

TARTU ÜLIKOOL

Loodus- ja täppisteaduste valdkond

Keemia instituut

Bioorgaanilise keemia õppetool

Carmen Piirsalu

**MultiBacMam süsteem Frizzled-retseptorite kuvamiseks
nanoosakestel**

Bakalaureusetöö (6 EAP)

Keemia

Juhendajad:

PhD Sergei Kopantšuk

PhD Santa Veikšina

Tartu 2022

INFOLEHT

MultiBacMam süsteem Frizzled-retseptorite kuvamiseks nanoosakestel

Bakalaureusetöö raames loodi uudne mitmete valkude (sh Frizzled-retseptorite) koos ekspresseerimise süsteem, edasise potentsiaaliga kasutada imetajarakkude membraanist pungunud viiruslaadseid osakesi terapeutilistel eesmärkidel. Süsteemi valideerimiseks genereeriti 14 erinevat rekombinantset bakuloviirust, mida kasutati imetajarakkudesse huvipakkuvate geenide sisseviimiseks. Valkude ekspressiooni imetajarakkudes kontrolliti fluorestsentsmikroskoopiaga. Tulemuste põhjal võib kinnitada, et antud süsteem töötab efektiivselt mitmete valkude kuvamiseks nii imetajarakkudes kui ka imetajarakkudest pungunud rakuvälistes osakestes.

Märksõnad: G-valkudega seotud retseptorid, Frizzled-retseptorid, viiruslaadsed osakesed, 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 system for Frizzled receptors display on nanoparticles

A novel system for co-expression of multiple proteins (including Frizzled-receptors) was established, with the further potential to use mammalian cell budded virus-like particles for therapeutic purposes. To validate the system, 14 different recombinant baculoviruses were generated and used to introduce genes of interest into mammalian cells. Protein expression in mammalian cells was explored by fluorescence microscopy. The results confirm that this system is effective for displaying multiple proteins in mammalian cells as well as in extracellular particles budded from mammalian cells.

Keywords: G protein-coupled receptors, Frizzled receptors, virus-like particles, 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	5
2. SISSEJUHATUS	7
3. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	8
3.1 G-valguga seotud retseptorid	8
3.1.1 Frizzled-retseptorid.....	9
3.2 Sissejuhatus metoodikatesse	11
3.2.1 MultiBacMam tehnoloogia	11
3.2.1.1 Bakuloviiruste tiitri määramine.....	15
3.2.2 Fluorestsentsnähtused- ja mikroskoopia.....	15
3.2.2.1 Täieliku sisepeegeldusega fluorestsentsmikroskoopia (TIRF-mikroskoopia)	16
4. EKSPERIMENTAALNE OSA	17
4.1 MultiBac plasmiidide genereerimine	17
4.1.1 Rekombinantse plasmidi konstrueerimine <i>Rous Sarcoma</i> viiruse <i>gag</i> -valgu ekspresseerimiseks.....	17
4.1.2 Plasmiidide ühildamine Cre-LoxP rekombinatsiooniga	18
4.2 Rekombinantsete bakmiidide genereerimine.....	19
4.3 Bakuloviiruste tootmine <i>Sf9</i> rakkudes	19
4.3.1 Bakuloviiruste tiitri määramine.....	20
4.4 Genereeritud bakuloviiruste valideerimine imetajarakkudega	20
4.4.1 Bakuloviiruste geeniülekanne imetajarakkudesse	20
4.4.2 FZD6-FlAsH-TFP biosensori märgistamine F ₂ FlAsH-iga.....	21
4.4.3 FZD4, FZD5, FZD6, FZD7 immunofluorestsentsanalüüsid.....	21
4.4.4 Tangensiaalvoolu filtratsiooniga rakuväliste osakeste kontsentreerimine ja kasvusöötme vahetamine	22
4.4.5 Fluorestsentsmikroskoopiakatsed.....	22

4.4.6 Andmete ja piltide analüüs	23
5. TULEMUSED JA ARUTELU	24
5.1 Frizzled-retseptoreid kodeeriva MultiBacMam-VLP süsteemi loomine.....	24
5.1.1 Rekombinantse plasmidi konstrueerimine <i>Rous Sarcoma</i> viiruse <i>gag</i> -valgu ekspressiooniks.....	24
5.1.2 Plasmiidide ühendamine Cre-LoxP rekombinatsioonireaktsioonil	25
5.2 Rekombinantsete bakuloviiruste genereerimine ja nende tiitri määramine.....	26
5.3 Geenide ekspressiooni valideerimine imetajarakkudes	27
5.3.1 FZD-retseptorite ekspressiooni valideerimine	28
5.3.1.1 FZD10_mCherry ekspressioon SK-OV-3 rakkudes.....	28
5.3.1.2 FZD6-FIAsH-TFP ekspressioon SK-OV-3 rakkudes	31
5.3.1.3 FZD-retseptorite 4, 5, 6 ja 7 ekspressioon SK-OV-3 rakkudes	32
5.3.2 Plasmamembraanmarkeri PMCFP ekspressioon SK-OV-3 rakkudes	33
5.3.3 RSV <i>gag</i> -valgu ekspressioon SK-OV-3 rakkudes (VLPde genereerimine).....	34
6. KOKKUVÕTE	36
8. KASUTATUD KIRJANDUS.....	37
9. LISAD.....	41
Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks.....	57

1. KASUTATUD LÜHENDID

AcMNPV – *Autographa californica* multikapsiidne nukleopolühedroviiirus (ingl *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*)

BBV – pungunud bakuloviirused (ingl *budded baculoviruses*)

bp – aluspaar (ingl *base pair*)

BSA – veiste seerumi albumiin (ingl *Bovine Serum Albumin*)

CFP – tsüaansiniselt fluorestseeruv valk (ingl *cyan fluorescent protein*)

Cys – tsüsteiin (ingl *cysteine*)

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

E.coli – *Escherichia coli*

EDT – etaan-1,2-ditiool

EDTA – etüleendiamiintetraatsetaat

FRET – Försteri resonantsenergia ülekanne

FZD – Frizzled

GDP – guanosiindifosfaat

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

GPCR – G-valguga seotud retseptorid (ingl *G protein-coupled receptors*)

GSK-3 β – glükogeen süntaas kinaas 3 β (ingl *glycogen synthase kinase 3 β*)

GTP – guanosiintrifosfaat

G-valk – guaniin-nukleotiidi siduv valk (ingl *guanine nucleotide-binding protein*)

HILO mikroskoopia – kõrglahutusega laminaarse optilise lehe mikroskoopia (ingl *highly inclined and laminated optical sheet microscopy*)

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

IPTG – isopropüül β -D-1-tiogalaktopüranosiid

ivp – nakatusvõimeline viirusosake (ingl *infectious viral particle*)

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

MOI – nakatuskordsus (ingl *multiplicity of infection*)

MVB – multivesikulaarsed kehad (ingl *multivesicular bodies*)

NaBu – naatriumbutüraat

NTA – nanoosakeste jälgimise analüüs (ingl *nanoparticle tracking analysis*)

P – tõstearv (ingl *passage*)

PCR – polümeraasi ahelreaktsioon (ingl *polymerase chain reaction*)

RSV – *Rous sarcoma* viirus (ingl *Rous sarcoma virus*)

Sf9 – *Spodoptera frugiperda* putuka munasarjast eraldatud rakuliin

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

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

SRRF – Superresolutsiooni radiaalsed kõikumised (ingl *super-resolution radial fluctuations*)

TFF – tangentsiaalvoolu filtratsioon (ingl. *tangential flow filtration*)

TFP – sinakasroheline fluorestseeruv valk (ingl *teal fluorescent protein*)

TIRF mikroskoopia – täieliku sisepeegeldumise fluorestsentsmikroskoopia (ingl *total internal reflection fluorescence microscopy*)

TM – rakumembraani läbiv (ingl *transmembrane*)

VLP – viiruslaadsed osakesed (ingl *virus like particles*)

WNT – lipoglükoproteiin *Wingless/Int-1*

VSVG – vesikulaarse stomatiidi viiruse glükoproteiin G (ingl *stomatitis virus glycoprotein G*)

X-Gal – bromo-kloro-indolüül-galaktopüranosiid

2. SISSEJUHATUS

Väliskeskkonnast informatsiooni vastuvõtmiseks on rakkudel signaalmolekulide spetsiifilised retseptorvalgud. Ulatuslikuima membraanretseptorite klassi moodustavad G-valguga seotud retseptorid (GPCR, ingl *G protein-coupled receptors*). Laia levimuse ning arvukate rakusiseste signaaliradade regulatsiooni tõttu on GPCRd potentsiaalsed ravimite sihtmärgid. GPCR on jagatud viide alamklassi ning antud töös fookuseeritakse alamklassi Frizzled (FZD) kuuluvatele retseptoritele.

Rakusiseste komplekssete süsteemide (sh membraanretseptorid) uurimine elavates rakkudes on sageli väga keerukas ülesanne. Sellest tulenevalt on kasvav vajadus lihtsustatud süsteemide järele, mis võimaldaksid rakuväliselt uurida huvipakkuvaid rakukomponente, kuid mis samal ajal imiteeriks võimalikult täpselt rakukomponentide naturaalsel elukeskkonda. Üks võimalus on sellise süsteemina kasutada viiruslaadseid osakesi (VLP, ingl *virus like particles*). Nimelt on võimalik ekspresseerida imetajarakkudes näiteks *Rous Sarcoma* viiruse (RSV, ingl *Rous sarcoma virus*) kapsiidi moodustavat *gag*-valku, mis tagab VLPde pungumise imetajarakkude membraanist. Rakumembraanist pungudes on VLPd võimelised võtma enda lipiidümbrisesse membraanseid valke ning protsessi kõrge efektiivsusega toimumiseks on vajalik toota samades rakkudes korraga mitmeid valke. Eelnevast lähtudes seati bakalaureusetöö eesmärgiks luua süsteem mitmete valkude (sh FZD-retseptorid, *gag*-valgud ja fluorestsentsmarkerid) koos ekspresseerimiseks imetajarakkudes.

Mitmete valkude koos ekspresseerimiseks imetajarakkudes kasutati modifitseeritud Geneva Biotech MultiBacMam® süsteemi. Esmalt genereeriti Cre-LoxP reaktsioonil huvipakkuvaid valke (sh 5 erinevat FZD-retseptorit) kodeerivaid geenijärjestust sisaldavad rekombinantsed plasmiidid. Rekombinantsed plasmiidid sisestati bakmiidi, mis transfekteeeriti putukarakkudesse rekombinantsete bakuloviiruste tootmiseks. Töö käigus genereeriti kokku 14 erinevat bakuloviirust, millega nakatati imetajarakke huvipakkuvate valkude ekspresseerimiseks ning VLPde genereerimiseks. Huvipakkuvate valkude ekspressiooni imetajarakkudes kontrolliti fluorestsentsmikroskoopiaga.

3. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

3.1 G-valguga seotud retseptorid

Rakkude normaalse talitluse ja arengu tagamisel on oluline roll informatsioonivahetusel rakusisese keskkonna ja rakku ümbritseva väliskeskkonna vahel. Rakuvälisest keskkonnast tulev informatsioon kandub rakusisesesse keskkonda signaalmolekulide (ligandide) vahendusel ning edastatava informatsiooni vastuvõtmiseks on signaali vastuvõtval rakul signaalmolekulide spetsiifilised retseptorvalgud (Nelson and Cox 2013). Suurima membraanretseptorite klassi moodustavad G-valguga seotud retseptorid (GPCR) (Venkatakrishnan *et al.* 2013). Inimese genoomis on üle 800 erinevat tüüpi GPCRi kodeeriva geeni, mis moodustab kokku 4,2% inimese kõikidest geenidest (Fredriksson *et al.* 2003; Lv *et al.* 2016; Schöneberg and Liebscher 2021). Fredriksson *et al.* (2003) analüüsisid 802 inimese genoomis oleva funktsionaalse GPCRi geneetilist koodi ning koostasid fülogeneetilise puu, mille alusel jaotatakse GPCRd viide alamklassi: rodopsiin, sekretiin, glutamaat, adhesioon ja FZD/Taste2.

GPCRde struktuuri moodustavad rakuvälises alas paiknev N-terminaal, seitse paralleelset rakumembraani läbivat (TM, ingl *transmembrane*) heeliksit ning rakusiseses alas paiknev C-terminaal. TM heeliksid on omavahel ühendatud kolme rakusisese ja kolme rakuvälise aasaga (Nelson and Cox 2013; Venkatakrishnan *et al.* 2013). Signaaliülekanne käigus toimub esmalt retseptori aktivatsioon, mille võivad esile kutsuda mitmed erinevad tegurid, näiteks valgud, peptiidid, nukleotiidid, kaltsiumioonid, väikesed orgaanilised molekulid (hormoonid, neurotransmitterid), aga ka valgus (Bockaert and Pin 1999; Venkatakrishnan *et al.* 2013). Aktivatsioon põhjustab retseptori konformatsioonilise muutuse, mis võimaldab GPCRdel seonduda rakusisese trimeerse guaniin-nukleotiidi siduva valguga (G-valk, ingl *guanine nucleotide-binding protein*), mille kolme alaühikut tähistatakse vastavalt $G\alpha$, $G\beta$ ja $G\gamma$. Seondumise tulemusel vabaneb inaktiivse G-valgu α -alaühikus paiknev guanosiindifosfaat (GDP), mille asemele seondub guanosiintrifosfaat (GTP). GTP seondumine aktiveerib ühtlasi ka G-valgu. Aktiveeritud G-valk eemaldub seejärel retseptorist ning G-valgu α -alaühik seotuna GTP-ga ($G\alpha$ -GTP) dissotsieerub G-valgu β - ja γ -alaühikust. $G\alpha$ -GTP saab luua vastastikmõjusid rakusiseste valkudega (nt ensüümidega, ionkanalitega) ning aktiveerida erinevaid rakusisesid signaaliradu. Vastastikmõju tulemusel hüdrolyüsib GTP GDPks ning taastub G-valgu esialgne struktuur (lisa 1). Heterotrimeerse inaktiivse G-valguga saavad uuesti seonduda aktiveeritud GPCR-d (Nelson and Cox 2013). Erinevatesse alamklassidesse kuuluvad GPCRd järgivad üldiselt sarnast G-valkude

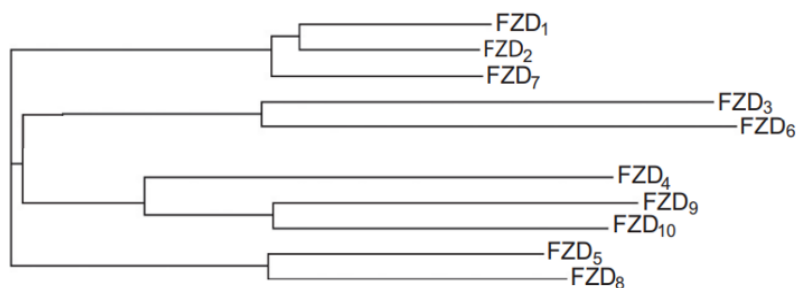
aktiveerimise mehhanismi (Luckey 2014), kuid ligandi seondumise tulemusel toimuvad retseptori konformatsioonilised muutused on nii alamklasside kui ka samasse alamklassi kuuluvate retseptorite korral erinevad (Hauser *et al.* 2021).

Signaaliülekanne tulemusel aktiveeritud rakusisene signaalirada viib omakorda rakusisese vastuse tekkeni, millel võib olla nii lühiajaline mõju (nt ionide rakusisese kontsentratsiooni muutus) kui ka pikaajaline mõju (nt geenide transkriptsioon) (Böhme and Beck-Sickinger 2009; Schöneberg and Liebscher 2021). Erinevate rakusiseste signaaliradade aktiveerimise ja rakusiseste vastuste esilekutsumise tõttu on GPCR-d olulised ravimite märklauad ning praegusel ajal on ligi 36% kasutuses olevatest ravimitest suunatud just GPCR-le (Sriram and Insel 2018). Paraku on paljudele patoloogiliste protsessidega seostatud GPCR-de endogeensed ligandid senini teadmata (tuntud kui orb-retseptorid) ning seetõttu on potentsiaalsete ligandide ja GPCR-le suunatud ravimite otsimine oluliseks suunaks ravimiarenduses (Hauser *et al.* 2020).

3.1.1 Frizzled-retseptorid

Üheks GPCRde perekonda kuuluvaks retseptorite klassiks on Frizzled (FZD)-retseptorid. 1989. aastal analüüsisid Vinson *et al.* (1989) esmakordselt FZD-valgu geneetilist järjestust ning tõid välja FZD-valgu struktuursed sarnasused GPCR-ga. 1997. aastal näitasid Slusarski *et al.* (1997) FZD-valgu seondumist lipoglükoproteiiniga *Wingless/Int-1* (WNT) ning seondumise tulemusel G-valguga seotud signaaliraja aktiveerimist. Struktuursetset ning funktsionaalsetest sarnasustest lähtuvalt hakati FZD-retseptoreid pidama GPCRde alamklassiks (Slusarski *et al.* 1997; Fredriksson *et al.* 2003; Foord *et al.* 2005).

