalandmete graafikust, millelt määrati EC<sub>50</sub> väärtus. Kokku on tiitrid määratud kümnel viirusel, mille EC<sub>50</sub> väärtuse kaudu arvutatud viiruste kontsentratsioonid on esitatud tabelis (lisa 7). Edasiste katsete vajadusteks imetajarakkudega amplifitseeriti viiruste kontsentratsioonid tasemini, kus putukasöötme osakaal nakatamissegus oleks võimalikult väike, sest imetajarakud on häiritud putukasöötme suurest mahust, mis kaasneb bakuloviiruse lisamisega. Antud töös olid viirused amplifitseeritud kontsentratsioonini, mis võimaldaksid kasutada imetajarakkude katsetes MOI-d vähemalt 20.



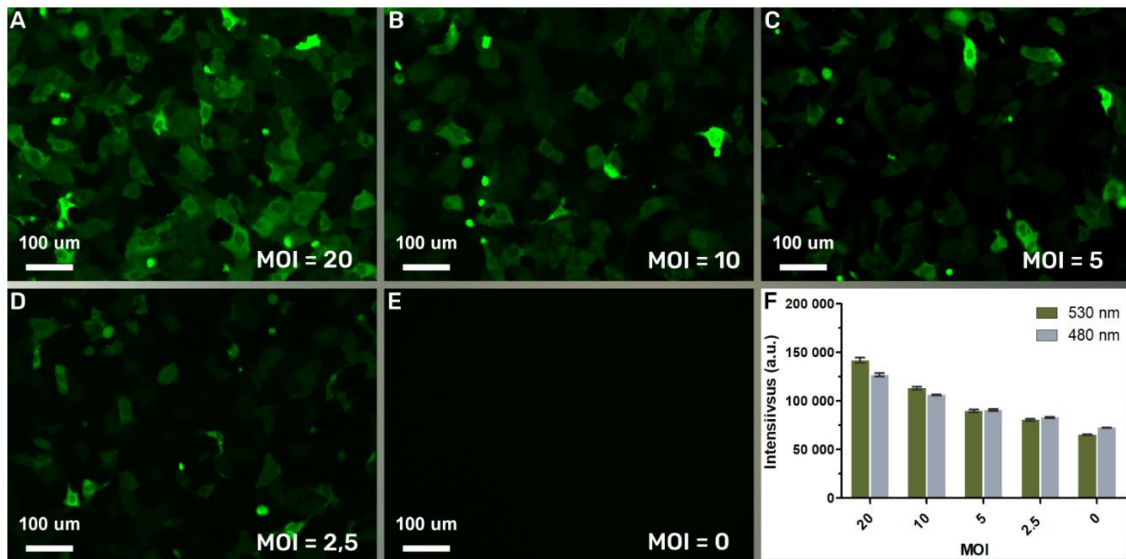
**Joonis 5. Sf9 rakkude diameetri sõltuvus viiruse kontsentratsioonist.** Toodud on näitlik pEmpty-VSVG-Gst-H187 P2 kontsentratsiooni määramise eksperimentaalandmete graafik, millelt leiti  $EC_{50}$  väärtus. Katsepunktid on keskmine duplikaatide väärtus ja veajooned näitavad aritmeetilise keskmise standardhälvet.

### 5.3 Biosensori tase ja jaotus U2OS imetajarakkude populatsioonis

Pärast bakuloviiruste tootmist oli võimalik süsteemi funktsionaalsuses veenduda imetajarakkudes. Toetudes varasemale kogemusele ja kirjanduse andmete, sobib MultiBacMam süsteemi nakatamiseks kasutada erinevates (kui mitte enamikes) imetajarakkude liinides, milles ka antud töö käigus veenduti: prooviti valke ekspresseerida SKOV-3 kui ka CHO-K1 rakuliinis, mis õnnestus. Töö käigus on aga tähelepanu all U2OS rakuliin, sest nendes rakkudes on sobilik valik erinevaid endogeenseid GPCR-e (Harding et al. 2022).

Enne ligandide põhjustatud retseptorite aktivatsiooni uurimist, tuvastati mikroskoopiliste vaatlusega milline on biosensori jaotus rakukultuuris ja kuidas spektroskoopilise signaali tugevus sõltub viirusosakeste arvust (MOI). Teostati katse U2OS rakkudes, millele lisati erinevates kogustes pEmpty-VSVG-Gs15-H187 viiruse lahjendust. Näitena on esitatud Gs15 konstrukti tulemused. Sarnast käitumisprofiili on märgatud ka teiste viirustega. Cytation 5 plaadilugejaga tehtud pildid rakukultuurist kinnitavad biosensori ekspressiooni rakkudes. Biosensori jaotus kultuuris on suurel määral homogeneenne üksikute eranditega, kus biosensor on rakus üle ekspresseeritud. Arvatavasti on üksikutele rakkudele sattunud bakuloviiruse agregaadid, mis tekivad viiruse säilitamisel. Kui teatud katse nõuab homogeensemata jaotust, siis lähtudes varasemast kogemusest, on neid agregate võimalik lihtsasti eemaldada, ekstruudides enne nakatamist viiruslahust. Mikroskoopia tulemuste põhjal saab väita, et rakkude nakatamine toimub väga efektiivselt, mis läheneb 100%-lisele

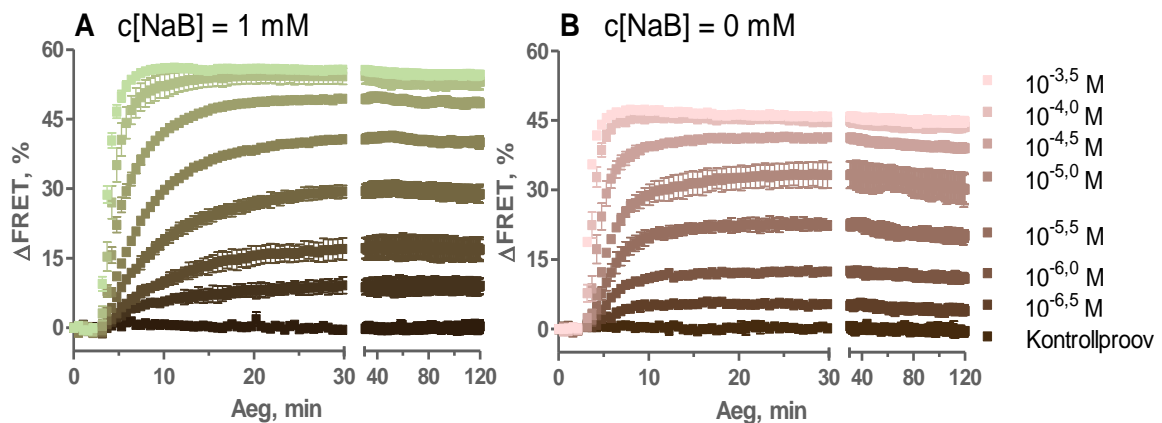
efektiivsusele MOI tõstmisel (joonis 6A-E). Võib eeldada, et nähtus on tingitud VSVG esinemisega pungunud bakuloviiruse pinnal. Rakkudes on teatud cAMP-i nivoo juba enne ligandide lisamist. Kuna antud katses pole cAMPi ligandide mõjul produtseeritud, näitavad spektrokoopilised mõõtmised PHERAstar-ga loomulikku signaali taset võrreldes nakatamata rakkudega (joonis 6F). Sellise basaalse taseme juures on võimalik saavutada vähemalt 10-kordne kasv signaali amplituudis võrreldes varasemate tulemustega antud bioorgaanilise keemia töörühmas (Laaneväli 2020).



**Joonis 6. Biosensori Epac-S<sup>H187</sup> tase ja jaotus U2OS rakukultuuris.** A – D: bakuloviirusega pEmpty-VSVG-Gs15-H187 nakatatud U2OS rakud ja kontrollproov (E), kus on nakatamata rakud (epifluorestsentsmikroskoopiapildid rohelises kanalis (Cytation 5 GFP filtrite komplekt ja 460 nm LED valgustus)); F: plaadilugejas PHERAstar mõõdetud intensiivused emissioonikanalites 530 ja 480 nm.

Ekspressioonitaseme tõstmiseks imetajarakus on levinud praktika kemikaalide, nagu naatriumbutüraat, lisamine. Naatrium butüraati toodab loomulikult inimese soolestiku mikrobiom ja võib mängida olulist rolli soolevähi ennetusel ja ravis, mida seostatakse vähirakkude apoptoosi esilekutsumisega. Kuigi täpne mehhanism on tundmatu, on butüraadil palju rakulisi sihtmärke, mis mõjutavad erineval määral eelkõige vähirakkude kasvu, arengut ja surma (Xu et al. 2017; Wang et al. 2020). Nendel põhjustel võib naatrium butüraat kujuneda väga segavaks faktoriks rakuliste protsesside, eriti apoptoosi, uurimisel. Paraku on rajanedes kogemusele, raske tagada efektiivne viiruslike geenide ülekande imetajarakkudes ilma butüraadita. Seetõttu oli üks töö eesmärkidest tõestada, et VSVG abiga on võimalik imetajarakke efektiivselt nakatada ka ilma butüraadita.