FZD-retseptorite perekonda kuuluvad kümme retseptorit (FZD1-10), mis on jaotatud aminohappelise järjestuse alusel nelja alamklassi (joonis 1). Ühise klassi moodustavad FZD1, -2 ja -7 (kattuvus aminohappelises järjestuses hinnanguliselt 75% ulatuses), FZD3 ja -6 (kattuvus ~50%), FZD4, -9 ja -10 (kattuvus ~65%) ning FZD5 ja -8 (kattuvus ~70%) (Fredriksson *et al.* 2003; Schulte 2010). Sarnaselt GPCRdele moodustavad FZD-retseptorite struktuuri seitse TM heeliksit, rakusisene C-terminaal ja rakuväline N-terminaal, mille läheduses paikneb lisaks ka tsüsteiinirikas ala (Schulte 2010; Vinson *et al.* 1989). Peamisi alamklassidevahelisi erinevusi retseptorite struktuuris ja funktsioonis on seostatud aminohappe tsüsteiin (Cys, ingl *cysteine*) jäägiga (Schenkelaars *et al.* 2015). Cys rikkaid alasid peetakse ka potentsiaalseteks ligandide sidumiskohtadeks (Valnohova *et al.* 2018; Niehrs 2012; Janda *et al.* 2012).



Joonis 1. FZD-retseptorite fülogeneetiline puu. Joonis on kohandatud artiklist (Schulte 2010).

Tänapäevani on WNT-ligandid enimtuntuimad endogeensed ligandid FZD-retseptoritele. Imetajates on teadaolevalt 19 WNT-ligandi, kuid täpne selektiivsus 19 erineva WNT-ligandi ja 10 erineva FZD-retseptori vahel on alles uurimisjärgus (Schulte and Wright 2018; Schulte 2015). Janda *et al.* (2012) on avaldanud kristallstruktuuri WNT8-ligandi kompleksist FZD8-retseptori Cys rikka alaga, kuid paraku pole tänaseni avaldatud kristallstruktuuri ühegi WNT-ligandi kompleksist tervikliku FZD-retseptoriga. Raskused WNT-ligandide ja FZD-retseptorite interaktsioonide uurimisel tulenevad peamiselt WNT-ligandide hüdrofoobsusest ning suurusest (34 kDa), mis raskendab WNT-ligandide puhastamist, bioloogilise aktiivsuse säilitamist kui ka märgistamist (Nile and Hannoush 2016; Schulte 2015). Säfholm *et al.* on pakkunud välja WNT-ligandi analoogi – formüülitud Met-Asp-Gly-Cys-Glu-Leu (tuntud kui Foxy5) – mis on võimeline seonduma ning aktiveerima FZD5-retseptorit. Ka Nile *et al.* (2018) on näidanud alternatiivise WNT-ligandi, sünteetilise peptiidi Fz7-21 kõrge afiinsusega seondumist FZD1-, 2- ja 7-retseptoritele.

WNT-ligandide interaktsioon FZD-retseptoritega toob kaasa erinevate signaaliradade aktiveerimise, millest peamised jagunevad kahte alamklassi: kanoonilised signaalirajad ja mittekanoonilised signaalirajad (planaarse raku polaarsuse signaalirada ja WNT/Ca²⁺ signaalirada). Enim uuritud WNT/FZD signaalirada on kanooniline signaalirada, tuntud ka kui β -kateniinist sõltuvat signaalirada, kuna WNT-ligandi seondumine/mitteseondumine FZD-retseptorile mõjutab transkriptsiooni koaktivaatori β -kateniini rakusisest stabiilsust. Nimelt inhibeeritakse WNT-ligandi, FZD-retseptori ja koretseptori (LRP5/6) vastastikmõjul glükogeen süntaas kinaas 3 β (GSK-3 β), mille üheks substraadiks on β -kateniini. Inaktiveeritud GSK-3 β tõttu jääb β -kateniini fosforüleerimata, saab siseneda raku tuuma ning reguleerida geenide transkriptsiooni (lisa 2). Slusarski *et al.* (1997) poolt esmakordselt kirjeldatud G-valguga seotud WNT/FZD signaalirajada on hakatud nimetama mittekanooniliseks WNT/Ca²⁺ signaalirajaks, mille aktivatsioon viib rakusisese olulise regulaatoriooni Ca²⁺ kontsentratsiooni tõusuni. Vastava

signaaliraja aktiveerimine kutsub esile mitmeid rakusiseseid vastuseid, peamiselt Ca^{2+} -sõltuvate kinaaside aktiveerimise ning geenide transkriptsiooni (Schulte and Wright 2018; Niehrs 2012; Schulte 2010; Cadigan and Liu 2006). Konkreetse signaaliraja aktiveerimine sõltub WNT-ligandist, FZD-retseptorist ja koretseptori(te)st ning mitmed aspektid retseptor-ligandi kompleksi moodustumise ning signaaliradade aktiveerimise juures on alles uurimisjärgus (Schulte and Wright 2018; Schulte 2015; Niehrs 2012). Kuna häired FZD-retseptorite poolt reguleeritud signaaliradades põhjustavad tõsiseid patoloogilisi muutuseid, näiteks embrüogeneesi häired, närvirakkude degeneratsioon (nt Alzheimeri tõbi, Huntingtoni tõbi) ja vähkkasvajad (nt rinnavähk, kopsuvähk, munasajavähk), võimaldaks FZD-retseptorite selektiivsem aktiveerimine ning aktivatsioonimehhanismi ja aktiveeritava signaaliraja kindlakstegemine kasutada FZD-retseptoreid terapeutiliste sihtmärkidena (Niehrs 2012; Turku *et al.* 2021; Alrefaei 2021).

3.2 Sissejuhatus metoodikatesse

3.2.1 MultiBacMam tehnoloogia

Rakkude struktuursed ja füsioloogilised omadused on määratud paljude erinevate geenide poolt kodeeritavate valkudega. Rakus moodustavad valgud suuremaid komplekse, millel on oluline roll rakusiseste protsesside reguleerimisel. Seetõttu võimaldaks mitmete valkude koos ekspresseerimine täpsemini analüüsida valkude omavahelisi interaktsioone ning nende mõju rakkude talitlusele. Sageli on tarvis rakukomponentide ja/või ekspresseeritavate valkude visualiseerimiseks ekspresseerida koos huvipakkuvate valkudega ka fluorestsentsvalke. Mitmete valkude koos ekspresseerimise meetodid on välja töötatud nii eukarüootsete kui ka prokarüootsete rakkude jaoks (Perrakis and Romier 2008).

Prokarüootsetes rakkudes (nt *Escherichia coli* (*E.coli*)), mis tänu lihtsale talitlusele, kõrgele valkude ekspressioonitasemele ja madalale hinnale on laialdast kasutust leidnud prokarüootsete valkude (koos) ekspresseerimiseks, on eukarüootsete päritoluga valkude (koos) ekspresseerimine raskendatud. Seda eelkõige eukarüootsete valkude suuruse, spetsiifilise valkude pakkimismehhanismi ning valgu aktiivsuse säilitamiseks vajalike posttranslatoorsete modifikatsioonide tõttu (Sari *et al.* 2016; Perrakis and Romier 2008).

Eelnevast tulenevalt kasutatakse eukarüootsete valkude koos ekspresseerimiseks eukarüootseid rakke, peamiselt putukarakke ning imetajarakke (Perrakis and Romier 2008). Tuntuim eukarüootne posttranslatoorne modifikatsioon on N-glükosüleerimine, mis stabiliseerib valgu struktuuri, kaitseb valku proteolüüsi eest, kuid on seotud ka rakkudevaheliste interaktsioonide ja signaaliülekanedega.

Ehkki putukarakud on suutlikud ekspresseerima suurtes kogustes korraga mitmeid valke, ei vasta sageli putukarakkudes toodetud N-glükaanide struktuur täpselt imetajarakkude toodetule (Rendi *et al.* 2008; Harrison and Jarvis 2006). Lisaks erineb putukarakkude membraani koostis oluliselt imetajarakkude membraanist, eelkõige membraanilipiidide ning madalama kolesterooli sisalduse poolest, mis võib mõjutada membraanvalkude aktiivsust (Marheineke *et al.* 1998). Eelnevast tulenevalt ei pruugi ainuüksi putukarakkude kasutamine valkude ekspresseerimiseks olla teatud rakenduste jaoks sobilik. (Mansouri *et al.* 2016).

Mitme valgu koos ekspresseerimise meetodeid imetajarakkudes on mitmeid. Näiteks võib transfektsioonil mitme eraldiseisva plasmiidiga toimuda vaid ühte valku kodeerivat geeni sisaldava plasmidi vastuvõtmine rakku ning seetõttu ei pruugi valkude ekspressioonitase imetajarakkude populatsioonis olla ühtlane ega korratav. Lisaks võivad teatud meetodite rakendusalasid piirata ka valkude ekspressiooni lühiajaline stabiilsus ning erinevad posttranslatoorsed modifikatsioonid, mis võivad muuta valgu originaalstruktuuri ja -funktsiooni (Mansouri and Berger 2014). Kuna elavate rakkude näol on tegu ka väga komplekssete süsteemidega, kasvab vajadus uute, efektiivsemate ning vähem komplekssete ekspressioonisüsteemide järele, mis võimaldaksid imiteerida võimalikult lähedaselt rakusiseste valkude loomupärast funktsiooni.

Antud töös kasutatakse huvipakkuvate valkude koos ekspresseerimiseks modifitseeritud MultiBacMam™ süsteemi (Geneva Biotech 2021), mille etappe võiks kirjeldatud järgnevalt:

1) **Huvipakkuvaid valke kodeerivaid geenijärjestusi sisaldava rekombinantse plasmidse DNA genereerimine Cre-LoxP reaktsioonil**

Huvipakkuvate valkude koos ekspresseerimiseks on vajalik esmalt ühildada Cre-LoxP reaktsioonil huvipakkuvaid valke kodeerivaid geenijärjestusi sisaldavad plasmiidid. Vastavad geenijärjestused on kloneeritud nii aktseptor- kui ka doonorplasmiididesse, mis sisaldavad 34 aluspaari (bp, ingl *base pair*) pikkust LoxP-nimelist järjestust. LoxP palindroomsetele aladele seondub spetsiifiliselt 38 kDa suurune valk Cre-rekombinaas, ühildades erinevatest plasmiididest pärinevad DNA lõigud (Mansouri and Berger 2014). Geenid, mida tahetakse transleerida nii putuka- kui ka imetajarakkudes asuvad nn topelt funktsiooniga promootori all, mida tunnevad ära nii putuka- kui ka imetajarakud. Seetõttu saab vastavate valkude ekspresseerimiseks MultiBacMam™ süsteemis kasutada ühte rekombinantset plasmidi (Mansouri *et al.* 2016; Sinah *et al.* 2012).

Töö kontekstis on ekspresseeritavateks huvipakkuvateks valkudeks:

- a) modifitseerimata FZD4-, 5-, 6- ja 7-retseptorid ja fluorestsentsmärgistatud FZD10-, ja modifitseeritud FZD6-retseptor
- b) rakumembraani märgistav tsüaansiniselt fluorestseeruv valk (CFP, ingl *cyan fluorescent protein*)
- c) vesikulaarse stomatiidi viiruse glükoproteiin G (VSVG, ingl *vesicular stomatitis virus glycoprotein G*), geneetilise informatsiooni efektiivsemaks kandumiseks imetajarakkudesse ((bakulo)viiruste vahendusel) (Mansouri *et al.* 2016; Mazina *et al.* 2012). Barsoum *et al.* (1997) näitasid, et valkude ekspressioonitaseme tõus imetajarakkudes on seotud viiruse kapsiidi (sh geneetilise materjali) vabanemisega rakusisest vesiikulist.
- d) retroviiruse *Rous sarcoma* (RSV, ingl *Rous sarcoma virus*) genoomis paiknev *gag*-valk, VLPde pungumiseks imetajarakkude plasmamembraanist. Täpsemalt kasutatakse antud töös modifitseeritud N-terminaaliga *gag*-valku (SuperM_RSV), mis suurendab VLPde pungumise efektiivsust imetajarakkude membraanist veelgi (Callahan and Wills 2003; Dick and Vogt 2014) (lisa 3).

2) Rekombinantse plasmidi sisseviimine baculoviiruse genoomi (bakmiidi)

Rekombinantne plasmid viiakse bakmiidi transpositsioonelementide (Tn7L ja Tn7R) ning nn abistaja plasmidi vahendusel (Sari *et al.* 2016; Luckow *et al.* 1993). Enim uuritud ning kasutamist leidnud bakuloviirus on *Autographa californica* multikapsiidne nukleopolühedroviirus (AcMNPV), mis sisaldab 134 kbp pikkust kaheaheelalist tsirkulaarset genoomi ning võimaldab transfektsiooni käigus üle viia üle 100 kbp mahus geneetilist materjali (Mansouri *et al.* 2016). Transpositsiooni õnnestumist saab kontrollida sinise/valge koloonia selektsioonil, mis võimaldab eristada huvipakkuvaid geene sisaldavad bakmiidid (lisa 4).

3) Rekombinantsete bakuloviiruste genereerimine

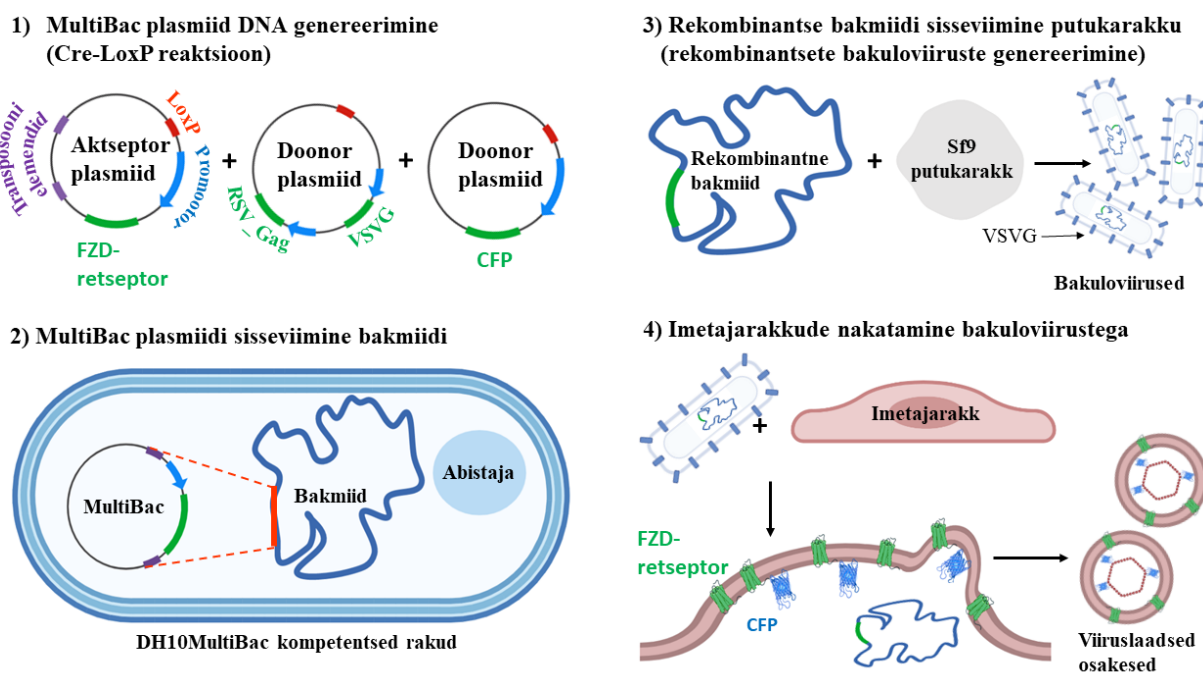
Transpositsioonil genereeritud rekombinantne bakmiid transfekteeeritakse putukarakkudesse rekombinantsete bakuloviiruste genereerimiseks. Bakuloviirused on võimelised sisenema nii imetaja- kui ka putukarakkudesse, kuid imetajarakkudest väljuma bakuloviirused võimelised ei ole. Seetõttu ei põhjusta bakuloviirused imetajarakkudes infektsiooni (Mansouri *et al.* 2016) ning nende kasutamise laboritingimustes on ohutu (bioohutuse tase 1). Levinuim putukarakuliin bakuloviiruste efektiivseks paljundamiseks on

putuka *Spodoptera frugiperda* munasarjast eraldatud Sf9 rakuliin. Töös kasutatakse ära Sf9 rakkude omadust kasvada suspensioonina, mis võimaldab kasvatada korraga suuri rakukoguseid ning produtseerida rohkem bakuloviiruseid.

4) Imetajarakkude nakatamine rekombinantsete bakuloviirustega

Imetajarakkudes huvipakkuvate valkude ekspresseerimiseks nakatatakse genereeritud bakuloviirustega imetajarakke. Imetajarakkude membraanist punguvad VLPd võtavad kaasa ka rakumembraani komponente, milleks võivad olla GPCRde perekonda kuuluvad membraanretseptorid (Nooraei *et al.* 2021). Eelnevast lähtudes sisaldavad pungunud VLPde lipiidümbrised ka imetajarakkudes ekspresseeritud FZD-retseptorid ning CFPd. Pungunud VLPd on vajalik puhastada ning meetodi valik sõltub peamiselt VLPde edasise rakendusest. Antud töös kasutati VLPde puhastamiseks tangentsiaalvoolu filtratsiooni (TFF, ingl *tangential flow filtration*), mis võimaldab VLPde kontsentreerimist, puhastamist rakuääkidest ning ka imetajarakkude kasvusöötme vahetamist (Nooraei *et al.* 2021; HansaBioMed).

Joonisel 2 on toodud töös kasutatud MultiBacMam™ tehnoloogia lihtsustatud põhimõtteskeem.



Joonis 2. MultiBacMam™ tehnoloogia lihtsustatud põhimõtteskeem. 1) Cre-LoxP reaktsioon huvipakkuvaid valke kodeerivaid geenijärjestusi sisaldava rekombinantse plasmidi genereerimiseks, 2) Rekombinantse plasmidi sisseviimine bakuloviiruse genoomi, 3) Rekombinantse bakmiidi sisseviimine putukarakkudesse ja rekombinantsete bakuloviiruste genereerimine, 4) Imetajarakkude nakatamine rekombinantsete bakuloviirustega. Näidatud on

nakatamisjärgselt imetajarakkude membraanis ekspresseeritavad FZD-retseptorid ja fluorestsentsvalk CFP ning ka imetajarakkudest pungunud VLPd, mis sisaldavad enda lipiidümbrises imetajarakkude membraanis ekspresseeritud valke.

3.2.1.1 Bakuloviiruste tiitri määramine

Valkude ekspressioonitase imetajarakkudes sõltub eelkõige viirusosakeste osakaalust rakkude suhtes ehk nakatuskordsusest (MOI, *multiplicity of infection*). Seega on optimaalse ning korratava ekspressioonitaseme tagamiseks vajalik määrata nakatamisvõimeliste viirusosakeste kontsentratsioon ehk tiiter. Tiitri määramise meetodid põhinevad peamiselt rakkude nakatamisjärgsetel morfoloogilistel muutustel, kuid kasutusel on ka näiteks kvantitatiivne reaalaaja polümeraasi ahelreaktsioon (PCR, ingl *polymerase chain reaction*) ning läbivoolu tsütomeetria. Rakkude nakatamisjärgsel diameetri muutusel põhinev meetod on optimaalne standardvigade (keskmiselt 13%), ajakulu (kuni 24 h) ning hinna poolest (Roldão *et al.* 2009). Meetod põhineb nähtusel, et bakuloviirustega nakatatud putukarakud lõpetavad jagunemise ning rakkude diameetri suurenemine 24 h möödudes on põhjustatud vaid esmakordsest nakatamisest. Sellest tulenevalt on võimalik leida seos lisatud 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). Töös kasutati rakkude diameetri muutuse ning bakuloviiruste kontsentratsiooni määramiseks pildianalüüsil põhinevat ICSE-tööriista (ingl *image-based cell-size estimation*), mis on välja arendatud Tartu Ülikooli Bioorgaanilise keemia õppetooli töörühmas (Laasfeld *et al.* 2017).

3.2.2 Fluorestsentsnähtused- ja mikroskoopia

Bioloogiliste proovide uurimiseks kasutatakse laialdaselt fluorestsentsnähtuseid. Fluorestsents on valguse kiirgumine aineist, mis on neelanud ergastamiseks kasutatud ultravioletse kiirguse- või nähtava valguse kvandi. Kuna enamik bioloogilisi proove naturaalselt ei fluorestseeru, siis lisatakse proovidele fluorofore - keemilisi ühendeid, mis on võimelised neelama ergastatavat kiirgust ja ergastamise tulemusel kiirgama valgust. Proovi märgistamiseks kasutatavateks fluorfoorideks võivad olla näiteks valgud, kui ka väikesed orgaanilised molekulid. Bioloogiliste proovide märgistamiseks on laialdast kasutust leidnud roheliselt fluorestseeruvate valkude (GFP, ingl *green fluorescent protein*) perekonda kuuluvad valgud. Nende eeliseks on spontaanne fluorofoori moodustumine, mis ei vaja ensümaatilist katalüüsi. On võimalik viia uuritavasse proovi vastavat

valgu kodeeriv geenijärjestus, mis võimaldabki ekspresseerida organismis fluorestsentsvalku. Üheks töös kasutatud fluorofooriks on GFP perekonda kuuluv valk CFP (Lakowicz 2006b; Kojima *et al.* 1998), mis saab membraaniga seonduda valgu külge post-translatoorsetel modifikatsioonidel liidetud rasvhappe rühmade palmitüül ja müristüül kaudu (tähistatud PMCFP) (Resh 2006; James and Olson 1989). Proovide märgistamiseks kasutatakse ka madalamolekulaarseid orgaanilisi molekule. Üheks näiteks sellisest ühendist on fluorestseiini derivaat FAsH-EDT₂, mille fluorestsentsomadused avalduvad tetratsüsteiinsela aminohappejärjestusele (Cys-Cys-X-X-Cys-Cys) seondumisel (Adams *et al.* 2002). On näidatud, et vesinike asendamine fluooridega parandab oluliselt fluorofoori neelduvust ja fotostabiilsust ning sellest tulenevalt kasutatakse ka töös ühendi fluoro-asendatud versiooni F₂FAsH-EDT₂ (Spagnuolo *et al.* 2006).

Fluorestsentsmikroskoopia on fluorestsentsnähtusel põhinev mikroskoopia liik, mida kasutatakse laialdaselt bioloogiliste proovide visualiseerimiseks. Antud töös kasutatakse kolme fluorestsentsmikroskoopia erinevat alaliiki – laivälja epifluorestsentsmikroskoopia, kõrglahutusega laminaarse optilise lehe mikroskoopia (HILO, ingl *highly inclined and laminated optical sheet microscopy*) ja täieliku sisepeegeldumise fluorestsentsmikroskoopia (TIRF, ingl *total internal reflection fluorescence microscopy*) (lisa 5).

3.2.2.1 Täieliku sisepeegeldusega fluorestsentsmikroskoopia (TIRF-mikroskoopia)

TIRF-mikroskoopia põhineb valguse täielikul sisepeegeldumisel kahe erineva murdumisnäitajaga (n_1 ja n_2) keskkonna piirpinnal. Valguskiire levimine kahe erineva keskkonna vahel oleneb valguskiire pealelangemisnurgast θ_1 ja kriitilisest nurgast θ_c (θ_c väärtus sõltub keskkondade murdumisnäitajatest). Valguskiir, mis langeb pinnale kriitilisest nurgast väiksemate väärtuste korral, murdub keskkonda n_2 . Kui valguskiire pealelangemisnurk muuta aga kriitilisest nurgast suuremaks, toimub kahe keskkonna piirpinnal valguskiire täielik sisepeegeldumine tagasi suurema murdumisnäitajaga keskkonda n_1 (lisa 5). (Poulter *et al.* 2015).

Täieliku sisepeegeldumisega kaasneb elektromagnetiline sumblaine (ingl *evanescent field*). Sumblaine intensiivsus on kõrgeim kahe erineva murdumisnäitajaga pinna lähedal ning väheneb eksponentsiaalselt pinnast kaugenedes. Sellest tulenevalt on võimalik TIRF mikroskoopilisel analüüsil ergastada fluorofoore, mis asuvad pinnast kaugusel ~ 100 nm. Sellest tulenevalt on TIRF mikroskoopias saavutatav kõrge signaal-müra suhe, mis võimaldab läbi viia analüüse ka üksikmolekulide tasemel. Üksikmolekulide tasemel analüüs tagab meetodi kõrge selektiivsuse ja tundlikkuse (Axelrod 2012).

4. EKSPERIMENTAALNE OSA

4.1 MultiBac plasmiidide genereerimine

4.1.1 Rekombinantse plasmiidi konstrueerimine Rous Sarcoma viiruse gag-valgu ekspresseerimiseks

VSVG-d ning gag-valku kodeerivat geeni sisaldava doonorplasmiidi pDC_I_VSVG_M_SuperM_RSV_gag konstrueerimiseks lõigati plasmiid pDC_M_SuperM_RSV_gag (valmistatud S. Veikšina poolt, lähtudes SuperM-RSV plasmiidist, mis oli kingitud Pennsylvania Osariigi Ülikooli professor John W. Wills poolt) restriksiooniensüümiga BstXI (FastDigest, Thermo Fisher Scientific) ja *hom*ing-endonukleaasiga PI-SceI (New England BioLabs), inkubeerides 1 tund temperatuuril 37 °C PI-SceI puhvris (New England BioLabs). Ensüümid inaktiveeriti 20 minuti jooksul 75 °C juures. Plasmiid pDC_I_VSVG (valmistatud S. Veikšina poolt, lähtudes Geneva Biotech lähteplasmiididest) lineariseeriti ensüümiga BstXI (FastDigest, Thermo Fisher Scientific), inkubeerides 1 tund temperatuuril 37 °C FastDigest puhvris ning ensüüm inaktiveeriti 5 minuti jooksul 80 °C juures. pDC_I_VSVG defosforüleeriti FastAP fosfataasiga (Thermo Fisher Scientific) vastavalt tootja protokollile. Lõigatud fragmentid lahutati agaros-elektroforeesil (Sub-Cell GT rakk ja PowerPac HC toiteplokk, Bio-Rad) (1% agaros (Sigma) Tris-atsetaat-EDTA (TAE) puhvris (1 mM EDTA (Merck), 40 mM Tris (Sigma), pH 8,3 tagati 30% äädikhappe (Lachner) lisamisega) ja visualiseeriti UV-transillumiinatsiooniga (CleaverScientific Ltd) 1 µg/ml etiidiumbromiidi (AppliChem) juuresolekul. Õige pikkusega fragmendid lõigati geelist välja ja lõigatud produktid puhastati vastavalt FavorPrep™GEL/PCR Purification Kit protokollile. Puhastatud produktid ligeeriti T4 DNA ligaasiga (Thermo Fisher Scientific) vastavalt tootja protokollile ja ligeeritud produkt transformeeriti kompetentsetesse *E.coli* tüve pirHC rakkudesse (Geneva Biotech) kuumašoki teel. Kuumašokk viidi läbi 35 sekundi jooksul 42 °C vesivannis, peale mida asetati rakud 5 minutiks jääle ja seejärel lisati toasooja SOC söödet (2% trüptoon (Lab M), 0,5% pärmiekstrakt (Lab M), 10 mM NaCl (AppliChem), 2,5 mM KCl (AppliChem), 10 mM MgCl₂ (AppliChem), 10 mM MgSO₄ (AppliChem), 20 mM glükoos (KEBO)) ning inkubeeriti 6 tundi 37 °C juures horisontaalses asendis, loksutamiskiirusega 250 rpm). Transformeeritud rakkud selekteeriti agar-plaatidel (2% agar (Sigma) *L-Broth* (LB) söötmes (AppliChem)) 25 µg/ml klooramfenikool (Sigma) antibiootikumi juuresolekul.

Õigete produktidega kolooniate valimiseks viidi läbi PCR kolooniatest plaadilt juhuslikult valitud kolooniatega. PCR reaktsiooni läbiviimiseks lisati lahusele ruumalasutes 1:9 polümeraasi ahelreaktsiooni segu MilliQ-s, mis sisaldas FIREPol® DNA polümeraasi (Solis BioDyne) ning praimereid Forward RSV gag (taagatatcatggaagccgtcataaaggtg, IDT) (10 pmol/µl) ja Reverse RSV gag (attatctagagcggaatagccagatgtagc, IDT) (10 pmol/µl). PCR reaktsioon viidi läbi termotsükleris Mastercycler Gradient (Eppendorf). Geelelektroforeetilise analüüsi põhjal väljavallitud kolooniaid kasvatati plasmidi paljundamise eesmärgil LB söötmes (25 µg/ml klooramfenikool) 16 – 24 tundi 37 °C juures, loksutamiskiirusega 250 rpm ning puhastati lüsaadist MidiPrep Kit-iga (Favorgen) vastavalt tootja protokollile. Plasmidse DNA kontsentratsiooni ja puhtuse astme määramiseks kasutati spektromeetrit Thermo Scientific NanoDrop 1000. Puhastatud produktide täiendavaks kontrollimiseks teostati restriksioonanalüüs FastDigest Thermo Fisher Scientific ensüümidega BglII, Eco147I, BstXI.

4.1.2 Plasmiidide ühildamine Cre-LoxP rekombinatsiooniga

Kasutades Cre-rekombinaasi (vastavalt tootja protokollile, New England BioLabs) ühendati genereeritud plasmiid pDC_I_VSVG_M_SuperM_RSV_gag (doonor) Frizzled-retseptoreid kodeerivaid geene sisaldavate plasmiididega (kokku 9 aktseptorit) (aktseptorplasmiidid valmistatud S. Veikšina poolt lähtudes plasmiidides, mis olid kingitud professor G. Schulte (Karolinska instituut) poolt või saadud Addgenist). Ühildatud plasmiid transformeeriti kompetentsetesse *E.coli* tüve DH5α rakkudesse (NEB) kuumašoki teel. Selekteerimiseks kasutati plaate antibiootikumidega klooramfenikool (25 µg/ml) ja gentamütsiin (7 µg/ml) (MP Biomedicals) LB söötmes. Puhastatud plasmiididega teostati restriksioonanalüüs FastDigest Thermo Fisher Scientific ensüümidega NheI ja NotI vastavalt tootja protokollile.

Valitud plasmiidid ühildati järgneval Cre-LoxP rekombinatsioonil plasmiidiga pDS_IM_MyrPalm_CFP (doonor) (valmistatud S. Veikšina poolt, lähtudes Addgene plasmiidist #14867) eespool kirjeldatud tingimustel, kuid selekteerimisel kasutati lisaks ka antibiootikumi spektinomütsiin (50 µg/ml) (Sigma). Rekombinantse plasmidi järjestuse kontrollimiseks kasutati restriksioonanalüüsil FastDigest Thermo Fisher Scientific ensüümi MunI vastavalt tootja protokollile.

4.2 Rekombinantsete bakmiidide genereerimine

Rekombinantse bakmiidi genereerimiseks transformeeriti 200 ng eelnevalt genereeritud MultiBac plasmidi kompetentsetesse *E.coli* tüve DH10MultiBac rakkudesse (GenevaBiotech). Seleksiooniks kasutati plaate antibiootikumidega kanamütsiin 50 µg/ml (Gibco), tetratsükliin 10 µg/ml (Sigma), gentamütsiin 7 µg/ml (MP Biomedicals) ning valge/sinise koloonia seleksiooniks X-gal (100 µg/ml, Thermo Scientific) ja IPTG (40 µg/ml, Fermentas). Plaatide inkubeeriti 24 tundi 37 °C juures. Valge/sinise koloonia seleksioon võimaldab eristada MultiBac plasmidi sisaldavaid ja mittesisaldavaid rakke, mis kasvavad seleksiooniplaadil vastavalt valgete ja siniste kolooniatena. Saadud rekombinantsete bakmiidid puhastati MidiPrep Kit-iga (Favorgen) vastavalt tootja protokollile.

4.3 Bakuloviiruste tootmine Sf9 rakkudes

Bakuloviiruste genereerimiseks kasutati *Spodoptera frugiperda* munasarjakoest eraldatud Sf9 rakuliini (Invitrogen), mida kasvatati Erlenmeyer'i kolbides, seerumivabas rakusöötmes Insectagro® Sf9 (Corning), temperatuuril 27 °C ja CO₂ vabas keskkonnas. Rakkude loendamiseks segati rakud esmalt 0,4% trüpaansinisega (Sigma) suhtes 1:1 ning rakkude koguarv (sh ka elusrakkude osakaal) määrati läbivalt kogu töös Bio-Rad TC10™ Automated Cell Counter-iga. Sf9 rakkude transfekteeimiseks kanti esmalt rakud 6-süvendilisele rakukasvatustalale (Nunc) kontsentratsiooniga 0,6 mln rakku süvendis. 6-süvendilisele rakukasvatustalale kantud rakke inkubeeriti 24 tundi 27 °C juures CO₂ vabas keskkonnas. Inkubeerimisjärgne transfekteeimine viidi läbi vastavalt transfektsioonireagenti Lipofectamine™ LTX ja reagenti PLUS™ transfektsiooniprotokollile (Thermo Fisher Scientific). Transfekteeitud rakke inkubeeriti 27 °C juures CO₂ vabas keskkonnas kolm kuni viis päeva, mille jooksul jälgiti nakatumismärke – rakkude elumuse vähenemine ja diameetri muutus ning rakukasvatustalade täituvus. Süvendist kogutud tõstearvuga 0 (P, ingl *passage*) viiruse edasiseks amplifitseerimiseks lisati viirus 10 ml-le aktiivses kasvufaasis olevate rakkude suspensioonile (1 mln rakku/ml). Rakke inkubeeriti 27 °C juures CO₂ vabas keskkonnas pidevalt loksutades, loksutamiskiirusega 120 - 150 rpm (sõltuvalt proovi ruumalast) ning jälgiti igapäevaselt rakkude läbimõõdu suurenemist ja elumuse langust. P1 viirus koguti rakkude 50%-lise või madalama elumuse juures. Viiruse kogumiseks tsentrifuugiti rakuksuspensiooni 10 minutit 3000 rpm juures 10 minutit, mille järel filtreeriti pealiskihis läbi 0,45 µm poori suurusega pindaktiivsete ainete vaba tselluloosatsetaati (SFCA, ingl *surfactant-free cellulose acetate*) filtri (VWR). Kogutud viiruseid säilitati valguskindlalt 4 °C juures. Edasisteks

mikroskoopiakatseteks optimaalse viiruse ruumala kasutamiseks amplifitseeriti P1 viirused vajadusel kõrgema nakatamisvõimeliste viirusosakeste kontsentratsioonini ehk tiitrini.