Nakatamise efektiivsuse mõõtmiseks nakatati U2OS rakke pEmpty-VSVG-Gs-H187 viirusega (MOI = 5), mis võimaldaks selgitada antud viiruse potentsiaali katsete jaoks, kus G $\alpha$ s allühikute hulk rakus on madalam. Madalam endogeensete G $\alpha$ s allühikute hulk teatud rakuliinides võib märgatavalt raskendada cAMP taseme mõõtmist. Ainult ühele transfektsioonisegule lisati võrdluseks naatrium butüraati (1 mM). Pärast rakkude nakatamist teostati mõõtmine forskolini lahjendustega, mis otseselt aktiveerib adenülaadi tsüklaasi ja tõstab cAMP-i taset retseptoritest sõltumatult. Saadud signaal on esitatud FRET-i efektiivsusena. Graafiku 7A ja B võrdlusest on näha, et kuigi naatrium butüraadiga on võimalik saavutada suurem signaali amplituud, on signaal ilma butüraadita sarnaseks rakenduseks samaväärne ja on võimalik saavutada väga hea signaal-müra suhe. See on silmapaistev areng võrreldes varasema BacMam süsteemiga, mida polnud võimalik kasutada ilma naatrium butüraadita. Varieeruvus katses on võrdlemisi väike ja pärast esialgset tõusu läheneb signaal kindlale nivoole, mis püsib stabiilsena isegi pärast kahte tundi. Järeldub, et biosensor on rakkudes väga stabiilne ja pidev ergastamine ei vähenda biosensori funktsionaalsust, mis võimaldab pikaajalisi katseid läbi viia.



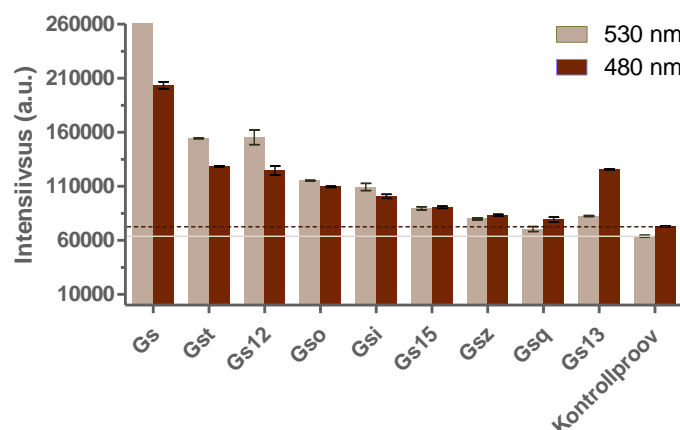
**Joonis 7. Nakatamise efektiivsus koos ja ilma naatrium butüraadita.** Forskolini efekt U2OS rakkudes, kus on lisatud nakatamisel viirusega pEmpty-VSVG-Gs-H187 naatrium butüraati (A) võrreldes rakkudega, kus transfekteerimissegus butüraat puudus (B). Katsetulemustele teostati baasjoone korrektuur ja on graafikul esitatud duplikaatide keskmistena, kus veajooned näitavad duplikaatide varieeruvust.

#### 5.4 Kimäärsete G-alkude avaldamise mõju cAMP-i signaalile

Kui eelnevalt tõendati, et bakuloviirustega saab väga efektiivselt rakke nakatada, oli võimalus veenduda, et ka koos kimäärsete G-alkudega antud biosensor toimib. Teostati katse, kus kõikide pEmpty-VSVG-Gs(X)-H187 viiruste MOI oli nakatamisel 5. Antud MOI

juures on enamasti võimalik saada piisav signaali tase, aga viiruse madalam kogus tagab, et imetajarakkude homöostaasis ei toimu suuri muutusi ja kulutatakse ära vähem viirust. Nakatamisjärgselt mõõdeti basaalsel cAMP-i taset U2OS rakkudes. Selgub, et sarnase MOI juures annavad erinevad konstruktid suure erinevuse basaalsignaalis (joonis 8). Gsq konstrukti signaali tase ei olnud väga kõrge, aga mikroskoopiliselt kinnitati, et biosensorit ekspresseeriti. Enne kasutamist tuleb veel teostada Gsq viiruse täiendav amplifitseerimistsükkel. Antud variatsioon võib olla üksnes tingitud viiruse tiitri määramise täpsusest ja konkreetsetes rakendustes tuleb eelnevalt kindlasti teostada optimeerimine.

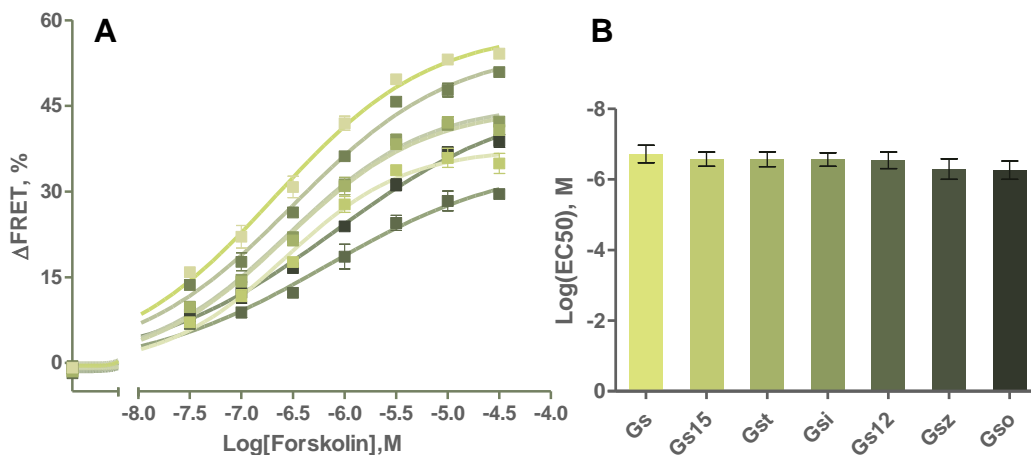
Sageli on informatiivne vaadelda signaale kahes emissioonikanalis eraldi. Intensiivsuste põhjal on näiteks võimalik hinnata kui suur osa biosensoritest rakus on küllastunud cAMP-ga: kõrge signaal sinises kanalis (480 nm) võrreldes rohelisega (530 nm) võiks viidata, et suurem osa biosensoritest on juba cAMP-ga küllastunud ja cAMP-i kontsentratsiooni kasv signaalis oletatavalt ei kajastu. Selle nähtuse esindav näide on Gs13 konstrukti avaldamine imetajarakkudes (joonis 8). Sellisel juhul saab pakkuda, et biosensor on küllastunud, sest isegi IBMX-i (fosfodiesteraasi inhibiitori) ega forskolini lisamine, mis on tavaline praktika cAMP taseme tõstmiseks, ei suurendanud signaali amplituudi. See lubab oletada, et rakuliinis on kõrge basaalse aktiivsusega retseptorid, pidevalt aktiveeritud sisemiste faktorite poolt, mis ei edasta signaali läbi endogeensete Gs allühikute vaid läbi kimäärse Gs13 allühiku. Antud signaalrada on võrdlemisi vähe uuritud, seetõttu on märkimisväärne, et antud meetodiga saab jälgida Gs13 vahendatud aktivatsiooni, mis üldiselt jääks märkamatuks. Seda hüpoteesi oleks edaspidi huvitav kontrollida ka teistes rakuliinides.



**Joonis 8. Erinevate kimäärsete G-valkude avaldamise mõju signaali amplituudile.**

Esitatud on signaali intensiivsus sinises (480 nm) ja rohelises (530 nm) kanalis. Antud on ühe katse duplikaatide keskmised väärtused, veajooned näitavad duplikaatide varieeruvust.

Veenduti, et ülejäänud konstrukte (peale Gsq ja Gs13) sobib kasutada cAMP-i taseme mõõtmiseks. Iga konstrukti puhul valiti MOI (nt Gst-d kasutati MOI-ga 10), mille juures oli tagatud piisav ekspressioon kus biosensori tase oli katsele vastav. Mõõdeti aktivatsiooni erinevate forskolini lahjendustega ning mõõdetud signaal on esitatud FRET-i efektiivsusena. Joonisel 9A on toodud FRET-i efektiivsuse sõltuvus forskolini kontsentratsioonist (doos-vastus kõver), millele on teostatud kolmeparametiline logistiline regressioon. Nähtub, et EC<sub>50</sub> väärtus ei sõltu kimäärse G-valgu avaldamisest (joonis 9B). Seitse konstrukti annavad hea tundlikuse forskolinile ja nendega on võimalik uurida aktivatsiooni ka läbi retseptorite.

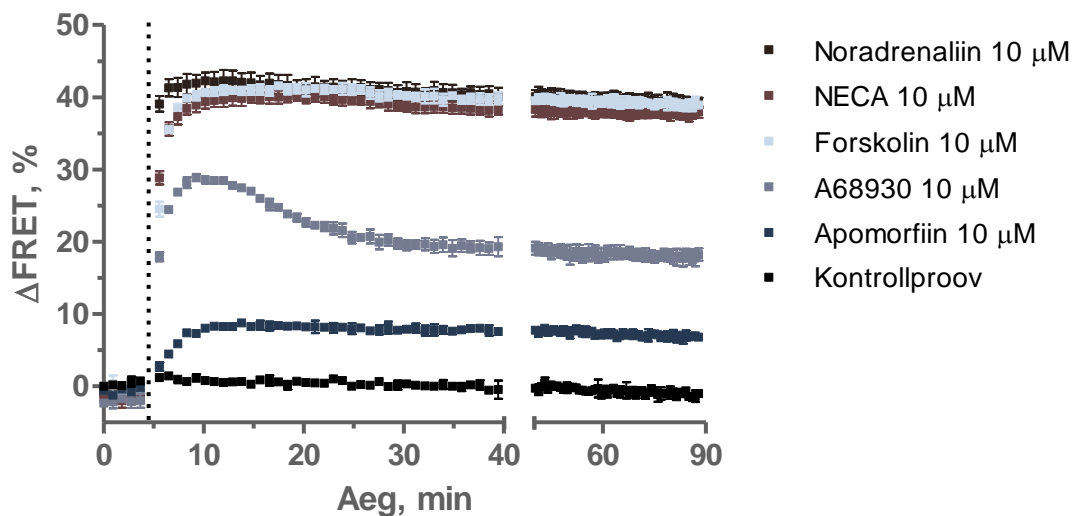


**Joonis 9. Mõõdetud forskolini doos-vastus kõverad (A), millelt on määratud EC<sub>50</sub> väärtused erinevate Gs(X) konstruktide avaldamisel (B).** Esitatud on ühe katse duplikaatide keskmised väärtused, veajooned näitavad duplikaatide varieeruvust.

### 5.5 Retseptorite aktiveerimine ligandidega U2OS rakkudes

GPCR-de edasiseks uurimiseks näidati, et cAMP-i tootmist on võimalik indutseerida ka retseptori ligandidega. Selleks valiti välja spetsiifilised ligandid, mis aktiveerivad retseptorite perekondi, mis võiksid esineda U2OS rakuliinis: noradrenaliin ( $\alpha$ -adrenoretseptorite osaline või täisagonist), NECA (adenosiiniretseptorite täisagonist), A68930 (dopamiini retseptorite agonist) ja apomorfiin (dopamiini retseptorite osaline agonist) (Harding *et al.* 2022). Erinevate konstruktide ekspressiooniga (sobiva MOI juures) mõõdeti cAMP-i taset. Kasutades valitud ligande, saadi kinnitust, et valitud endogeensete retseptorite perekonnad on tõepoolest rakuliinis olemas. Näited ligandide aktivatsioonikõveratest on esitatud Gst konstrukti avaldamisel (MOI = 5) (joonis 10).

Ilmneb, et on sama retseptori perekonna (nt dopamiini retseptorite) piires on võimalik eristada osalise ja täisagonisti signaale lähtudes amplituudist: täisagonist (A68930) annab markantselt suurema efekti võrreldes osalise agonistiga (apomorfiin), mis saavutab vaid osa sellest. Esile tuleb ka töös kasutatud cAMP-i taseme mõõtmise eelis – signaali jälgimine ajas ilmutab ligandide erinevat kineetilist käitumist. Osa mõõdetud kõveratest läbib maksimumi, enne kui taandub teatud nivoole (nt A68930). Paljude ligandide nivoo jääb aga teatud taseme saavutamisel ajas püsima (nt NECA). Saadud signaali amplituud on oluliselt kõrgem võrreldes tulemustega, mis on saadud eelmise põlvkonna bakuloviirustega (antud rakuliiniga õnnestus varasemalt saada aktivatsiooniaken kuni 15%). Kuigi tulemused on antud Gst näitel, on võimatu eristada kui suur osa signalist tuleneb endogeensete Gas allühikute aktiveerimisest. Üks võimalus, kuidas välistada Gas allühikute segavat mõju, on luua spetsiaalne *knock-out* rakuliin. Ühildades olemasoleva plasmiidide koguga CRISPR-põhise tehnoloogia, on võimalus väga spetsiifiliselt rakkudest kaotada Gas allühikute ekspressioon, et edaspidi uurida põhiliselt Gs(X) konstruktidest tulenevat signaali (Aulicino *et al.* 2022).



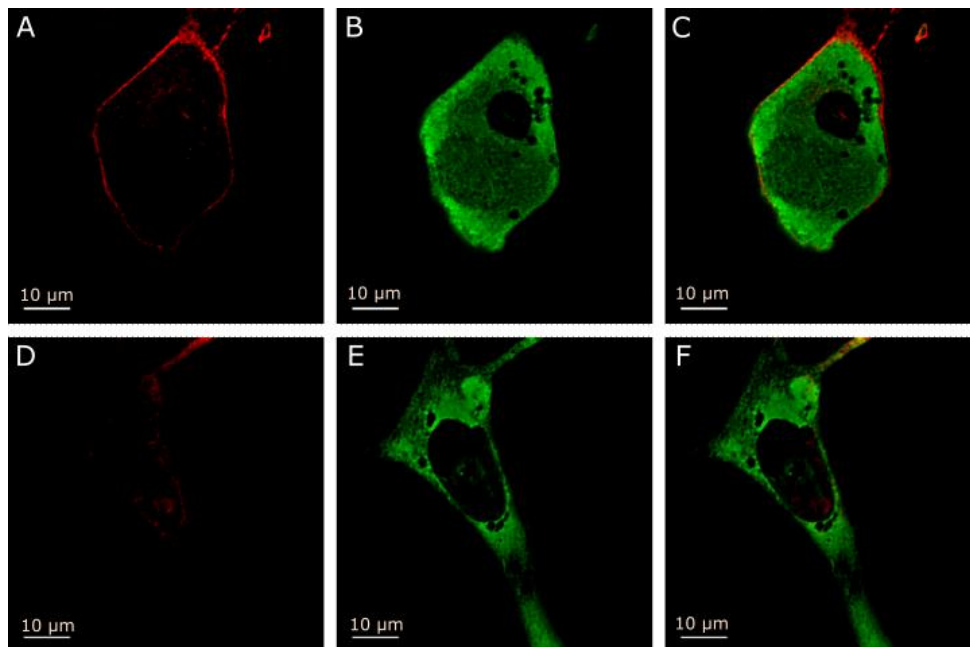
**Joonis 10. Erinevate endogeensete GPCR-de ligandide aktivatsioonikõverad Gst ekspressiooni näitel.** Katkendlik joon märgib ligandide lisamise hetke. Katsetulemustele tehti baasjoone korrektuur ja on graafikul esitatud duplikaatide keskmiste väärtustena, veajooned näitavad duplikaatide varieeruvust.

## 5.6 GABA<sub>B</sub> retseptori koekspressioon biosensoriga

Kuigi kahe viirusega koosnakatamine pole sageli eelistatud, sest sellisel juhul on raske tagada ühtlane valgu ekspressioon, on see oluliselt lihtsam ja kiirem kui kombineeritud viiruse loomine. Eelnevad katsed on näidanud, et nakatamine ühe viirusega on väga

efektiivne ja seetõttu tekkis võimalus proovida koosnakatamist GABA<sub>B</sub>-SNAP viirusega. Teostati katse, kus rakke nakatati koos ja eraldi GABA<sub>B</sub>-SNAP (MOI = 20) ning pEmpty-VSVG-Gs (MOI = 2,5) viirusega. Et olla kindel, et GABA<sub>B</sub> on rakus ekspresseeritud ja jõudnud plasmamembraani, värviti enne mikroskoopilisi katseid SNAP-märgis orgaanilise fluorofooriga. Värvimine DMSO-d sisaldava lahusega mõjub rakkudele toksiliselt, mistõttu pikaajaliste mikroskoopiakatsete jooksul hakkab rakkude terviklik morfoloogia kaduma. Rakkude struktuuri säilitamiseks on võimalik rakud fikseerida, mille käigus kas valgud sadestatakse, mis on rohkem kasutusel immunofluorestsentsi katsetes, või ristsidestatakse keemiliselt. Antud töös on kasutusel glüoksaal (Richter et al. 2018).

Täpsema GABA<sub>B</sub> retseptori lokalisatsiooni määramiseks kasutati kõrgema lahutusega laivälja epifluorestsentsi. Joonistel 11A – C on toodud fluorestsentsvärvitud rakk, kus on ekspresseeritud GABA<sub>B</sub> retseptor koos biosensoriga. Signaal punases emissioonikanalis, mis vastab substraadile, tõestab et mõlemad GABA<sub>B</sub> retseptori allühikud on rakus avaldatud, sest (SNAP-märgisega liidetud) GB<sub>B1</sub> ilma GB<sub>2</sub> allühikuta membraani ei liigu. Joonistel 11D – F on toodud värvitud rakud, kus on ekspresseeritud ainult biosensor. Vähesel määral on märgatav mittespetsiifiline värvumine. Edaspidi saab optimeerida rakkude pesemistingimusi, et vähendada mittespetsiifikat.