4.3.1 Bakuloviiruste tiitri määramine

Tiitrimiskatsete jaoks kanti Sf9 rakud Insectagro® söötmes 24-süvendilisele rakukasvatusplaadile (Nunc) (tihedusega 0,2 miljonit rakku süvendis), mida seejärel inkubeeriti rakkude plaadile kinnitumiseks pool tundi 27 °C juures CO₂ vabas keskkonnas. Viirusest valmistati 11 kolmekordset seerialahjendust Insectagro® söötmes. Seejärel kanti viiruste lahjendused ja viiruse tühi-proov (s.o ainult sööde) duplikaatidena 24-süvendi plaadile kinnitunud rakkudele ja plaati inkubeeriti 24 tundi 27 °C juures CO₂ vabas keskkonnas. Inkubatsiooniperioodi möödudes tehti igast süvendist 4 pilti mikroplaadilugejaga Cytation™ 5 (BioTek). Saadud piltide põhjal kasutati nakatamisjärgse rakkude diameetri suurenemise mõõtmiseks Apareciumi tarkvara ICSE-tööriista (Laasfeld *et al.* 2017). Koostati eksperimentaalandmete graafik rakkude diameeter sõltuvuse kohta viirusosakeste kontsentratsioonist (lahjendusfaktorist), millelt leiti regressioonanalüüsil EC₅₀ väärtus ehk pool maksimaalsest efektiivsest viirusosakeste kontsentratsioonist. EC₅₀ väärtus on (Valem 1 kaudu seotud viiruse kontsentratsiooniga c, millest omakorda saab arvutada MOI-indeksi (Valem 2 põhjal.

$$c = \frac{N}{2 * EC_{50} * V} \text{ (Valem 1)} \quad c = MOI * \frac{N}{V} \text{ (Valem 2)}$$

c – viiruse kontsentratsioon ehk nakatusvõimeliste viirusosakeste (ivp, ingl *infectious viral particle*) arv (ivp/ml)

N – rakkude arv süvendis nakatamise alghetkel

V – lahusti ruumala süvendis (ml)

MOI – nakatuskordsus

4.4 Genereeritud bakuloviiruste valideerimine imetajarakkudega

4.4.1 Bakuloviiruste geeniülekanne imetajarakkudesse

Inimese munasarjavähi rakuliini SK-OV-3 rakke (ATCC HTB-77) kasvatati 6-süvendilisel plaadil (Thermo Fisher Scientific) McCoy's 5A rakusöötmes, millele on lisatud L-glutamiin (Sigma), 10% FBS (Gibco), streptomütsiin 0,1 mg/ml (PAA), penitsilliin 100 U/ml (PAA) (Thermo Fisher Scientific) temperatuuril 37 °C ja CO₂ atmosfääris. Edasisteks mikroskoopiakatseteks tõsteti rakud ümber 8-süvendilistesse kambritesse (Imaging Chamber CG, Zell-Kontakt). Selleks eemaldati rakkudelt esmalt McCoy's 5A sööde ning rakke loputati

fosfaatpuhverdatud soolalahusega (DPBS, Corning). Kasvatamisplaadilt lahtitulemiseks lisati rakkudele 250 µl 0,05 % trüpsiin-etüleendiamiintetraatsetaat (EDTA) lahust (Sigma Aldrich), milles inkubeeriti rakke 5 minutit temperatuuril 37 °C ja CO₂ atmosfääris. Seejärel kanti rakud kambritesse McCoy's 5A söötmes, tihedusega 20000 rakku süvendis nii, et koguruumala igas süvendis oleks 400 µl. Plaadile kinnitunud rakkudele lisati viiruste suspensioonid MOI väärtusega 5 (kui ei ole öeldud teisiti), 1 mM naatriumbutüraadi (NaBu) juuresolekul. Kontroll-rakkudele bakuloviirust ei lisatud. Rakke inkubeeriti 48 tundi temperatuuril 37 °C ja CO₂ atmosfääris. Nakatamisjärgse inkubatsiooniperioodi järel pesti rakud 2 korda DPBS lahusega ning mikroskoopiakseteks lisati rakkudele 400 µl MEMO® sööde, lisandi A juuresolekul (Cell Guidance Systems).

4.4.2 FZD6-FlAsH-TFP biosensori märgistamine F₂FlAsH-iga

F₂FlAsH-EDT₂ lahuse valmistamiseks tehti esmalt 25 mM etaan-1,2-ditiool (EDT, Fluka) lahus ning 2 mM F₂FlAsH (sünteesitud TBD Biodiscovery poolt) lahus DMSO-s. Seejärel segati lahused kokku ruumalavahekorras 1:1 (1 mM F₂FlAsH-EDT₂ lahus) ning inkubeeriti 10 minutit toatemperatuuril. Bakuloviirusega hFZD6_FlAsH_TFP_VSVG_RSV nakatatud ja nakatamata SK-OV-3 kontroll-rakkudele lisati 1 mM F₂FlAsH-EDT₂ lahus MEMO® puhvis, et lahuse lõppkontsentratsioon mikroskoopiakambrite süvendites oleks 2,5 µM. Rakke inkubeeriti F₂FlAsH-EDT₂ lahuses 1 tund 37 °C juures CO₂ atmosfääris.

4.4.3 FZD4, FZD5, FZD6, FZD7 immunofluorestsentsanalüüsid

SK-OV-3 rakke nakatati bakuloviirustega hFZD4_VSVG_RSV, hFZD5_VSVG_RSV, hFZD6_VSVG_RSV, hFZD7_VSVG_RSV ning vastavate PMCFPga märgistatud analoogidega. Pärast 48 tunnist nakatamisjärgset inkubatsiooniperioodi pesti rakud 2 korda 400 µl DPBS lahusega. Rakkude fikseerimiseks mikroskoopiakambrites kasutati 3% glüoksaali (Sigma Aldrich) lahust 20%-lises etanoolis, mille pH oli viidud 4,5-ni äädikhappe lisamisega (Sigma Aldrich) (fikseerimislahus). Rakke inkubeeriti fikseerimislahuses esmalt 30 minutit jääl, millele järgnes inkubeerimine 30 minuti jooksul toatemperatuuril. Seejärel pesti rakud DPBS lahusega. Ülejäänud glüoksaali pleegitamiseks kasutati 100 mM NH₄Cl lahust DPBS lahuses, pleegitamine toimus 20 minuti jooksul toatemperatuuril. Rakud pesti seejärel DPBS lahusega, lisati 2,5% veiste seerumi albumiin (BSA) (Fraction V, Thermo Fisher Scientific) ja 0,1% Triton X-100 (BioTop) DPBS lahuses (permiabiliseerimis- ja blokeermislahus) ning inkubeeriti 20 minutit. Primaarsete

antikehadena kasutati FZD4-retseptori jaoks anti-inimese/hiire Frizzled-4 Alexa Fluor® 647-ga konjugeeritud antikeha (FAB194R, R&D Systems), FZD5-retseptori jaoks anti-inimese FZD5 hiire monoklonaalset antikeha (2D12, NovusBio), FZD6 jaoks anti-inimese FZD6 kitse polükloonaalset antikeha (AF3149, R&D Systems) ning FZD7 jaoks anti-inimese/hiire Frizzled-7 Alexa Fluor® 647-ga konjugeeritud antikeha (FAB1981R, R&D Systems). Rakke inkubeeriti primaarsete antikehadega üleöö 4 °C juures. Seejärel pesti rakud DPBS lahusega. Bakuloviirustega hFZD5_VSVG_RSV ± PMCFP ja hFZD6_VSVG_RSV ± PMCFP nakatatud rakkudele lisati ka sekundaarsed antikehad, vastavalt kitse anti-hiire IgG-Abberior STAR® RED antikeha (Abberior) ja eesli anti-kitse IgG NorthernLight™ NL635 antikeha (R&D Systems). Sekundaarsete antikehadega rakke inkubeeriti tund aega toatemperatuuril ning pesti seejärel kolm korda DPBS lahusega ning lisati ibidi paigalduslahus (Ibidi). Proovidele, mis oli nakatatud PMCFPd mitte-sisaldavate bakuloviirustega, lisati 5 min enne pesemist tuumavärv Hoechst 34580 (Chemodex), lõpliku kontsentratsiooniga 1 µg/ml.

4.4.4 Tangensiaalvoolu filtratsiooniga rakuvaliste osakeste kontsentreerimine ja kasvusöötme vahetamine

SK-OV-3 rakke kasvatati 10 cm Petri tassidel McCoy's 5A söötmes täituvuseni ligikaudu 60% - 70%, 1,5 miljonit rakku Petri tassi kohta. Seejärel nakatati imetajarakke Empty_VSVG_PMCFP ± RSV ja hFZD10_mCherry_VSVG_RSV ± PMCFP bakuloviirustega MOI = 10, 1 mM NaBu juuresolekul. 72 tunnise inkubatsiooniperioodi järel koguti rakkudelt kasvusööde, tsentrifugeeriti 2000 rpm juures ja supernatanti kontsentreeriti 30 korda tangensiaalvoolu filtratsioonil (TFF-Easy, HansaBioMed). Tangensiaalvoolu filtratsioon teostati vastavalt tootja protokollile (HansaBioMed). Saadud 0,5 ml kontsentraat dialüüsiti 2x20 ml DPBS lahuse vastu TFF-l.

4.4.5 Fluorestsentsmikroskoopiakatsed

Bakuloviiruste transfektsiooni efektiivsuse jäädvustamiseks viidi mikroskoopiapildistamine läbi Cytation 5 (BioTek) mikroplaadilugejasse sisseehitatud fluorestsentsmikroskoobiga, kasutades RFP filterkuubikut, RFP LEDi ja 10x objektiivi. Kõik teised mikroskoopiapildistamised tehti kasutades Till iMIC (Till Photonics/FEI) invertteeritud mikroskoopi, mis oli varustatud TIRF APON 60× õli (NA 1,49) ja UPLSAPO 20× õli (NA 0,85) objektiividega (Olympus Corp.). Elavatele imetajarakkudele naturaalse elukeskkonna tagamiseks on mikroskoopi sisse ehitatud spetsiaalne kamber, milles hoitakse temperatuur 37 °C juures ning mis sisaldab 5% CO₂. Proovid

ergastati järjestikku PhoxX laserdiodidega (Omicron-Laserage), mis olid kombineeritud SOLE-6 laserkombainerisse (Omicron-Laserage): 405 nm (120 mW) (Hoechst 34580 jaoks), 445 nm (100 mW) (CFP jaoks), 515 nm (80 mW) (F2FlAsH jaoks) ja 638 nm (150 mW) (Aberior STAR ja NL635 jaoks). mCherry-ga proovid ergastamiseks kasutati 561 nm Cobolt Jive DPSS (106 mW) laserit, mille intensiivust reguleeriti AOTF filtriga. Ergutusvalgus suunati Yanuse skaneerimispeale (ingl *scan head*), mida koos Polytrope'i galvanomeetrilise peegli (Till Photonics/FEI) kasutati laseri positsioneerimiseks laivälja epifluorestsentsiks, TIRF-valgustuseks (ligikaudu 100 nm sügavus) või HILO-valgustuseks. Ergastus- ja emissioonvalgus eraldati spektraalselt pildistusfiltrite kuubikutega, mis sisaldasid kiirtejaagajat zt405/488/561/640rpc või zt442/514/561 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-adaptari (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 (ingl *Z-stack*) (100 kaadrit, 200 nm piesofookuse sammuga 60× objektiivi puhul või 500 nm sammuga 20× objektiivi puhul). Ekspositsiooni aeg oli 50 ms ja EM-võimendus 300 laiaväljalise epifluorestsentsiga pildistamise korral. Ühevärvilised ajapakid (ingl *time-stacks*) (200 kaadrit 20 Hz juures) tehti TIRF ergastamisel superresolutsiooni jaoks ja ühevärvilised ajapakid (8x500 kaadrit 50 Hz juures) nanoosakeste jälgimise analüüsi jaoks kasutades HILO ergastamist. Erinevate fluorestsentsligandide ja -värvide puhul muudeti laseri võimsust, et võimaldada optimaalset signaalitaset (tagati kanalites tuvastatava ristsignaali puudumine). Iga fluorestseeruva ligandi/värvi puhul tehti vähemalt kaks sõltumatut katset.

4.4.6 Andmete ja piltide analüüs

Mittelineaarsete regressioonanalüüside ja t-testi jaoks kasutati GraphPad Prism 5 programmi. Piltide analüüsiks kasutati vabavaralisi programme Fuji ja ICY. Laivälja epifluorestsentsi Z-pakkid dekonvolveeriti EpiDEMICi plugin-ga (Soulez *et al.* 2012). Superresolutsiooni radiaalsete kõikumiste (SRRF, ingl *super-resolution radial fluctuations*) piltide genereerimiseks kasutati NanoJ-SRRF plugin-i (Gustafsson *et al.* 2016) ja fluorestseeruvate nanoosakeste jälgimise jaoks (NTA, ingl *nanoparticle tracking analysis*) NanoTrackJ plugin-i (Wagner *et al.* 2014).

5. TULEMUSED JA ARUTELU

5.1 Frizzled-retseptoreid kodeeriva MultiBacMam-VLP süsteemi loomine

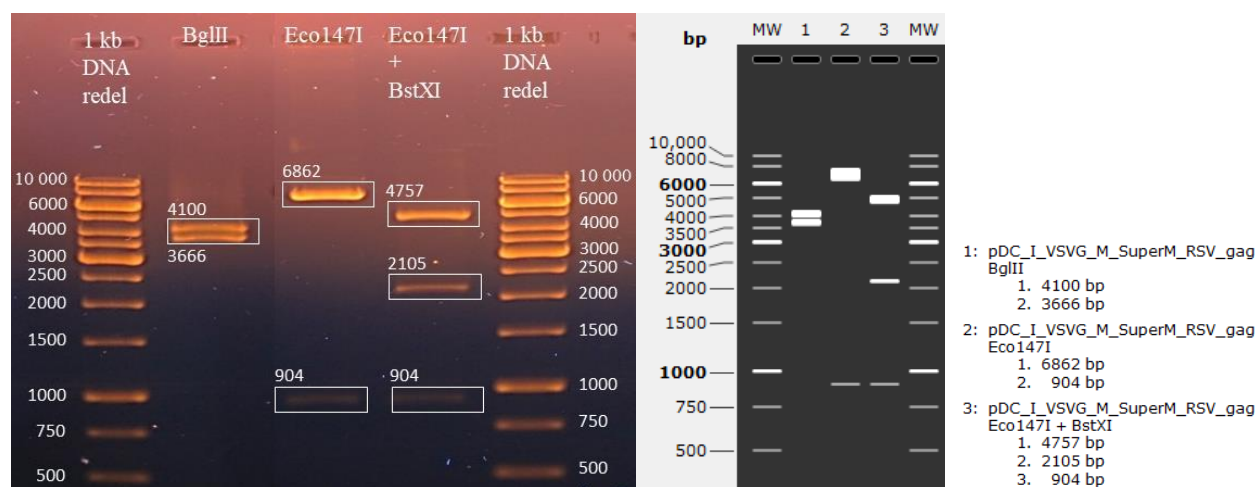
5.1.1 Rekombinantse plasmiiidi konstrueerimine *Rous Sarcoma* viiruse *gag*-valgu ekspresseerimiseks

GPCRde uurimiseks on Tartu Ülikooli Bioorgaanilise keemia õppetoolis loodud modifitseeritud Geneva Biotech MultiBacMam™ tehnoloogial põhinev (Sweet)MultiBac(Mam) plasmiiidide raamatukogu. Kõik raamatukokku kuuluvad plasmiiidid on sekveneeritud Tartu Ülikooli Genoomika Instituudi tuumiklaboris. Raamatukokku kuuluvaid erineva antibiootikumi resistentsusega plasmiiide on võimalik nii eraldiseisvana kui ka Cre-LoxP reaktsioonil rekombineerituna kasutada valkude ekspresseerimiseks putuka- ja/või imetajarakkudes. Raamatukokku kuuluvate plasmiiidide kombinatoorne paindlikkus avab uusi võimalusi GPCRde mitmekülgsemaks uurimiseks.