**Joonis 11. Märgistatud GABA<sub>B</sub> retseptor ja Epac biosensor fikseeritud U2OS rakkudes.** Esitatud on laivälja epifluorestsentsi mikroskoopia pildid, mille tegemiseks ergastati biosensorit ja SNAP-surface 649 substraati laseriga lainepikkustel 515 ja 638 nm vastavalt. A – F: GABA<sub>B</sub> ja Gs konstrukti koossekspressioonil ergastus 515 nm laseriga

(A), 638 nm laseriga (B) ja pilt ühildatud kanalitest (C). D – F: Eraldi Gs konstrukti ekspressioon sama ergastuse juures.

Mikroskoopilised katsed kinnitasid, et GABA<sub>B</sub> retseptor on rakkude membraanis esindatud. Seetõttu oli võimalus spektroskoopiliselt mõõta GABA<sub>B</sub> aktivatsiooni koossekspressioonil G<sub>s</sub>i ja G<sub>s</sub> konstruktiga (lisa 8). Samuti teostati kontrollkatse, kus mõõdeti konstruktide aktivatsiooni ilma GABA<sub>B</sub> ekspressioonita. Kuigi kirjanduses teadaolevalt edastab GABA<sub>B</sub> signaale põhiliselt läbi G<sub>α</sub>i allühiku on nähtud aktivatsiooni ka G<sub>s</sub> allühiku koosavaldamisel. Varem on täheldatud mõju cAMP-i tasemele GABA<sub>B</sub> mõjul, mida seostati endogeensete G<sub>βγ</sub> allühikute mõjutustega. Paraku on signaalirada siiani teadmata. Pakutud on, et G<sub>α</sub>i aktiveerimisel vabaneb märgatav hulk G<sub>βγ</sub> allühikuid, mis võivad moduleerida teatud adenülaadi tsüklaasi vorme (Tang and Gilman 1991; Enna 2001).

Tulevikus saab seda hüpoteesi kontrollida varieerides rakus G<sub>βγ</sub> allühikute kontsentratsiooni bakuloviirusega. Selleks on plaanis liita kimäärsete G<sub>α</sub>-valkude raamatukoguga G<sub>β</sub> ja G<sub>γ</sub> allühikud. Lähtudes sellest kui levinud on nende allühikute alatüüpide avaldamine (kokku on 5 G<sub>β</sub> ja 12 G<sub>γ</sub> alatüüpi imetajarakkudes) ja kui funktsionaalseid komplekse nad moodustavad, on otsustatud G<sub>β</sub><sub>1</sub> ja G<sub>γ</sub><sub>2</sub> alatüüpide kasuks (Mervine *et al.* 2006). Kõige raskemad kloonimise etapid on antud töös läbitud. Harvaesineva BstXI lõikesaidi esinemine G<sub>γ</sub><sub>2</sub> järjestuses välistas liitmise G<sub>β</sub><sub>1</sub> allühikuga kasutades sama ensüümi. Lõikesaidi kaotamiseks loodi punktmutatsioon. Punktmutatsiooniks disainiti spetsiaalsed mutatsiooni sisaldavad ülekattega praimerid (Gamma2-A12sm-forward ja -reverse), millega sünteesiti PCR reaktsioonil uus muteeritud G<sub>γ</sub><sub>2</sub> järjestus (*mutagenesis by PCR-driven overlap extension*) (lisa 9) (Heckman and Pease 2007). Saadud on doonorplasmidi kuhu on koondatud G<sub>β</sub> ja G<sub>γ</sub>. Edaspidi saab seda ühildada olemasoleva biosensoriga.

## 6 KOKKUVÕTE

Magistritöös on loodud imetajarakkudele suunatud modifitseeritud MultiBacMam süsteemi põhine plasmiidide kogu, mis on ettenähtud ühilduma olemasoleva raamatukoguga. Töö teoreetilises osas on antud ülevaade G-valk seotud retseptorite vahendatud signaaliülekandest, nende uurimisega seotud raskustest ja potentsiaalsetest väljavaadetest, mida kimäärsete G-valkude ekspresseerimine võimaldaks. Kirjeldati erinevaid tehnoloogiaid mitme valgu koosavaldamiseks eelkõige imetajarakkudes. Arutleti lühidalt fluorestsentsnähtuste rakendamisest elusrakkude uurimiseks: analüüsiti erinevaid cAMP-i mõõtmise ja valkude märgistamise meetodeid.

Praktilise töö raames on geenitehnoloogiliste meetoditega loodud üheksa uut rekombinantset MultiBacMam plasmidi, kuhu on koondatud kimäärsete G-valkude, cAMP-biosensori ja VSVG valku kodeerivad geenid kasutades Cre-LoX rekombineerimist. Ühildatud plasmiidide saamist näidati restriksioonianalüüsiga, mida on edasises töös kasutatud bakmiidide loomiseks ja bakuloviiruste genereerimiseks. Mitme valgu ekspressiooni valideeriti imetajarakkudes kasutades erinevaid fluorestsentsmeetodeid.

Mikroskoopiliste vaatluste põhjal saab väita, et loodud bakuloviirustega saab väga efektiivselt imetajarakke nakatada, mis on kaasnud VSVG esinemisega pungunud bakuloviiruste pinnal. Tõendati, et sellest tingituna saab süsteemi edukalt edaspidi kasutada rakendustes, kus naatrium butüraadi lisamine nakatamise efektiivsuse tõstmiseks on välistatud. Mõõdeti Gs(X) konstruktide mõju basaalsele cAMP-i tasemele, kus tähelepanuväärne oli Gs13 kõrge aktivatsioon, mida seostati endogeense retseptori kõrge basaalaktiivsusega. Neid konstrukte on võimalik konkreetsetes rakendustes kasutada cAMP-i taseme mõõtmiseks, aga eelnev optimeerimine on nõutud. Veenduti, et cAMP-i tootmist on võimalik indutseerida ligandidega, mis aktiveerivad erinevaid endogeenseid GPCR rühmi. Katsetati kotransfektsiooni GABA<sub>B</sub>-SNAP viirusega, mille käigus veenduti mikroskoopiliselt, et imetajarakkudes ekspresseeriti nii biosensorit kui ka GABA<sub>B</sub> retseptorit. GABA<sub>B</sub> retseptori uurimiseks on edaspidi plaanis ühildada plasmidi veel Gβ ja Gγ valgud, et välja selgitada nende mõju signaalile. Huvitav oleks põhjalikumalt uurida kimäärsete G-valgude seondumisprofiili kasutades rakuliini, kus on kõrvaldatud endogeensed Gs allühikud. Neid rakuliini saab genereerida kasutades CRISPR-põhist geenide väljalülitamist.

## 7 KASUTATUD KIRJANDUS

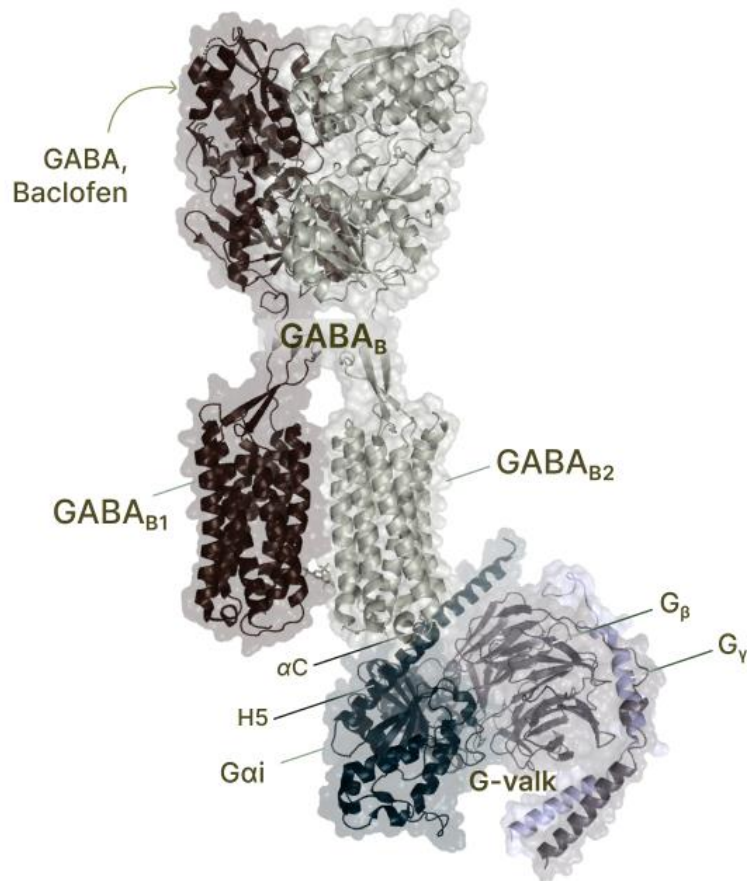
1. Adams S. R., Harootunian A. T., Buechler Y. J., Taylor S. S., Tsien R. Y. (1991) Fluorescence ratio imaging of cyclic AMP in single cells. *Nature* **349**, 694–697.
2. Aulicino F., Pelosse M., Toelzer C., Capin J., Ilegems E., Meysami P., Rollarson R., et al. (2022) Highly efficient CRISPR-mediated large DNA docking and multiplexed prime editing using a single baculovirus. *Nucleic Acids Research* **50**, 7783–7799.
3. Avet C., Mancini A., Breton B., Gouill C. le, Hauser A. S., Normand C., Kobayashi H., et al. (2022) Effector membrane translocation biosensors reveal G protein and  $\beta$ arrestin coupling profiles of 100 therapeutically relevant GPCRs. *Elife* **11**.
4. Ballister E. R., Rodgers J., Martial F., Lucas R. J. (2018) A live cell assay of GPCR coupling allows identification of optogenetic tools for controlling Go and Gi signaling. *BMC Biology* **16**, 1–16.
5. Barka T. (1998) Effect of sodium butyrate on the expression of genes transduced by retroviral vectors. *Journal of Cellular Biochemistry* **69**, 201–210.
6. Barsoum J., Brown R., McKee M., Boyce F. M. (1997) Efficient Transduction of Mammalian Cells by a Recombinant Baculovirus Having the Vesicular Stomatitis Virus G Glycoprotein. *Human Gene Therapy* **8**, 2011–2018.
7. Bockaert J. (1999) Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *The EMBO Journal* **18**, 1723–1729.
8. Brooker G., Harper J. F., Terasaki W. L., Moylan R. D. (1979) Radioimmunoassay of cyclic AMP and cyclic GMP. *Adv Cyclic Nucleotide Res* **10**, 1–33.
9. Ci Y., Yang Y., Xu C., Shi L. (2018) Vesicular stomatitis virus G protein transmembrane region is crucial for the hemi-fusion to full fusion transition. *Scientific Reports* **8**, 10669.
10. Conklin B. R., Farfel Z., Lustig K. D., Julius D., Bourne H. R. (1993) Substitution of three amino acids switches receptor specificity of Gq $\alpha$  to that of Gi $\alpha$ . *Nature* **363**, 274–276.
11. Damoiseaux R., Keppler A., Johnsson K. (2001) Synthesis and Applications of Chemical Probes for Human O6-Alkylguanine-DNA Alkyltransferase. *ChemBioChem* **2**, 285–287.
12. Dorsam R. T., Gutkind J. S. (2007) G-protein-coupled receptors and cancer. *Nature Reviews Cancer* **7**, 79–94.
13. Draper-Joyce C. J., Khoshouei M., Thal D. M., Liang Y.-L., Nguyen A. T. N., Furness S. G. B., Venugopal H., et al. (2018) Structure of the adenosine-bound human adenosine A1 receptor–Gi complex. *Nature* **558**, 559–563.
14. Enna S. J. (2001) GABA(B) Receptor Signaling Pathways, pp. 329–342.
15. Flock T., Hauser A. S., Lund N., Gloriam D. E., Balaji S., Babu M. M. (2017) Selectivity determinants of GPCR–G-protein binding. *Nature* **545**, 317–322.
16. Flock T., Ravarani C. N. J., Sun D., Venkatakrishnan A. J., Kayikci M., Tate C. G., Veprintsev D. B., Babu M. M. (2015) Universal allosteric mechanism for G $\alpha$  activation by GPCRs. *Nature* **524**, 173–179.
17. Forster Th. (1946) Energiewanderung und Fluoreszenz. *Naturwissenschaften* **33**, 166–175.
18. Fredriksson R., Lagerström M. C., Lundin L.-G., Schiöth H. B. (2003) The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralogon Groups, and Fingerprints. *Molecular Pharmacology* **63**, 1256–1272.
19. Galvez T. (2001) Allosteric interactions between GB1 and GB2 subunits are required for optimal GABAB receptor function. *The EMBO Journal* **20**, 2152–2159.
20. García-Nafriá J., Nehmé R., Edwards P. C., Tate C. G. (2018) Cryo-EM structure of the serotonin 5-HT1B receptor coupled to heterotrimeric Go. *Nature* **558**, 620–623.

21. Geneva Biotech (2021) *MultiBacMam<sup>TM</sup> Viral Vector System for Delivery of Large Gene Circuits into Mammalian Cells User Manual*.
22. Gilman A. G. (1970) A Protein Binding Assay for Adenosine 3':5'-Cyclic Monophosphate. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **67**, 305–312.
23. Harding S. D., Armstrong J. F., Faccenda E., Southan C., Alexander S. P. H., Davenport A. P., Pawson A. J., Spedding M., Davies J. A. (2022) The IUPHAR/BPS guide to PHARMACOLOGY in 2022: curating pharmacology for COVID-19, malaria and antibacterials. *Nucleic Acids Research* **50**, D1282–D1294.
24. Harrison R. L., Jarvis D. L. (2006) Protein N-Glycosylation in the Baculovirus–Insect Cell Expression System and Engineering of Insect Cells to Produce “Mammalianized” Recombinant Glycoproteins, pp. 159–191.
25. Hauser A. S., Attwood M. M., Rask-Andersen M., Schiöth H. B., Gloriam D. E. (2017) Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications. *Nature Reviews Drug Discovery* **16**, 829–842.
26. Heckman K. L., Pease L. R. (2007) Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nature Protocols* **2**, 924–932.
27. Hink W. F., Vail P. V. (1973) A plaque assay for titration of alfalfa looper nuclear polyhedrosis virus in a cabbage looper (TN-368) cell line. *Journal of Invertebrate Pathology* **22**, 168–174.
28. Inoue A., Raimondi F., Kadji F. M. N., Singh G., Kishi T., Uwamizu A., Ono Y., et al. (2019a) Illuminating G-Protein-Coupling Selectivity of GPCRs. *Cell* **177**, 1933–1947.e25.
29. Inoue A., Raimondi F., Kadji F. M. N., Singh G., Kishi T., Uwamizu A., Ono Y., et al. (2019b) Illuminating G-Protein-Coupling Selectivity of GPCRs. *Cell* **177**, 1933–1947.e25.
30. Jacobson L. H., Vlachou S., Slattery D. A., Li X., Cryan J. F. (2018) The Gamma-Aminobutyric Acid B Receptor in Depression and Reward. *Biological Psychiatry* **83**, 963–976.
31. Janakiraman V., Forrest W. F., Chow B., Seshagiri S. (2006) A rapid method for estimation of baculovirus titer based on viable cell size. *Journal of Virological Methods* **132**, 48–58.
32. Juillerat A., Gronemeyer T., Keppler A., Gendreizig S., Pick H., Vogel H., Johnsson K. (2003) Directed Evolution of O<sup>6</sup>-Alkylguanine-DNA Alkyltransferase for Efficient Labeling of Fusion Proteins with Small Molecules In Vivo. *Chemistry & Biology* **10**, 313–317.
33. Kaupmann K., Malitschek B., Schuler V., Heid J., Froestl W., Beck P., Mosbacher J., et al. (1998) GABAB-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature* **396**, 683–687.
34. Keppler A., Gendreizig S., Gronemeyer T., Pick H., Vogel H., Johnsson K. (2003) A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules in vivo. *Nature Biotechnology* **21**, 86–89.
35. Klarenbeek J., Goedhart J., Batenburg A. van, Groenewald D., Jalink K. (2015) Fourth-generation Epac-based FRET sensors for cAMP feature exceptional brightness, photostability and dynamic range: Characterization of dedicated sensors for FLIM, for ratiometry and with high affinity. *PLoS ONE* **10**, 1–11.
36. Koehl A., Hu H., Maeda S., Zhang Y., Qu Q., Paggi J. M., Latorraca N. R., et al. (2018) Structure of the  $\mu$ -opioid receptor–Gi protein complex. *Nature* **558**, 547–552.
37. Kriz A., Schmid K., Baumgartner N., Ziegler U., Berger I., Ballmer-Hofer K., Berger P. (2010) A plasmid-based multigene expression system for mammalian cells. *Nature Communications* **1**, 120.