Osa plasmiiidide raamatukogust on suunatud FZD-retseptorite uurimisele (lisa 6). FZD-retseptoreid kodeerivad geenijärjestused on kloneeritud transpositsioonelemente sisaldavatesse aktseptorplasmiiididesse. Doonorplasmiiidid sisaldavad erinevate funktsioonidega abi-, marker- või regulaatorvalke kodeerivaid geenijärjestusi. Antud töös genereeriti uudne FZD-retseptorite ekspressioonisüsteem imetajarakkudes, mis võimaldab imiteerida võimalikult lähedaselt FZD-retseptorite funktsiooni nende naturaalses elukeskkonnas, s.o imetajarakkude membraanis ning imetajarakkudele vastava post-translatoorsete modifikatsioonidega.

Süsteemi genereerimiseks täiendati esmalt olemasolevat plasmiiidide raamatukogu uue rekombinantse doonorplasmiiidiga. Uue doonorplasmiiidi üheks lähteplasmiiidiks oli raamatukokku kuuluv, VSVGd kodeerivat järjestust sisaldav doonorplasmiiid, mis tagab efektiivsema geneetilise informatsiooni kandumise imetajarakkudesse viiruste vahendusel ning varasemalt on näidatud, et ka BBVsid saab kasutada transfektsiooniagendina imetajate rakkudesse geneetilise informatsiooni sisseviimiseks (Mazina *et al.* 2012). Teise lähteplasmiiidina kasutati *gag*-valku kodeerivat järjestust (täpsemalt SuperM_RSV_gag) sisaldavat doonorplasmiiidi, mis tagab VLPde pungumise imetajarakkude plasmamembraanist. Kuna VLPd võivad imetajarakkudest pungudes võtta oma lipiidümbrisse imetajarakkude membraanvalgud (sh ka GPCRd), on pungunud VLPsid võimalik kasutada imetajarakkudele alternatiivse, vähem kompleksse süsteemina FZD-retseptorite uurimiseks.

Doonorplasmidi pDC_I_VSVG-M_SuperM_RSV_gag konstrueerimiseks ühendati ligeerimisreaktsioonil ensüümiga BstXI lineaarseks lõigatud plasmiid pDC_I_VSVG (4426 bp) ning ensüümidega BstXI ja PI-SceI lõigatud fragment plasmiidist pDC_M_SuperM_RSV_gag (3340 bp) (lisa 8). Ligeerimisreaktsiooni produktile teostati PCR kolooniaanalüüs praimeritega Forward RSV gag ja Reverse RSV gag. Teoreetiliselt arvutatud PCR produkti (2170 bp) andnud kolooniad puhastati lüsaadist. Väljavalitud koloonia täiendavaks kontrollimiseks viidi läbi restriksioonanalüüs ensüümidega BglII, BstXI ja Eco147I. Teoreetiliste arvutustega kooskõlas olevad produktid on näidatud joonisel 3 toodud geelipildil. Seega õnnestus genereerida töö raames uus, VSVGd ning SuperM_RSV_gag-i kodeerivat järjestust sisaldav doonorplasmiid (lisa 7), mis suurendab raamatukokku kuuluvate plasmiidide kombinatoorset paindlikkust veelgi.



Joonis 3. Plasmidi pDC_I_VSVG-M_SuperM_RSV_gag restriksioonanalüüs ensüümidega BglII, Eco147I ja BstXI. Toodud on eksperimentaalne geelelektroforeesi pilt (vasakul) ning programmis SnapGene® simuleeritud geelelektroforeesi pilt ja teoreetiliselt arvutatud produktide suurused (paremal).

5.1.2 Plasmiidide ühendamine Cre-LoxP rekombinatsioonireaktsioonil

Järgevalt ühendati genereeritud doonorplasmiid (pDC_I_VSVG-M_SuperM_RSV_gag) Cre-LoxP reaktsioonil FZD-retseptoreid kodeerivaid geenijärjestusi sisaldavate aktseptorplasmiididega. Puhastatud Cre-LoxP reaktsiooniproduktidele kontrollimiseks teostati restriksioonanalüüs ensüümidega NheI ja NotI ning lõigatud produktide suurused vastasid teoreetiliselt arvutatud suurustega (lisa 9).

Seejärel viidi läbi järgmine Cre-LoxP reaktsioon, mille käigus ühendati eelnevalt kontrollitud Cre-LoxP reaktsiooni produktidega fluoretsentsmarkerit PMCFPd kodeerivat geenijärjestust sisaldav doonorplasmiid pDS_IM_MyrPalm_CFP. Restriktsioonanalüüsiks valiti ensüüm MunI. PMCFPd kodeeriva geenijärjestuse esinemist rekombinantsetes plasmiidis tõestavad restriktsiooni produktid suurusega ≥ 7567 bp ja 2777 bp ning produkt(id) suurusega 4984 ja/või 5564 bp (Lisa 8). Cre-LoxP reaktsioonidel võib ühineda doonorplasmidi(de)ga ka mitu aktseptorplasmidi, mis teeks võimalikuks mitmete soovimatute geenijärjestuste transpositsiooni bakmiidi. Restriktsioonanalüüsi produkti(de) puudumine 2777 bp ja 4984 bp vahel (lisa 10) viitab aga korrektsele rekombinatsioonile ning ühekordse aktseptorplasmiidile esinemisele. Kokkuvõttes õnnestus töö raames läbiviidud Cre-LoxP reaktsioonidel genereerida 14 MultiBac plasmidi, mis kõik kontrolliti restriktsioonanalüüsidel.

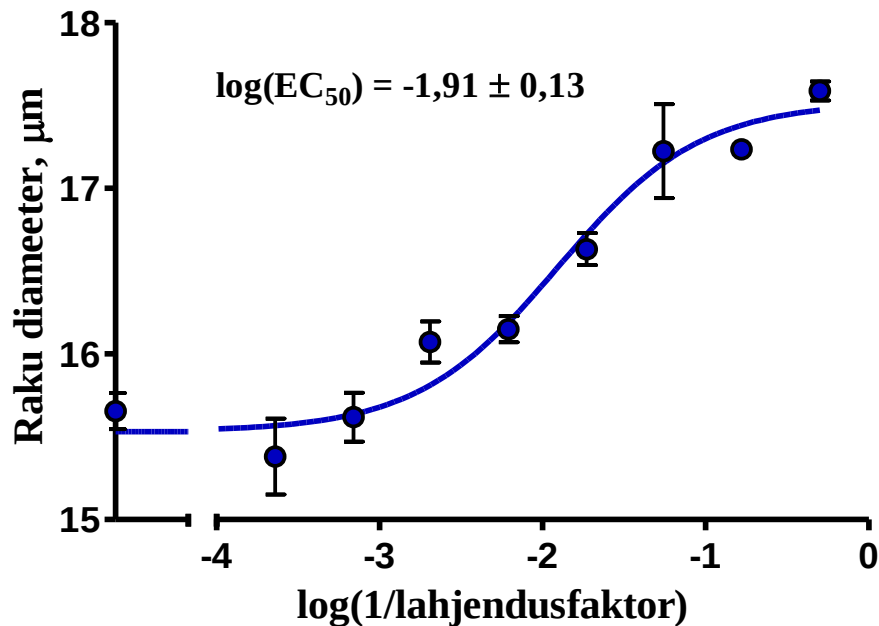
5.2 Rekombinantsete bakuloviiruste genereerimine ja nende tiitri määramine

MultiBac plasmiidid viidi transfektsiooni õnnestumist bakmiidi kontrolliti sinise/valge koloonia selektsioonil, kus kõik MultiBac plasmidi sisaldavad rakud andsid valged kolooniad, mis paljundati ning puhastati. Saadud rekombinantset bakmiidid transfekteeriti Sf9 putukarakkudesse bakuloviiruste genereerimiseks. Töö käigus õnnestus genereerida bakuloviirused kõigist neljateistkümnest MultiBac plasmiidist.

Valkude korratava ning optimaalse ekspresioonitaseme tagamiseks määrati nakatamisvõimeliste viirusosakeste kontsentratsioon ehk tiiter. Tiitri määramiseks kasutati pildianalüüsil põhinevat ICSE-tööriista. Graafikul 1 on kujutatud Sf9 rakkude diameetri suurenemise sõltuvus nakatamisvõimeliste viirusosakeste kontsentratsioonist. Mittelineaarse regressioon-analüüsiga leiti EC50 väärtused, millest omakorda arvutati bakuloviiruse tiiter. Tiiter õnnestus määrata kõigil neljateistkümmel bakuloviirusel (lisa 11). Selleks, et kasutada edasistes katsetes imetajarakkude nakatamiseks optimaalset bakuloviiruse ruumala, amplifitseeriti bakuloviirused vajadusel kõrgema tiitrini.

FZD-retseptorite 4, 5, 6 ja 7 korral oli näha teatavat seost rakkudes ekspresseeritavate valkude arvu ning bakuloviiruste tiitri väärtuste vahel. Nimelt jääb kolme valku (FZD-retseptorid, VSVG, PMCFP) ekspresseerivate rakkude genereeritud bakuloviiruste hulk madalamaks võrreldes kahte valku (FZD-retseptorid, VSVG) ekspresseerivate rakkude genereeritud bakuloviiruste hulgaga. Nähtust võib selgitada asjaoluga, et iga valgu tootmisprotsess nõuab rakkudelt energiat, mistõttu on suurema arvu valkude ekspresseerimise korral rakul vähem energiat bakuloviiruste

genereerimiseks. Sellest tulenevalt nõuab suuremat arvu valke tootvate bakuloviiruste kontsentratsiooni tõstmine rohkem amplifitseerimisetappe. Kõik saadud MultiBac bakuloviirused amplifitseeriti piisava kontsentratsioonini, et kasutada neid edasistest katsetes.



Graafik 1. Sf9 rakkude diameetri sõltuvus bakuloviiruse Empty_VSVG_RSV_PMCFP kontsentratsioonist (lahjendusfaktorist). Katsepunktideks on duplikaatide keskmised väärtused ning veajoonteks aritmeetiliste keskmiste standardhälbed.

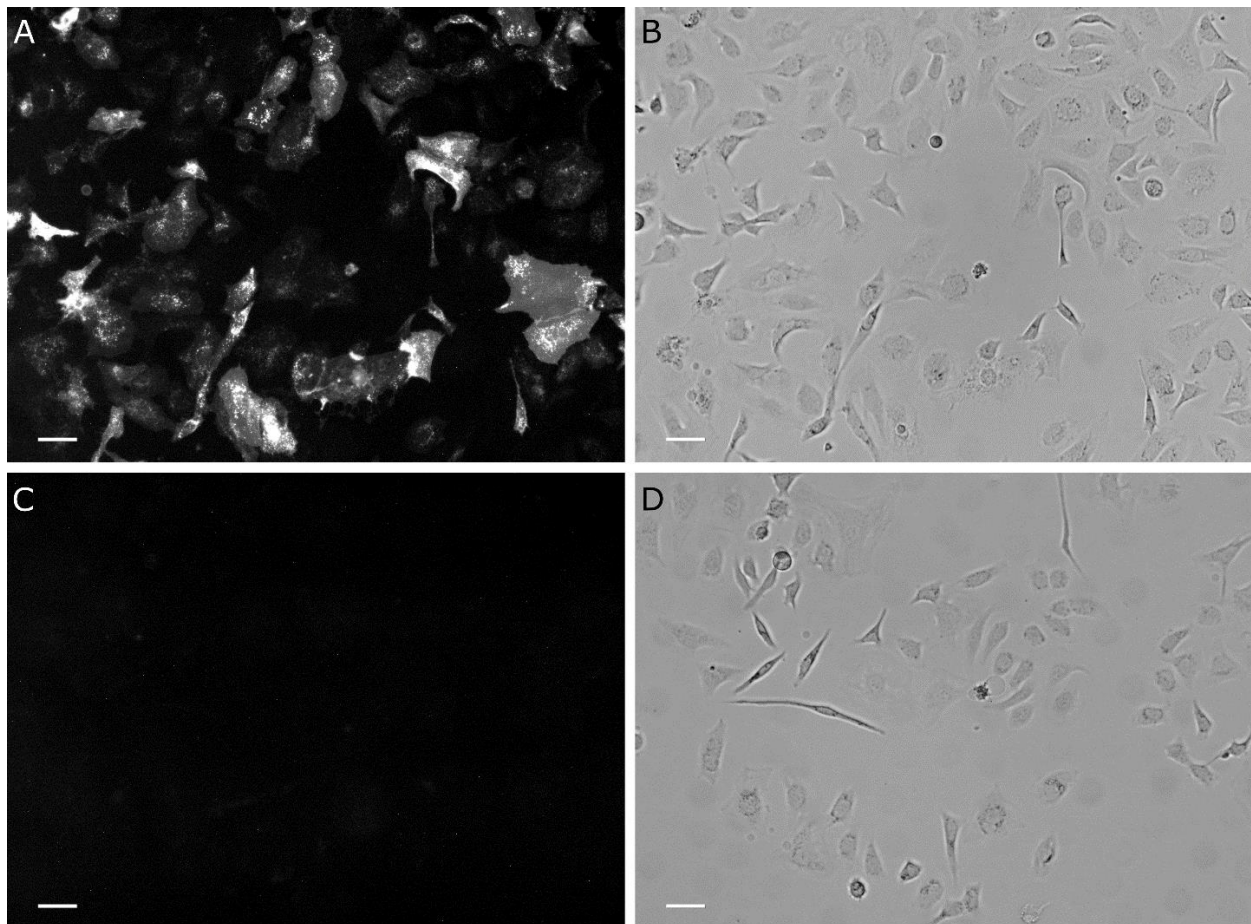
5.3 Geenide ekspressiooni valideerimine imetajarakkudes

Enamik imetajarakkude tüüpidest on sobilikud efektiivseks nakatamiseks bakuloviirustega (Geneva Biotech 2021). Käesolevas töös kasutati mudelsüsteemina imetaja munasarjavähi rakuliini SK-OV-3 rakke. Munasarjavähi arengus mängib kriitilist rolli WNT/ β -kateniini signaalirada ning on näidatud, et vähi agressiivsus korreleerub FZD7-retseptori üleekspressiooniga (Asad *et al.* 2014), mistõttu peetakse FZD-retseptorite inhibiitoreid potentsiaalseteks ravimikandidaatideks. SK-OV-3 rakukultuuri rakud on ka väga heterogeense morfoloogiaga ning sobilikud mikroskoopiakatseteks, kuna rakumembraani ja tuuma vaheline ruum on sageli piisav, eristamaks ekspresseeritud valkude paiknemist erinevates raku osades.

5.3.1 FZD-retseptorite ekspressiooni valideerimine

5.3.1.1 FZD10_mCherry ekspressioon SK-OV-3 rakkudes

FZD-retseptorite olemasolu genereeritud bakuloviirustes oli kõige lihtsam tõestada fluorestsentsmärgistega konjugeeritud retseptorite, FZD10-mCherry ja FZD6_FlAsh_TFP, korral. Esmane järeldus FZD10-retseptori ekspressiooni kohta putukarakkudes tehti bakuloviiruste hFZD10_mCherry_VSVG_RSV ja hFZD10_mCherry_VSVG_RSV_PMCFP kogumiseks tsentrifugeeritud violetse tooniga *Sf9* rakkude põhjal (lisa 12). FZD10-retseptori ekspresseerimist nimetatud bakuloviirustega nakatatud imetajarakkudes kontrolliti fluorestsentsmikroskoopiaga. Joonisel 4 on näha, et MultiBacMam on väga efektiivne meetod imetajarakkudesse geneetilise informatsiooni sisseviimiseks bakuloviiruste vahendusel, võimaldades saavutada ligilähedaselt 100%-lise transfektsiooni efektiivsuse.



Joonis 4. FZD10-mCherry ekspressiooni efektiivsuse valideerimine. A ja B: bakuloviirusega hFZD10_mCherry_VSVG_RSV nakatatud SK-OV-3 rakud; C ja D: kontroll (nakatamata) SK-OV-3 rakud. A ja C: epifluorestsentsmikroskoopiapilt punases kanalis (Cytation 5 RFP filtrite komplekt ja 523 nm LED valgustus); B ja D: heledusvälja mikroskoopiapilt. Skaala = 100 µm.