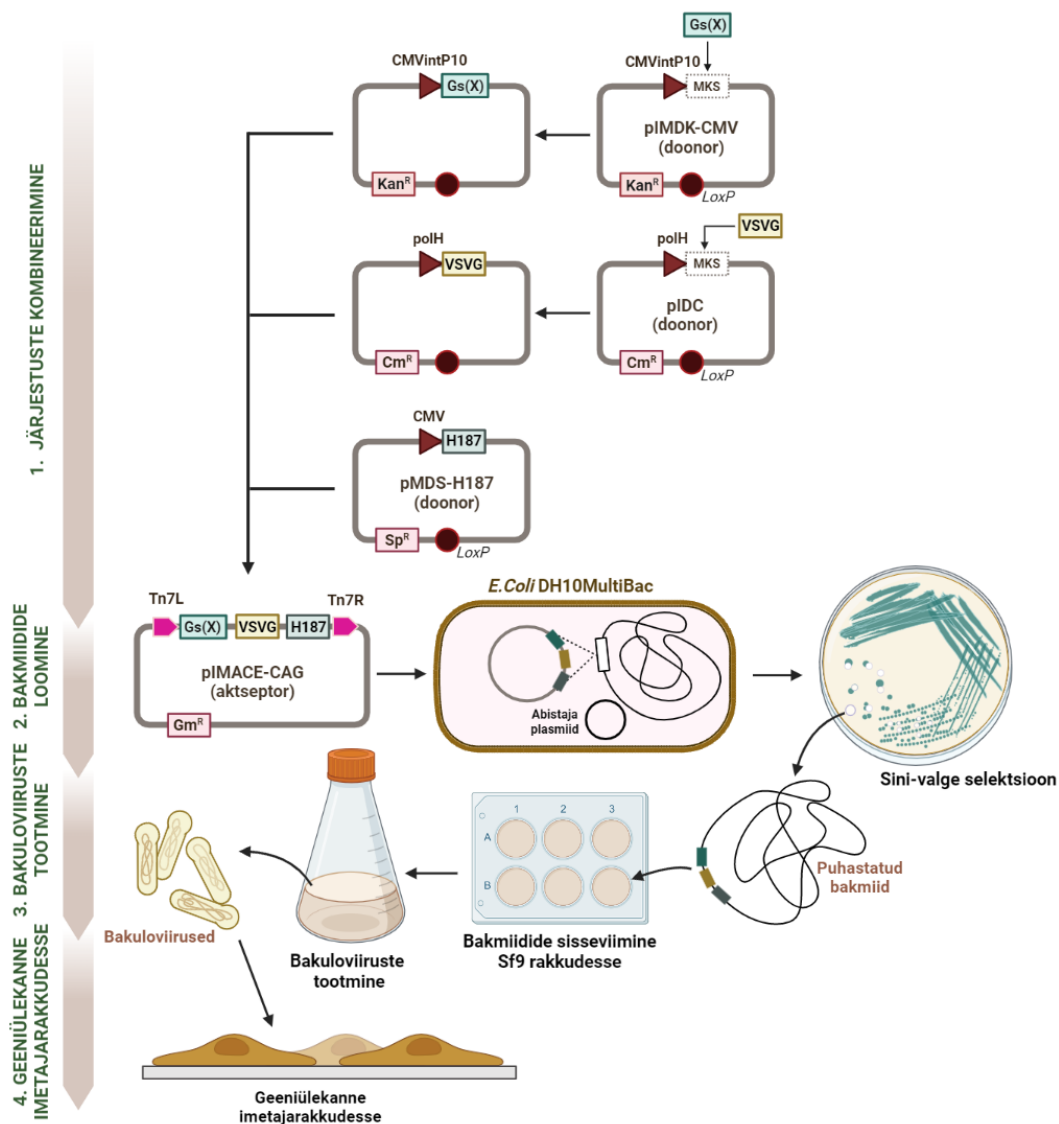
38. Krogt G. N. M. van der, Ogink J., Ponsioen B., Jalink K. (2008) A comparison of donor-acceptor pairs for genetically encoded FRET sensors: Application to the Epac cAMP sensor as an example. *PLoS ONE* **3**.
39. Laaneväli E., (2020) *Erinevate G-valk seotud retseptorite signaaliradade koondamine cAMP väljundiks, kasutades kimäärseid G-valke ja BacMam tehnoloogiat*. Keemia instituut, Tartu.
40. Laasfeld T., Kopanchuk S., Rinken A. (2017) Image-based cell-size estimation for baculovirus quantification. *Biotechniques* **63**, 161–168.
41. Lakowicz J. R. (2006) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, (Lakowicz J. R., ed). Springer US, Boston, MA.
42. Lamichhane R., Liu J. J., Pljevaljcic G., White K. L., Schans E. van der, Katritch V., Stevens R. C., Wüthrich K., Millar D. P. (2015) Single-molecule view of basal activity and activation mechanisms of the G protein-coupled receptor  $\beta$ 2 AR. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**, 14254–14259.
43. Lamichhane R., Liu J. J., White K. L., Katritch V., Stevens R. C., Wüthrich K., Millar D. P. (2020) Biased Signaling of the G-Protein-Coupled Receptor  $\beta$ 2AR Is Governed by Conformational Exchange Kinetics. *Structure* **28**, 371-377.e3.
44. Leipe D. D., Wolf Y. I., Koonin E. v, Aravind L. (2002) Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. *Journal of Molecular Biology* **317**, 41–72.
45. Link R., Veiksina S., Tahk M., Laasfeld T., Paiste P., Kopanchuk S., Rinken A. (2020) The constitutive activity of melanocortin-4 receptors in cAMP pathway is allosterically modulated by zinc and copper ions. *Journal of Neurochemistry* **153**, 346–361.
46. Lodish H., Berk A., Kaiser C. A., Amon A., Ploegh H., Bretscher A., Krieger M., Kelsey C M. (2016) *Molecular Cell Biology (8th Edition)*, (Champion E., Moffat H., eds). Katherine Ahr Parker, New York.
47. Luck K., Kim D.-K., Lambourne L., Spirohn K., Begg B. E., Bian W., Brignall R., et al. (2020) A reference map of the human binary protein interactome. *Nature* **580**, 402–408.
48. Mansouri M., Bellon-Echeverria I., Rizk A., Ehsaei Z., Cianciolo Cosentino C., Silva C. S., Xie Y., et al. (2016) Highly efficient baculovirus-mediated multigene delivery in primary cells. *Nature Communications* **7**, 11529.
49. Masharina A., Reymond L., Maurel D., Umezawa K., Johnsson K. (2012) A Fluorescent Sensor for GABA and Synthetic GABA<sub>B</sub> Receptor Ligands. *J Am Chem Soc* **134**, 19026–19034.
50. Mervine S. M., Yost E. A., Sabo J. L., Hynes T. R., Berlot C. H. (2006) Analysis of G Protein  $\beta\gamma$  Dimer Formation in Live Cells Using Multicolor Bimolecular Fluorescence Complementation Demonstrates Preferences of  $\beta$ 1 for Particular  $\gamma$  Subunits. *Molecular Pharmacology* **70**, 194–205.
51. Milligan G., Kostenis E. (2006) Heterotrimeric G-proteins: a short history. *British Journal of Pharmacology* **147**, S46–S55.
52. Neves S. R., Ram P. T., Iyengar R. (2002) G Protein Pathways. *Science (1979)* **296**, 1636–1639.
53. Okashah N., Wan Q., Ghosh S., Sandhu M., Inoue A., Vaidehi N. (2019) Variable G protein determinants of GPCR coupling selectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**, 12054–12059.
54. Phan D., Wodarz D. (2015) Modeling multiple infection of cells by viruses: Challenges and insights. *Mathematical Biosciences* **264**, 21–28.
55. Pin J.-P., Kniazeff J., Binet V., Liu J., Maurel D., Galvez T., Duthey B., et al. (2004) Activation mechanism of the heterodimeric GABAB receptor. *Biochemical Pharmacology* **68**, 1565–1572.

56. Piston D. W., Kremers G.-J. (2007) Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly. *Trends in Biochemical Sciences* **32**, 407–414.
57. Ponsioen B., Zhao J., Riedl J., Zwartkruis F., Krogt G. van der, Zacco M., Moolenaar W. H., Bos J. L., Jalink K. (2004) Detecting cAMP-induced Epac activation by fluorescence resonance energy transfer: Epac as a novel cAMP indicator. *EMBO Rep* **5**, 1176–1180.
58. Prasher D. C., Eckenrode V. K., Ward W. W., Prendergast F. G., Cormier M. J. (1992) Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* **111**, 229–233.
59. Quallo T., Alkhatib O., Gentry C., Andersson D. A., Bevan S. (2017) G protein  $\beta\gamma$  subunits inhibit TRPM3 ion channels in sensory neurons. *Elife* **6**.
60. Richter K. N., Revelo N. H., Seitz K. J., Helm M. S., Sarkar D., Saleeb R. S., D’Este E., et al. (2018) Glyoxal as an alternative fixative to formaldehyde in immunostaining and super-resolution microscopy. *The EMBO Journal* **37**, 139–159.
61. Roldão A., Oliveira R., Carrondo M. J. T., Alves P. M. (2009) Error assessment in recombinant baculovirus titration: Evaluation of different methods. *Journal of Virological Methods* **159**, 69–80.
62. Schmid C. L., Kennedy N. M., Ross N. C., Lovell K. M., Yue Z., Morgenweck J., Cameron M. D., Bannister T. D., Bohn L. M. (2017) Bias Factor and Therapeutic Window Correlate to Predict Safer Opioid Analgesics. *Cell* **171**, 1165–1175.e13.
63. Shen C., Mao C., Xu C., Jin N., Zhang H., Shen D.-D., Shen Q., et al. (2021) Structural basis of GABAB receptor–Gi protein coupling. *Nature* **594**, 594–598.
64. Soulez F., Denis L., Tourneur Y., Thiebaut E. (2012) Blind deconvolution of 3D data in wide field fluorescence microscopy, in *2012 9th IEEE International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI)*, pp. 1735–1738. IEEE.
65. Sriram K., Insel P. A. (2018) G Protein-Coupled Receptors as Targets for Approved Drugs: How Many Targets and How Many Drugs? *Molecular Pharmacology* **93**, 251–258.
66. Tang W.-J., Gilman A. G. (1991) Type-Specific Regulation of Adenylyl Cyclase by G Protein  $\beta\gamma$  Subunits. *Science (1979)* **254**, 1500–1503.
67. Venkatakrisnan A. J., Deupi X., Lebon G., Tate C. G., Schertler G. F., Babu M. M. (2013) Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature* **494**, 185–194.
68. Vetter I. R., Wittinghofer A. (2001) The Guanine Nucleotide-Binding Switch in Three Dimensions. *Science (1979)* **294**, 1299–1304.
69. Vsevolod K., Vadim C., C. Stevens R. (2013) Structure-function of the G protein-coupled receptor superfamily. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **53**, 531–556.
70. Wang W., Fang D., Zhang H., Xue J., Wangchuk D., Du J., Jiang L. (2020) Sodium Butyrate Selectively Kills Cancer Cells and Inhibits Migration in Colorectal Cancer by Targeting Thioredoxin-1. *OncoTargets and Therapy* **Volume 13**, 4691–4704.
71. Weis W. I., Kobilka B. K. (2018) The Molecular Basis of G Protein–Coupled Receptor Activation. *Annual Review of Biochemistry* **87**, 897–919.
72. Xu S., Liu C.-X., Xu W., Huang L., Zhao J.-Y., Zhao S.-M. (2017) Butyrate induces apoptosis by activating PDC and inhibiting complex I through SIRT3 inactivation. *Signal Transduction and Targeted Therapy* **2**, 16035.

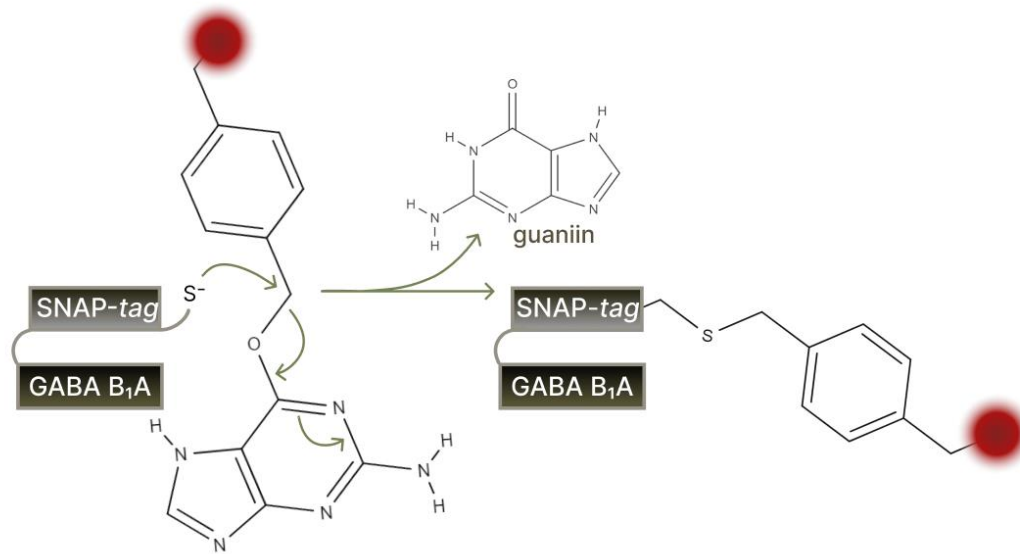
## 8 LISAD



**Lisa 1. GABA<sub>B</sub> retseptori kompleks.** Aktiveerudes moodustab GABA<sub>B</sub> retseptor kompleksi G-valguga, mille kolm allühikut on kujutatud joonisel. Eraldi on märgitud kõige olulisemad G-valgu piirkonnad seondumisel retseptoriga: C-terminaal ja selle läheduses asuv heeliks (H5). Funktsionaalse retseptori moodustamiseks on obligatoorne mõlema allühiku olemasolu: GABA<sub>B1</sub> ja GABA<sub>B2</sub>. GABA<sub>B1</sub>-ga seostuvad ligandid (GABA ja baclofen) ja GABA<sub>B2</sub> allühikuga seondub G-alk (teadaolevalt põhiliselt G<sub>ai</sub> allühik) (PDB kood 7EB2) (Shen *et al.* 2021).



**Lisa 2. MultiBacMam süsteemi loomise lihtsustatud töövooskeem.** (1) Esmalt tuleb soovitud järjestused ümber kloonida doonorvektoritele, mille jaoks on olemas multikloonimissaidid (MKS) ja resistentsusmarkerid. Doonorvektoreid on võimalik omavahel kombineerida LoxP elementide vahendusel. Kõik järjestused koondatakse seejärel aktseptorvektorile, mis sisaldab Tn7L ja Tn7R transpositsioonelemente. (2) Transpositsioonelementide kaudu kantakse geenide järjestused bakmiidi, mida võimaldab abistaja plasmiid. Sini-valge seleksiooniga on võimalik eristada kolooniaid, mis kannavad soovitud geenijärjestust (valged), tühjadest (sinised). (3) Bakteritest puhastatud bakmiidi sisseviimisel putukarakkudesse Sf9 on võimalik toota ja edaspidi amplifitseerida bakuloviiiruseid. (4) Imetajarakkude nakatamisel viirustega on viimaks võimalik avaldada soovitud valke raku.



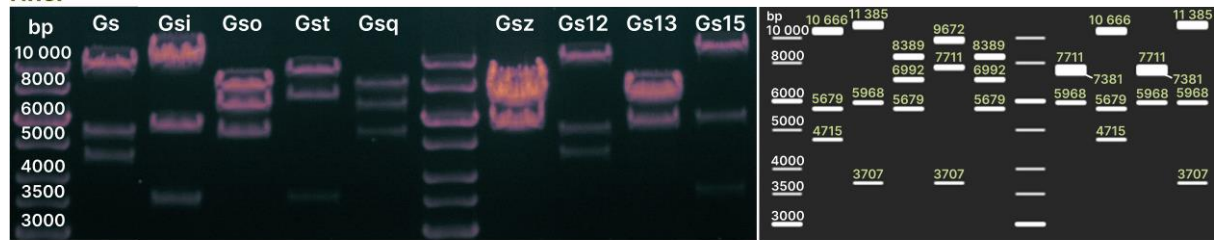
**Lisa 3. SNAP-märgise (SNAP-tag) märgistamise mehhanism fluorestseeruva O<sup>6</sup>-bensüülguaniini derivaadiga.**

Praimeri nimetus	Järjestus	T <sub>m</sub> , °C
GsX_NheI_forward	CATGCTAGCAAAGAATTGCTCGACCACCG	65
GsX_Mph1103I_reverse	TAGATGCATTGCACCTGAGGAGTGAATTGCG	66
Gamma2_A12sm_forward	CCAGCATAGCACACAAGCAAGGAAGCTGGTAGAGC	68
Gamma2_A12sm_reverse	GCTCTACCAGCTTCCTTGCTTGTGCTATGCTGG	69
CMV_forward	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG	66
BGH_reverse	TAGAAGGCACAGTCGAGG	54

**Lisa 4. Töös kasutatud praimerid.** Tabelis on esitatud praimerid nimetus, sellele vastav järjestus 5'-3' suunas ja sulamistemperatuur T<sub>m</sub>.

pEmpty-VSVG-Gs(X)-H187:

**NheI**



**MunI**



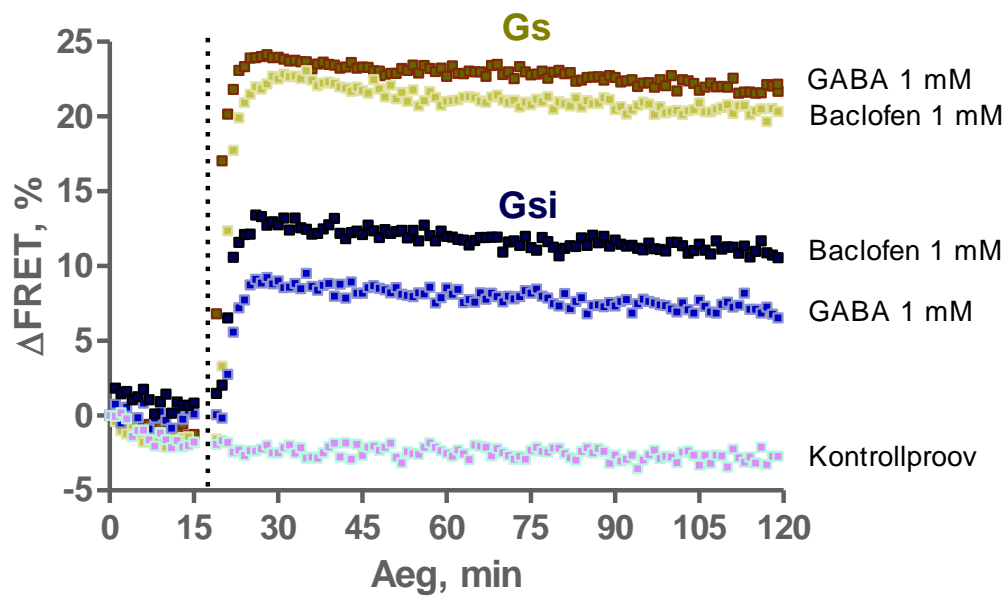
**Lisa 5. Plasmiidide pEmpty-VSVG-Gs(X)-H187 restriktsoonianalüüs ensüümidega NheI ja MunI.** Esitatud on eksperimentaalne geelelektroforeesi pilt (vasakul) koos lõikeproduktide simulatsiooniga oodatud suurustega, mis on loodud programmis SnapGene.