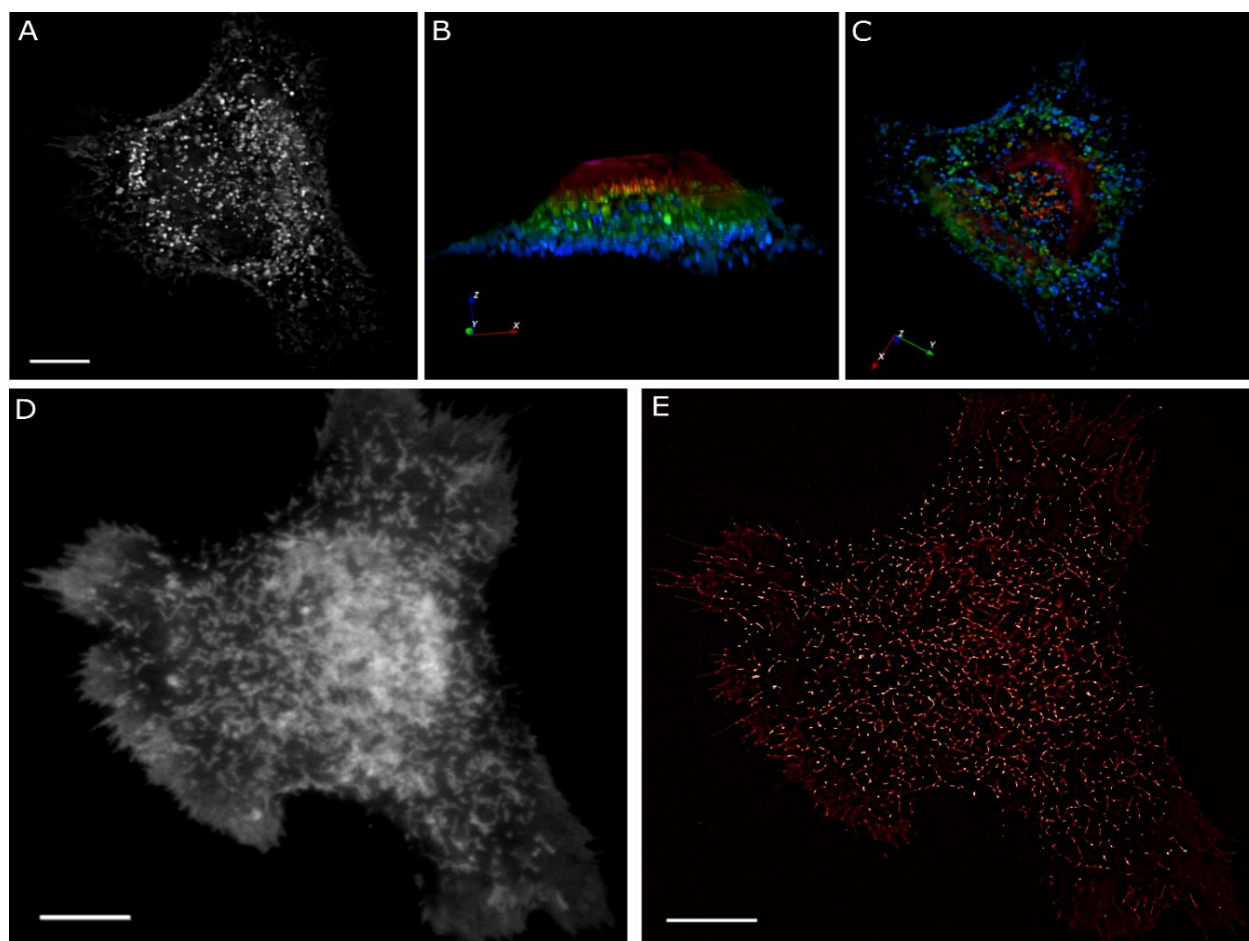
Joonisel 4 toodud mikroskoopiapiltide põhjal on näha lisaks ootuspärasele rakumembraanist tulenevale mCherry signaalile ka märgatavat signaali rakkude sisemuses. Nähtust võiks seletada endogeensete WNT-ligandide poolt pidevalt aktiveeritud ning endotsüteeritud retseptorite esinemisega rakkudes. Paraku ei muutnud olukorda ka 48 h enne eksperimenti rakkude töötlemine porkupiini ensüümi inhibiitoriga C59 (5 nM), mis pärsib endogeensete WNT-ligandide palmitoülsiooni. Rakusisene signaal võib olla põhjustatud ka mCherry üle-ekspresseerimisest ning edasistes katsetes tuleks optimeerida nakatamistingimusi (MOI väärtus, inkubeerimisaeg).

FZD-retseptorite rakusisese paiknemise täpsemaks analüüsimiseks kasutati suurema lahutusega mikroskoopiat. Ilmnes, et FZD10-retseptorid on lisaks plasmamembraanile koondunud ka plasmamembraani lähedal asuvatesse rakusisestesse klastritesse (joonis 5). Sarnast nähtust kirjeldas esmakordselt Scavo *et al.* (2019), näidates FZD10-retseptori paiknemist mitmetes kasvajakuliini rakkudes sisalduvates klastrites. Sellisteks klastriteks võivad olla näiteks multivesikulaarsed kehad (MVB, ingl *multivesicular bodies*). MVBd saavad ühineda ka plasmamembraaniga ja vabastada enda koostises olevad vesiikulid rakuvälisesse keskkonda. Rakuvälisesse keskkonda vabastatud vesiikuleid tuntakse eksosoomidena (Qin and Dallas 2019). Ka Scavo *et al.* (2020, 2019) on kirjeldanud FZD10-retseptorite paiknemist eksosoomides ja seostanud nähtust rakkudevahelise suhtlusega.

TIRF-mikroskoopiapiltide põhjal ilmnes FZD10-retseptori märkimisväärne koondumine piklikele tsütoskeleti struktuuridele (nt aktiini filamendid) ja rakumembraani väljasopististele ehk filopoodiatele (Joonis 5 D, E). Ka Nager *et al.* (2017) on näidanud mitme GPCR klassi kuuluva retseptori (nt FZD-retseptori alamklassi Smoothened retseptori) kontsentreerumist imetajarakkude filopoodiatele enne rakumembraanist mikrovesiikulitena eemaldumist. Täpne põhjus ning mehhanism retseptorite kaasamise kohta rakuvälisesse mikrovesiikulitesse on uurimisel, kuid protsessi seostatakse üldiselt rakkudevahelise suhtlusega.

Rakuväliste osakeste ligilähedase ja osaliselt kattuva suuruse tõttu - eksosoomid ~20 - 200 nm, mikrovesiikulid ~100 - 1000 nm (Qin and Dallas 2019) ja RSV keskmiselt 94 nm (Johnson *et al.* 2001) – raskendab nende suuruse järgi eristamist. Üks võimalus VLPde eraldamiseks on kasutada

rakuväliste vesiikulite produktsiooni inhibiitoreid (Catalano and O'Driscoll 2019). Kasutusel on ka rakuväliseid vesiikuleid märgistavad spetsiifilised tetraspaniinsed markerid (CD9, CD63, CD81) (Jankovičová *et al.* 2020). Vastavaid markereid sisaldavad ka osa Bioorgaanilise keemia õppetooli (Sweet)MultiBac(Mam) raamatukokku kuuluvates plasmiididest (lisa 6), millest tulenevalt on tulevikus potentsiaalselt võimalik hinnata VLPde osakaalu rakuväliste vesiikulite suhtes.

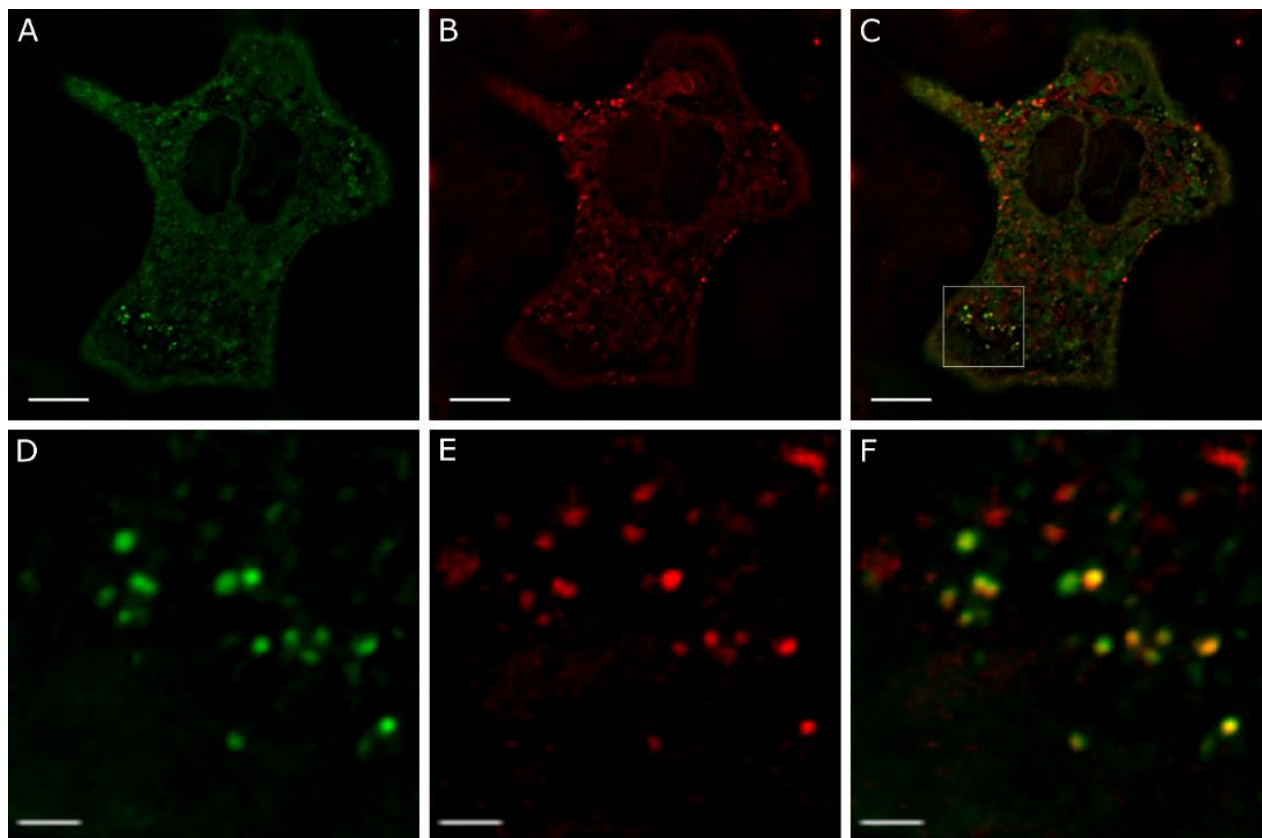


Joonis 5. FZD10-mCherry lokaliseerumine elusates SK-OV-3 rakkudes. A: maksimaalse signaali Z-projektsioon, näha retseptori klasterdumine raku sees. B ja C: sama raku 3D esitus, mCherry signaal on pseudovärvistatud sõltuvalt sügavusest (Z-tasandist). Täheldatav rakusiseste klastrite lokaliseerumine enamjaolt rakumembraani läheduses. D: sama rakk TIRF-valgustusega – nähtav retseptori kontsentreerumine filopoodiates ja lokaliseerumine tsütoskeleti piklikes struktuurides. E: sama rakk visualiseeritud SRRF-mikroskoopiaga TIRF-valgustusega, mis illustreerib paremini aktiinilaadset struktuuri. Fourier rõngate korrelatsiooni analüüs (ingl *Fourier Ring Correlations - FRC*) näitab 55 nm eraldusvõimet saavutamist. Skaala = 10 μ m.

Bakuloviirusega FZD10_mCherry_VSVG_RSV nakatatud imetajarakkudel koguti nakatamisjärgse inkubatsiooniperioodi järel kasvusööde ja rakuvälised osakesed kontsentreeriti TFF-ga. Kontsentreeritud rakuvälistest osakekest mõõdetud mCherry ergastus- ja emissioonispketer (lisa 13) vastavad mCherry-le karakteristiklikele spektritele ning sellest tulenevalt võib kinnitada FZD10-retseptor paiknemist kõrges kontsentratsioonis ka rakuvälistes osakestes.

5.3.1.2 FZD6-FlAsH-TFP ekspressioon SK-OV-3 rakkudes

Bakuloviirus hFZD6_FlAsH_TFP_VSVG_RSV genereeriti lähtudes Kozielowicz *et al.* (2020) disainitud intramolekulaarse Försteri resonantsenergia ülekandega (FRET) biosensorist. FRET meetod põhineb energia ülekandel doonorfluorofoorilt aktseptorfluorofoorile ning protsessi käigus väheneb doonormolekuli fluorestsentsi intensiivsus, mille arvelt kasvab aktseptormolekuli emissiooni intensiivsus.. Antud biosensoris paikneb C-terminaalses alas FRET energia doonor, milleks on tsüaansiniselt fluorestseeruv valk (TFP, ingl *teal fluorescent protein*), ning TM heelikseid 5 ja 6 ühendavas rakusiseses aasas paikneb tetratsüsteiinne aminohappejärjestus FRET energia aktseptori F₂FlAsH seondumiseks (lisa 14).



Joonis 6. FZD6-FlAsH-TFP lokaliseerumine elavates SK-OV-3 rakkudes. A: TFP signaal, ergastatud 445 nm laseriga. Näidatud retseptori ekspresseerumine rakkudes ning lokaliseerumine nii kui plasmamembraanis kui ka rakkude sees. B: FlAsH signaal, ergastatud 515 nm laseriga. Näha rakkude värvumist ning kohati ka fluorestsentsvärvi agregatsiooni. C: TFP ja FlAsH ühildatud kanalid – illustreerib kollokalisatsiooni, mis on paremini kujutatud suurendatud huvipakkuvas regioonis: D, E, F (kolokalisatsiooni Pearson'i koefitsient 0,65). Skaala = 10 μ m.

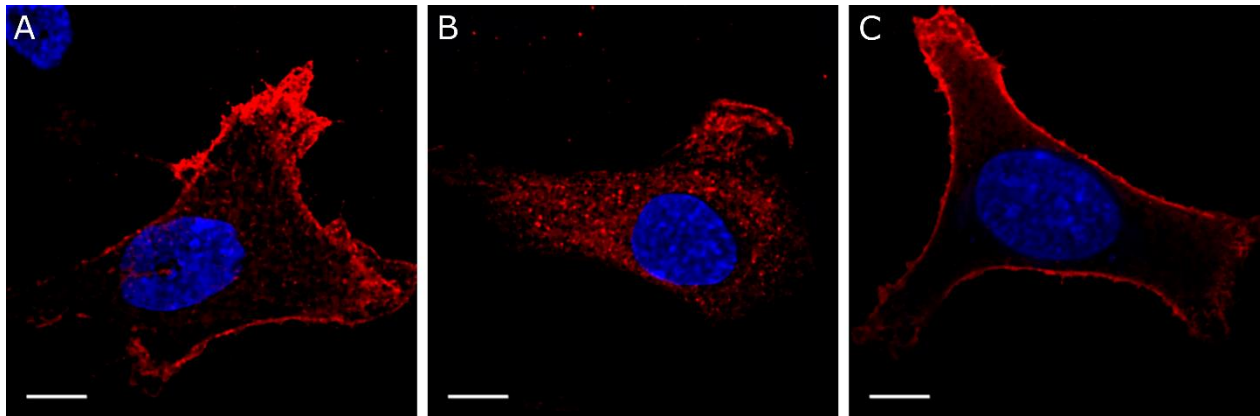
Kui FZD6 retseptori aktiveerida agonistiga, siis toimub retseptori konformatsiooniline muutus, mis toob kaasa F₂FlAsH ja TFP omavahelise kaugenemise ning FRETi efektiivsuse languse. Kahjuks põhjustab FlAsH mittespetsiifiline seondumine rakukomponentidega sageli raskusi FRET signaali muutuse mõõtmisel. Eelduste kohaselt võimaldaks töö raames loodud süsteem antud biosensori üle kanda rakuvälistele osakestele ning detekteerida kõrgemat FRET signaali muutust imetajarakkudega võrreldes vähem komplekses süsteemis. Töö edasiarendusena on plaan seda kontrollida.

Töös kontrolliti biosensori ekspressiooni SK-OV-3 rakkudes. Joonise 6 põhjal on näha, et antud bakuloviirus on võimeline tootma imetajarakkudes vastavat biosensorit ning F₂FlAsH saab seostuda FZD6-retseptori modifikatsioonil loodud tetratsüsteiinse seondumisjärjestusega. Paraku nähti FlAsHist signaali ka bakuloviirustega nakatamata kontroll rakkude korral, mis arvatavasti tulenebki FlAsH mittespetsiifiliselt seondumisest endogeensete valkude Cys rikaste aladega.

5.3.1.3 FZD-retseptorite 4, 5, 6 ja 7 ekspressioon SK-OV-3 rakkudes

Fluorestsentsmärgistamata FZD-retseptorite 4, 5, 6, ja 7 ekspressiooni valideeriti primaarsete ja sekundaarsete antikehadega. SK-OV-3 rakud nakatati bakuloviirustega hFZD4_VSVG_RSV, hFZD5_VSVG_RSV, hFZD6_VSVG_RSV ja hFZD7_VSVG_RSV ja vastavate PMCFPd sisaldavate analoogidega (kokku 8 bakuloviirust). Rakkude fikseerimise ja permeabiliseerimise tulemusena kadus paraku suur osa CFP signaalist. Analüüsitud kaheksast bakuloviirusest õnnestus kuuel juhul tõestada FZD-retseptorite ekspressiooni selektiivsete antikehade kaudu, seda nimelt FZD-retseptorite 4, 5 ja 6 korral (joonis 7). Kahjuks ei õnnestunud märgistamine FZD7-retseptori korral. Eeldame, et antud juhul võiks tegu olla mitte töötava antikehaga, kuna SK-OV-3 rakud on tuntud ka endogeensete FZD7 retseptorite üle-ekspresseerimise poolest. Nakatamata kontroll-rakkudes tuvastati vähesel määral värvumist aga FZD4-retseptori spetsiifilise antikeha juuresolekul, mis võiks viidata SK-OV-3 rakkudes ka endogeense FZD4 retseptori olemasolule.

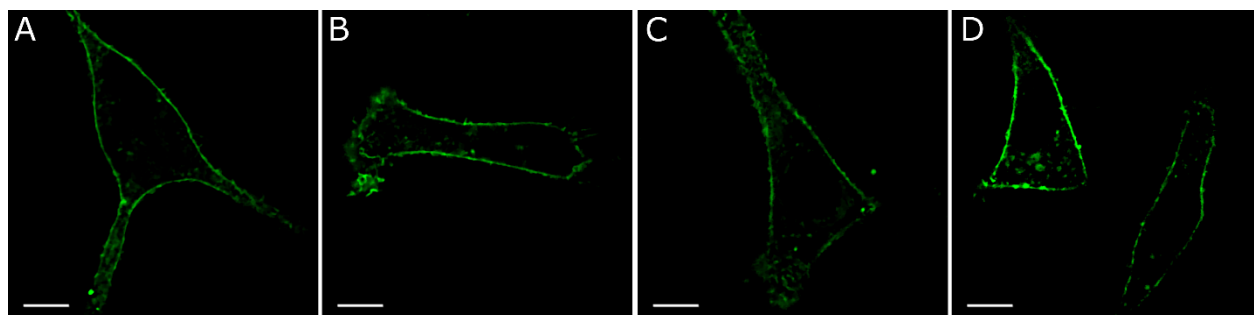
Nähtust võiks tulevikus põhjalikumalt uurida FZD4-retseptorite selektiivse vaigistamise kaudu (ingl *silencing*). FZD-retseptorite 5, 6 ja 7 korral kontroll-rakkude värvumist vastavate antikehade juuresolekul ei toimunud. Bakuloviirusega hFZD5_VSVG_RSV nakatamisel toimus suur osa märgistamisest rakkude sees, mis erines hFZD5_VSVG_RSV_PMCFP korral nähtud märgistamismustrist, kus suur osa retseptorist paiknes plasmamembraanis. Nähtust võiks seletada retseptori üle-ekspressiooniga hFZD5_VSVG_RSV-ga nakatamise korral ning edasistes katsetes tuleks optimeerida nakatamistingimusi.



Joonis 7. FZD-retseptorite 4, 5, 6 immunofluorestsentsvärvimine fikseeritud SK-OV-3 rakkudes. Esitletud on nimetatud retseptoriteid (ilma PMCFPd) sisaldavate bakuloviirustega nakatatud rakud. Antikehade värvid ergastati 638 nm laseriga. Tuuma värvimiseks kasutati Hoechst 34580, mis ergastati 405 nm laseriga. A: FZD4 – signaal Alexa 647 konjugeeritud primaarsest antikehast. B: FZD5 - signaal Abberior Star RED konjugeeritud sekundaarsest antikehast. C: FZD6 - signaal NL635 konjugeeritud sekundaarsest antikehast. Skaala = 10 μ m.

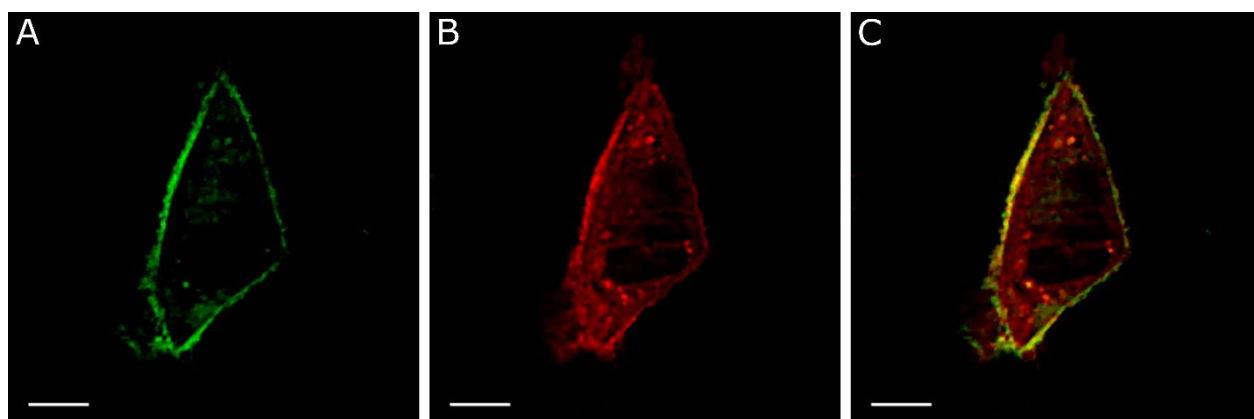
5.3.2 Plasmamembraanmarkeri PMCFP ekspressioon SK-OV-3 rakkudes

Enamik töös genereeritud bakuloviiruseid sisaldasid ka plasmamembraanmarkerit PMCFP. Joonise 8 ja 9 põhjal on näha, et ülekaalukas rakumembraanist tulenev CFP signaal oli tuvastatav kõikide töös kasutatud FZD-retseptorite korral (FZD-retseptorid 4, 5, 6 7 ja 10). CFP signaali nägemine ka FZD7-retseptori korral näitab kaudselt ka retseptorit kodeeriva järjestuse olemasolu vastavates MultiBac plasmiidides. Väidet kinnitab MultiBac plasmiidide edukas transpositsioon bakmiidi, kuna transpositsiooni eest vastutavad transpositsioonelemendid paiknevad just FZD-retseptoreid kodeerivaid järjestusi sisaldavates aktseptorplasmiidides.



Joonis 8. Plasmamembraanmarkeri PMCFP lokaliseerumine elusates SK-OV-3 rakkudes. Marker koekspressseeritud bakuloviirustega: FZD4-VSVG-RSV-PMCFP (A), FZD5-VSVG-RSV-PMCFP (B), FZD6-VSVG-RSV-PMCFP (C) ja FZD7-VSVG-RSV-PMCFP (D). CFP ergastati 445 nm laseriga. Skaala = 10 μ m.

Bakuloviirusega hFZD10-mCherry_VSVG_RSV_PMCFP nakatatud SK-OV-3 rakkude näitel on võimalik täiendavalt kinnitada, et ühe bakuloviirusega nakatamine võimaldab ekspresseerida imetajarakkudes korraga mitmed fluorestsentsvalke (FZD10-mCherry, PMCFP) (joonis 9).

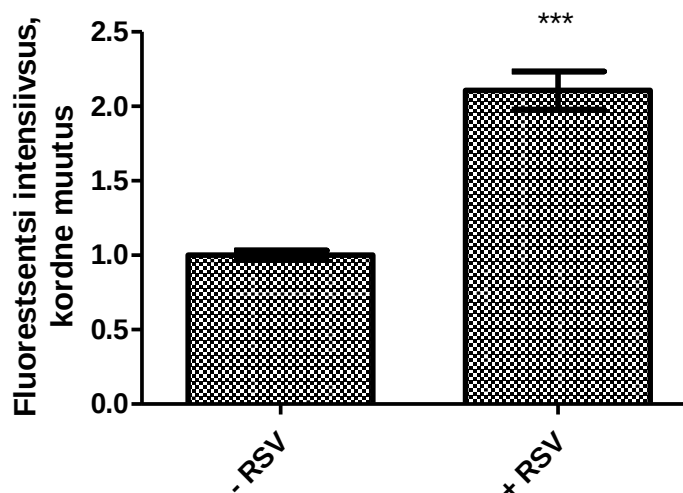


Joonis 9. Plasmamembraanmarkeri PMCFP ja FZD10-mCherry kolokalisatsioon elusates SK-OV-3 rakkudes. Rakkude nakatamiseks on kasutatud bakuloviirust Fzd10-mCherry-VSVG-RSV-PMCFP. A: CFP ergastati 445 nm laseriga. B: mCherry ergastati 561 nm laseriga. C: pilt ühildatud kanalitest. Skaala = 10 μ m.

5.3.3 RSV gag-valgu ekspressioon SK-OV-3 rakkudes (VLPde genereerimine)

Kuna töö raames oli genereeritud ka bakuloviirus, mis ei sisaldanud RSV gag-valgu kodeerivat järjestust (Empty_VSVG_PMCFP), tekkis täiendav võimalus kontrollida kaudselt RSV gag-valgu ekspresseerimist imetajarakkudes. Eelduste kohaselt peaks RSV gag-i sisaldavate bakuloviirustega nakatatud imetajarakkude korral olema detekteeritav PMCFP signaal kõrgem, seda just VLPde

kõrgema kontsentratsiooni tõttu rakuvälistes osakestes. Joonisel 10 esitatud andmete põhjal järeldub, et *gag*-valgu koekspresserimine suurendab märkimisväärselt fluorestseeruvate nanoosake olemasolu rakkude kasvukeskkonnas.



Joonis 10. Plasmamembraanmarkeri PMCFP fluorestsentsi intensiivsus SK-OV-3 rakkude kasvusöötmes. Rakud oli nakatatud bakuloviirustega Empty-VSVG-PMCFP, Empty-VSVG-RSV-PMCFP ja FZD10-mCherry-VSVG-RSV. Korjatud kasvusööde filtreeriti läbi 0,45 nm pooriga filtri, kontsentreeriti ja dialüüsi TFF-ga. Proovides mõõdeti CFP signaali (ergastamine 435 ± 10 nm ja emissioon 480 ± 10 nm, Cytation 5 multisüvendiplaadiloenduriga (lisa 15)). Ka tsentrifugeeritud rakkudest mõõdeti signaal (eeltoodud tingimustel). FZD10 bakuloviirustega nakatud rakud kasutati taustsignaalina, et arvutada ümber ainult CFPst tulenev signaali PMCFP-ga nakatatud rakkudes. Graafikul on näidatud vastavate kasvusöötmete CFP signaalide ja rakkude CFP signaalide suhe, mis normaliseeriti Empty-VSVG-PMCFP signaali suhega. On näha oluliselt ($P < 0.001$) kõrgemat CFP fluorestsentsi intensiivsust RSV ekspresseerimise korral.

Kogutud nanoosakeste suurust oli võimalik näidata fluorestsents NTA meetodiga. Selleks mõõdeti proovide liikuvus, kasutades HILO valgustamist. Osakeste liikumistrajektoore jälgides oli võimalik tuletada nanoosakeste suuruste tõenäosusjaotus (lisa 16). Kontrolliks kasutatava bakuloviiruse korral, mis ei sisaldanud *gag*-valgu kodeerivat järjestust, jäi domineerivate osakeste suurus 200 nm juurde. RSV koekspresserimise puhul tekkis aga uus pikk suurusega 90-100 nm, mida võiks seostada just VLPde pungumisega nakatatud imetajarakkudest.

6. KOKKUVÕTE

Bakalaureusetöö raames loodi uus imetajarakkudel põhinev süsteem mitmete valkude koos ekspresseerimiseks. Loodud süsteemi on potentsiaalset võimalik kasutada imetajarakkudest pungunud Rouse Sarcoma Viruse VLPdes huvipakkuvate valkude kuvamiseks ja imetajarakkudega võrreldes vähem komplekses süsteemis uurimiseks.

Teoreetilises osas anti ülevaade G-valkudega seotud retseptorite perekonnast ja perekonna alamklassi FZD kuuluvatest retseptoritest. Kirjeldati mitme valgu koos ekspresseerimise tehnoloogiaid nii pro- kui ka eukarüootsetes rakkudes ning tutvustati detailsemalt töös mitme valgu ekspresseerimiseks kasutatud modifitseeritud MultiBacMam® tehnoloogiat. Lühidalt kirjeldati ka fluorestsentsmeetodeid bioloogiliste proovide uurimiseks.

Praktilise töö raames loodi geenitehnoloogiliste meetoditega rekombinantne plasmiid, mis võimaldab tõsta valkude ekspressioonitaset imetajarakkudes ning tagab VLPde pungumise imetajarakkude plasmamembraanist. Rekombinantne plasmiid ühendati FZD-retseptoreid ning fluorestsentsmarkerit kodeerivaid gene sisaldvate plasmiididega Cre-LoxP rekombinatsioonil. Töö käigus loodi kokku 14 erinevat MultiBac plasmidi ning rekombinatsioonireaktsioonide korrektsust tõestati restriksioonanalüüsidel. MultiBac plasmiidid transponeeriti bakmiidi ning putukarakkudest genereeritud 14 bakuloviirusel määrati tiiter. Bakuloviirustega nakatatatud imetajarakkudes huvipakkuvate valkude ekspressiooni valideerimiseks kasutati fluorestsentsmikroskoopiat.

Mikroskoopiliste katsetulemuste põhjal võib öelda, et loodud süsteem võimaldab efektiivset mitme valgu koos ekspresseerimist imetajarakkudes, põhinedes vaid ühte rekombinantsesse plasmidi kodeeritud huvipakkuvatel geenijärjestustel. Antud töö raames imetajarakkude nakatamistingimuste optimeerimist läbi ei viidud, mis on aga vajalik etapp loodud süsteemi edasisel rakendamisel. FZD-retseptorite ekspressiooni valideerimisel oli kohati, eelkõige FZD-retseptorite 10 ja 5 korral, näha retseptorite märkimisväärt paiknemist rakusisestes klastrites, mis võib olla seotud rakkudevahelise suhtlusega. Tõestati ka rekombinantsesse plasmiidid kodeeritud *gag*-valgu ekspressiooni imetajarakkudes. Sõltuvalt preparaati edasistest rakendustest, tuleks VLPd rakuvälistest osakestest ka eraldada. VLPsid on võimalik tulevikus kasutada nendes kuvatud FZD-retseptorite täpsema aktivatsioonimehhanismi väljaselgitamiseks ning ligand-retseptor interaktsioonide uurimiseks.