Järjestuse number	Bakmiidi nimetus	Plasmiidide järjekord ühildamisel
1. pIMACE-CAG (gentamütsiin)	pEmpty-VSVG-Gs-H187	1-4-2-3
	pEmpty-VSVG-Gsi-H187	1-4-3-2
2. pIDC-VSVG (klooramfenikool)	pEmpty-VSVG-Gso-H187	1-2-3-4
	pEmpty-VSVG-Gst-H187	1-3-2-4
3. pIMDK-CMV-Gs(X) (kanamütsiin)	pEmpty-VSVG-Gsq-H187	1-2-3-4
	pEmpty-VSVG-Gsz-H187	1-2-4-3
4. pMDS-H187 (spektinomütsiin)	pEmpty-VSVG-Gs12-H187	1-4-2-3
	pEmpty-VSVG-Gs13-H187	1-2-4-3
	pEmpty-VSVG-Gs15-H187	1-4-3-2

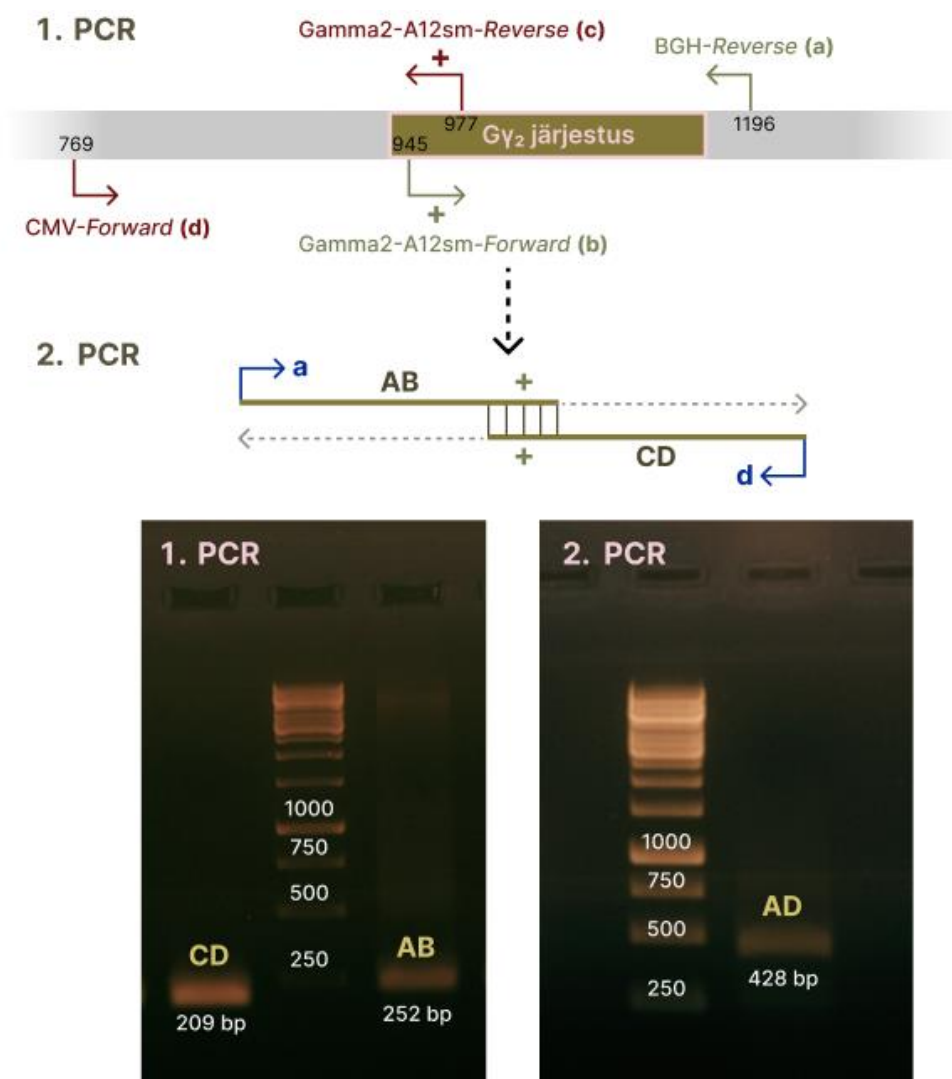
**Lisa 6. Bakmiidides esinevate järjestuste järjekord.** Parempoolses veerus vastavad numbrid kindlatele plasmiididele: 1 (pIMACE-CAG), 2 (pIDC-VSVG), 3 (pIMDK-CMV-Gs(X)), 4 (pMDS-H187).

Viirus	Tiiter [ $\log(\text{ivp/mL}) \pm \text{sd}$ ]
pEmpty-VSVG-Gs-H187 P3	7,1 $\pm$ 0,4
pEmpty-VSVG-Gsi-H187 P3	7,7 $\pm$ 0,5
pEmpty-VSVG-Gso-H187 P2	7,3 $\pm$ 0,5
pEmpty-VSVG-Gst-H187 P2	7,5 $\pm$ 0,2
pEmpty-VSVG-Gsq-H187 P3	7,2 $\pm$ 0,4
pEmpty-VSVG-Gsz-H187 P2	7,9 $\pm$ 0,6
pEmpty-VSVG-Gs12-H187 P3	7,2 $\pm$ 0,4
pEmpty-VSVG-Gs13-H187 P2	7,4 $\pm$ 0,8
pEmpty-VSVG-Gs15-H187 P3	7,5 $\pm$ 0,5
GABA <sub>B</sub> -SNAP P2	7,4 $\pm$ 0,5

**Lisa 7. Bakuloviiruste tiitrid.** Viirus GABA<sub>B</sub>-SNAP on loodud antud bioorgaanilise õppetooli (Santa Veikšina) koostöös Läti Orgaanilise Sünteesi Instituudiga (Edijs Vavers).



**Lisa 8. GABA<sub>B</sub> retseptori ligandide aktivatsioonikõverad Gs ja Gsi konstruktide ekspressiooni näitel.** Katkendlik joon märgib ligandide lisamise hetke. Katsetulemustele tehti baasjoone korrektuur ja esitatud on ühe katsesüvendi tulemused.



**Lisa 9. Ülevaatlük skeem punktmutatsiooni loomisest  $G\gamma_2$  geeni järjestuses.** Esimene PCR reaktsioon viiakse läbi eraldi kahe praimerid komplektina: *BGH-Reverse* koos *Gamma2-A12sm-Forward*-ga ja *CMV-Forward* koos *Gamma2-A12sm-Reverse*-ga. Sümboliga „+“ on tähistatud punktmutatsioon praimerite järjestustes. Vasakpoolne geelelektroforeesi pilt kujutab saadud eeldatava suurusega produkte (CD ja AB, mis tähistavad vastavaid praimereid joonisel), mis seejärel välja lõigati ja puhastati geelist. Teises PCR reaktsioonis on produktid CD ja AB üksteisele praimerid. Lisapraimerid *BGH-Reverse* ja *CMV-Forward* on vaja järjestuse amplifitseerimiseks. Saadakse produkt AD, mida on näidatud parempoolsel geelelektroforeesi pildil. Produkt AD vastab  $G\gamma_2$  geeni järjestusele, milles on muudetud üks aluspaar. Tegu on vaikiva mutatsiooniga ehk selline muudatus geenijärjestuses ei asenda esialgset aminohappelist järjestust valgus.

## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Elen Laaneväli,

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

“MultiBacMam tehnoloogia kui tõhus biosensoreid kodeerivate multigeenide ülekande vahend G-valk seotud retseptorite aktivatsiooni uurimiseks“

mille juhendajad on Santa Veikšina ja Sergei Kopantšuk,

- 1.1 reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
- 1.2 üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates 15.08.2025 kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, 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.

*Elen Laaneväli*

**16.08.2022**