8. KASUTATUD KIRJANDUS

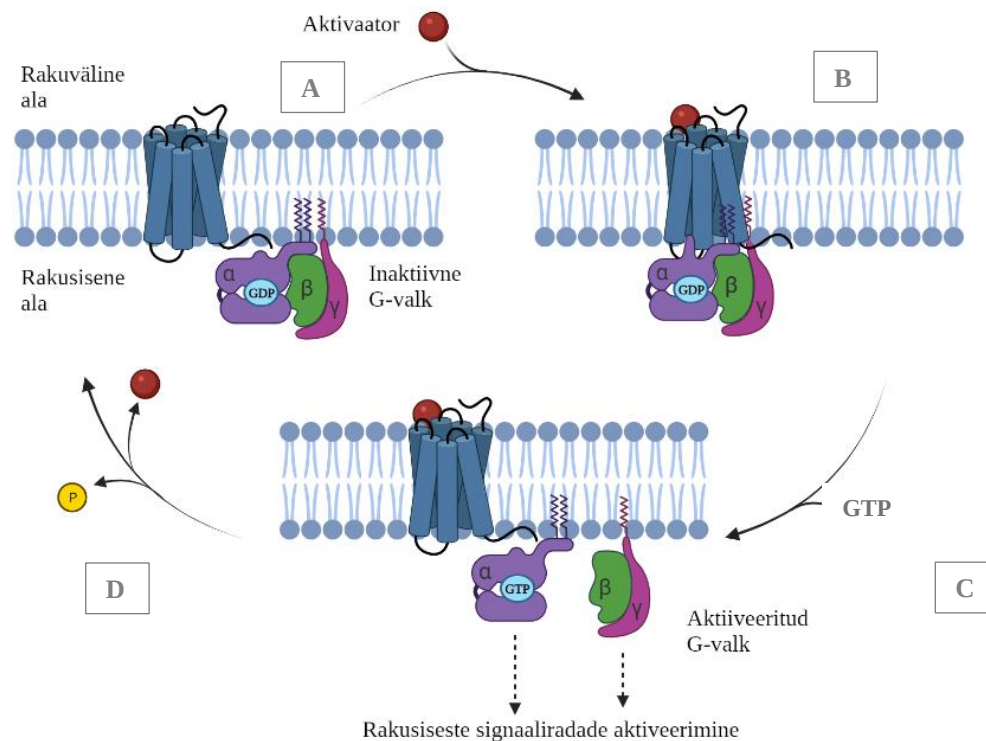
1. Adams S. R., Campbell R. E., Gross L. A., Martin B. R., Walkup G. K., Yao Y., Llopis J., Tsien R. Y. (2002) New Biarsenical Ligands and Tetracysteine Motifs for Protein Labeling in Vitro and in Vivo: Synthesis and Biological Applications. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 6063–6076.
2. Alrefaei A. F. (2021) Frizzled receptors (FZD) play multiple cellular roles in development, in diseases, and as potential therapeutic targets. *Journal of King Saud University - Science* **33**.
3. Asad M., Wong M. K., Tan T. Z., Choolani M., Low J., Mori S., Virshup D., Thierry J. P., Huang R. Y.-J. (2014) FZD7 drives in vitro aggressiveness in Stem-A subtype of ovarian cancer via regulation of non-canonical Wnt/PCP pathway. *Cell Death Dis* **5**, e1346–e1346.
4. Axelrod D. (2012) *Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) Microscopy*. University of Michigan.
5. Bockaert J., Pin J. P. (1999) Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J* **18**, 1723–1729.
6. Böhme I., Beck-Sickinger A. G. (2009) Illuminating the life of GPCRs. *Cell Commun Signal* **7**, 16.
7. Cadigan K. M., Liu Y. I. (2006) Wnt signaling: complexity at the surface. *Journal of Cell Science* **119**, 395–402.
8. Callahan E. M., Wills J. W. (2003) Link between Genome Packaging and Rate of Budding for Rous Sarcoma Virus. *J Virol* **77**, 9388–9398.
9. Catalano M., O'Driscoll L. (2019) Inhibiting extracellular vesicles formation and release: a review of EV inhibitors. *J Extracell Vesicles* **9**, 1703244.
10. Dick R. A., Vogt V. M. (2014) Membrane interaction of retroviral Gag proteins. *Front Microbiol* **5**, 187.
11. Foord S. M., Bonner T. I., Neubig R. R., Rosser E. M., Pin J.-P., Davenport A. P., Spedding M., Harmar A. J. (2005) International Union of Pharmacology. XLVI. G Protein-Coupled Receptor List. *Pharmacol Rev* **57**, 279–288.
12. 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. *Mol Pharmacol* **63**, 1256–1272.
13. Geneva Biotech (2021) *Viral Vector System for Delivery of Large Gene Circuits into Mammalian Cells (User Manual)*.
14. Gustafsson N., Culley S., Ashdown G., Owen D. M., Pereira P. M., Henriques R. (2016) Fast live-cell conventional fluorophore nanoscopy with ImageJ through super-resolution radial fluctuations. *Nat Commun* **7**, 12471.
15. HansaBioMed *TFF-Easy: Tangential flow filtration for Extracellular Vesicle concentration*.
16. 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, in *Advances in Virus Research*, Vol. 68, pp. 159–191. Elsevier.
17. Hauser A. S., Gloriam D. E., Bräuner-Osborne H., Foster S. R. (2020) Novel approaches leading towards peptide GPCR de-orphanisation. *Br J Pharmacol* **177**, 961–968.
18. Hauser A. S., Kooistra A. J., Munk C., Heydenreich F. M., Veprintsev D. B., Bouvier M., Babu M. M., Gloriam D. E. (2021) GPCR activation mechanisms across classes and macro/microscales. *Nat Struct Mol Biol* **28**, 879–888.
19. James G., Olson E. N. (1989) Myristoylation, Phosphorylation, and Subcellular Distribution of the 80-kDa Protein Kinase C Substrate in BC3H1 Myocytes. *Journal of Biological Chemistry* **264**, 20928–20933.

20. Janakiraman V., Forrest W. F., Seshagiri S. (2006) Estimation of baculovirus titer based on viable cell size. *Nat Protoc* **1**, 2271–2276.
21. Janda C. Y., Waghray D., Levin A. M., Thomas C., Garcia K. C. (2012) Structural basis of Wnt recognition by Frizzled. *Science* **337**, 59–64.
22. Jankovičová J., Sečová P., Michalková K., Antalíková J. (2020) Tetraspanins, More than Markers of Extracellular Vesicles in Reproduction. *Int J Mol Sci* **21**, 7568.
23. Johnson M. C., Scobie H. M., Vogt V. M. (2001) PR Domain of Rous Sarcoma Virus Gag Causes an Assembly/Budding Defect in Insect Cells. *J Virol* **75**, 4407–4412.
24. Kojima S., Ohkawa H., Hirano T., Maki S., Niwa H., Ohashi M., Inouye S. (1998) Fluorescent Properties of Model Chromophores of Tyrosine-66 Substituted Mutants of Aequorea Green Fluorescent Protein (GFP). *Tetrahedron Letters* **39**.
25. Koziulewicz P., Turku A., Bowin C.-F., Petersen J., Valnohova J., Cañizal M. C. A., Ono Y., Inoue A., Hoffmann C., Schulte G. (2020) Structural insight into small molecule action on Frizzleds. *Nat Commun* **11**, 414.
26. Laasfeld T., Kopanchuk S., Rinken A. (2017) Image-based cell-size estimation for baculovirus quantification. *BioTechniques* **63**, 161–168.
27. Lakowicz J. R. (2006a) Introduction to Fluorescence, in *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, pp. 1–26. Springer.
28. Lakowicz J. R. (2006b) Fluorophores, in *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, pp. 63–97. Springer.
29. Luckey M. (2014) Membrane receptors, in *Membrane Structural Biology*, pp. 257–283. Cambridge University Press, New York.
30. Luckow V. A., Lee S. C., Barry G. F., Olins P. O. (1993) Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in Escherichia coli. *J Virol* **67**, 4566–4579.
31. Lv X., Liu J., Shi Q., Tan Q., Wu D., Skinner J. J., Walker A. L., et al. (2016) In vitro expression and analysis of the 826 human G protein-coupled receptors. *Protein Cell* **7**, 325–337.
32. 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. *Nat Commun* **7**, 11529.
33. Mansouri M., Berger P. (2014) Strategies for multigene expression in eukaryotic cells. *Plasmid* **75**, 12–17.
34. Marheineke K., Grünewald S., Christie W., Reiländer H. (1998) Lipid composition of *Spodoptera frugiperda* (Sf9) and *Trichoplusia ni* (Tn) insect cells used for baculovirus infection. *FEBS Letters* **441**, 49–52.
35. Mazina O., Reinart-Okugbeni R., Kopanchuk S., Rinken A. (2012) BacMam System for FRET-Based cAMP Sensor Expression in Studies of Melanocortin MC1 Receptor Activation. *SLAS Discovery* **17**, 1096–1101.
36. Nager A. R., Goldstein J. S., Herranz-Pérez V., Portran D., Ye F., Garcia-Verdugo J. M., Nachury M. V. (2017) An Actin Network Dispatches Ciliary GPCRs into Extracellular Vesicles to Modulate Signaling. *Cell* **168**, 252–263.e14.
37. Nelson D. L., Cox M. M. (2013) Biosignaling, in *Principles of Biochemistry*, pp. 437–453. Susan Winslow, United States of America.
38. Niehrs C. (2012) The complex world of WNT receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 767–779.
39. Nile A. H., Hannoush R. N. (2016) Fatty acylation of Wnt proteins. *Nat Chem Biol* **12**, 60–69.

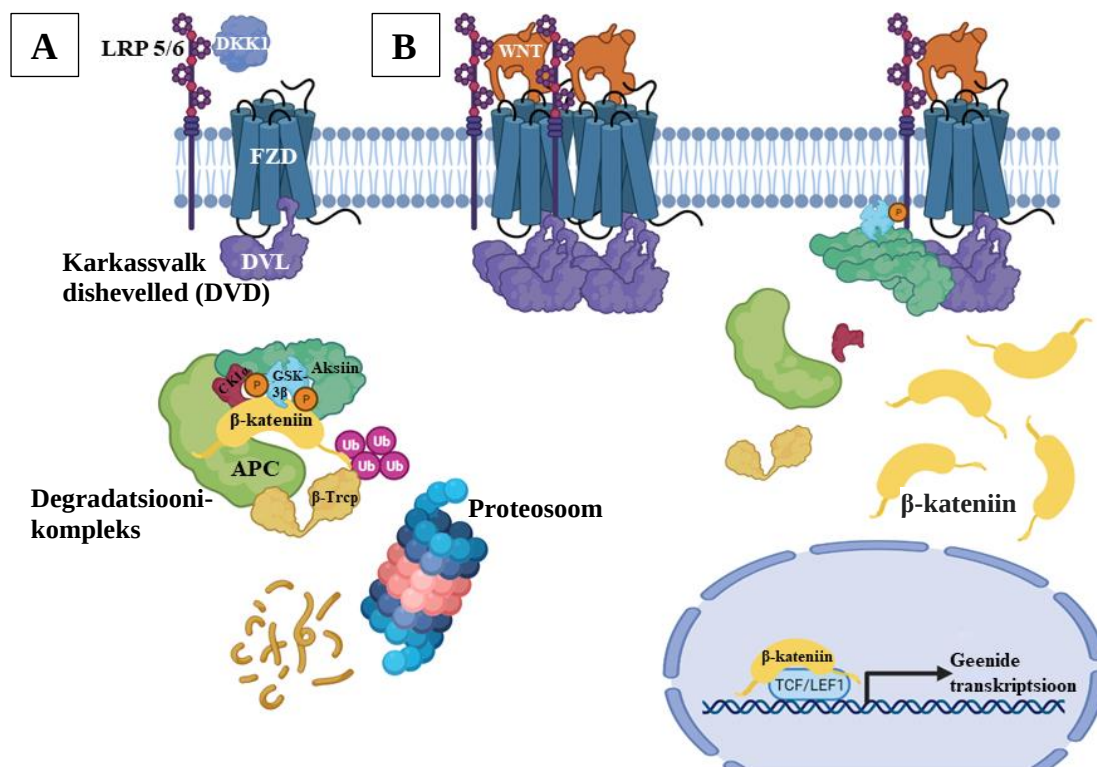
40. Nooraei S., Bahrulolum H., Hoseini Z. S., Katalani C., Hajizade A., Easton A. J., Ahmadian G. (2021) Virus-like particles: preparation, immunogenicity and their roles as nanovaccines and drug nanocarriers. *J Nanobiotechnol* **19**, 59.
41. Perrakis A., Romier C. (2008) Assembly of Protein Complexes by Coexpression in Prokaryotic and Eukaryotic Hosts: an Overview, in *Structural Proteomics*, (Kobe B., Guss M., Huber T., eds), Vol. 426, pp. 247–256. Humana Press, Totowa, NJ.
42. Poulter N. S., Pitkeathly W. T. E., Smith P. J., Rappoport J. Z. (2015) The Physical Basis of Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) Microscopy and Its Cellular Applications, in *Advanced Fluorescence Microscopy*, (Verveer P. J., ed), Vol. 1251, pp. 1–23. Springer New York, New York, NY.
43. Qin W., Dallas S. L. (2019) Exosomes and Extracellular RNA in Muscle and Bone Aging and Crosstalk. *Curr Osteoporos Rep* **17**, 548–559.
44. Rendi D., Wilson I. B. H., Paschinger K. (2008) The Glycosylation Capacity of Insect Cells. *Croat. Chem. Acta*, 15.
45. Resh M. D. (2006) Trafficking and signaling by fatty-acylated and prenylated proteins. *Nat Chem Biol* **2**, 584–590.
46. 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.
47. Sari D., Gupta K., Thimiri Govinda Raj D. B., Aubert A., Drncová P., Garzoni F., Fitzgerald D., Berger I. (2016) The MultiBac Baculovirus/Insect Cell Expression Vector System for Producing Complex Protein Biologics. *Adv Exp Med Biol* **896**, 199–215.
48. Scavo, Depalo, Rizzi, Ingrosso, Fanizza, Chieti, Messa, et al. (2019) FZD10 Carried by Exosomes Sustains Cancer Cell Proliferation. *Cells* **8**, 777.
49. Scavo M. P., Rizzi F., Depalo N., Fanizza E., Ingrosso C., Curri M. L., Giannelli G. (2020) A Possible Role of FZD10 Delivering Exosomes Derived from Colon Cancers Cell Lines in Inducing Activation of Epithelial–Mesenchymal Transition in Normal Colon Epithelial Cell Line. *IJMS* **21**, 6705.
50. Schenkelaars Q., Fierro-Constain L., Renard E., Hill A. L., Borchellini C. (2015) Insights into Frizzled evolution and new perspectives. *Evol Dev* **17**, 160–169.
51. Schöneberg T., Liebscher I. (2021) Mutations in G Protein–Coupled Receptors: Mechanisms, Pathophysiology and Potential Therapeutic Approaches. *Pharmacol Rev* **73**, 89–119.
52. Schulte G. (2010) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXX. The Class Frizzled Receptors. *Pharmacol Rev* **62**, 632–667.
53. Schulte G. (2015) Frizzleds and WNT/ β -catenin signaling--The black box of ligand-receptor selectivity, complex stoichiometry and activation kinetics. *Eur J Pharmacol* **763**, 191–195.
54. Schulte G., Wright S. C. (2018) Frizzleds as GPCRs – More Conventional Than We Thought! *Trends in Pharmacological Sciences* **39**, 828–842.
55. Sinah N., Williams C. A., Piper R. C., Shields S. B. (2012) A set of dual promoter vectors for high throughput cloning, screening, and protein expression in eukaryotic and prokaryotic systems from a single plasmid. *BMC Biotechnol* **12**, 54.
56. Slusarski D. C., Corces V. G., Moon R. T. (1997) Interaction of Wnt and a Frizzled homologue triggers G-protein-linked phosphatidylinositol signalling. *Nature* **390**, 410–413.
57. Soulez F., Denis L., Tourneur Y., Thiébaud É. (2012) Blind deconvolution of 3D data in wide field fluorescence microscopy, in *International Symposium on Biomedical Imaging*, p. CDROM. Barcelone, Spain.

58. Spagnuolo C. C., Vermeij R. J., Jares-Erijman E. A. (2006) Improved Photostable FRET-Competent Biarsenical–Tetracysteine Probes Based on Fluorinated Fluoresceins. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 12040–12041.
59. Sriram K., Insel P. A. (2018) G Protein-Coupled Receptors as Targets for Approved Drugs: How Many Targets and How Many Drugs? *Mol Pharmacol* **93**, 251–258.
60. Turku A., Schihada H., Kozieliwicz P., Bowin C.-F., Schulte G. (2021) Residue 6.43 defines receptor function in class F GPCRs. *Nat Commun* **12**.
61. Valnohova J., Kowalski-Jahn M., Sunahara R. K., Schulte G. (2018) Functional dissection of the N-terminal extracellular domains of Frizzled 6 reveals their roles for receptor localization and Dishevelled recruitment. *Journal of Biological Chemistry* **293**, 17875–17887.
62. Venkatakrishnan 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.
63. Vinson C. R., Conover S., Adler P. N. (1989) A Drosophila tissue polarity locus encodes a protein containing seven potential transmembrane domains. *Nature* **338**, 263–264.
64. Wagner T., Lipinski H.-G., Wiemann M. (2014) Dark field nanoparticle tracking analysis for size characterization of plasmonic and non-plasmonic particles. *J Nanopart Res* **16**, 2419.

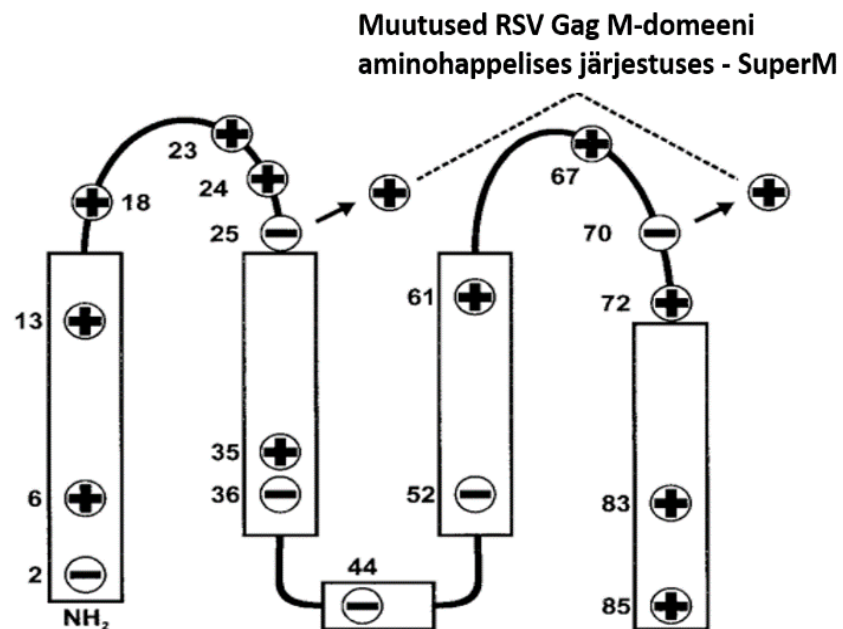
9. LISAD



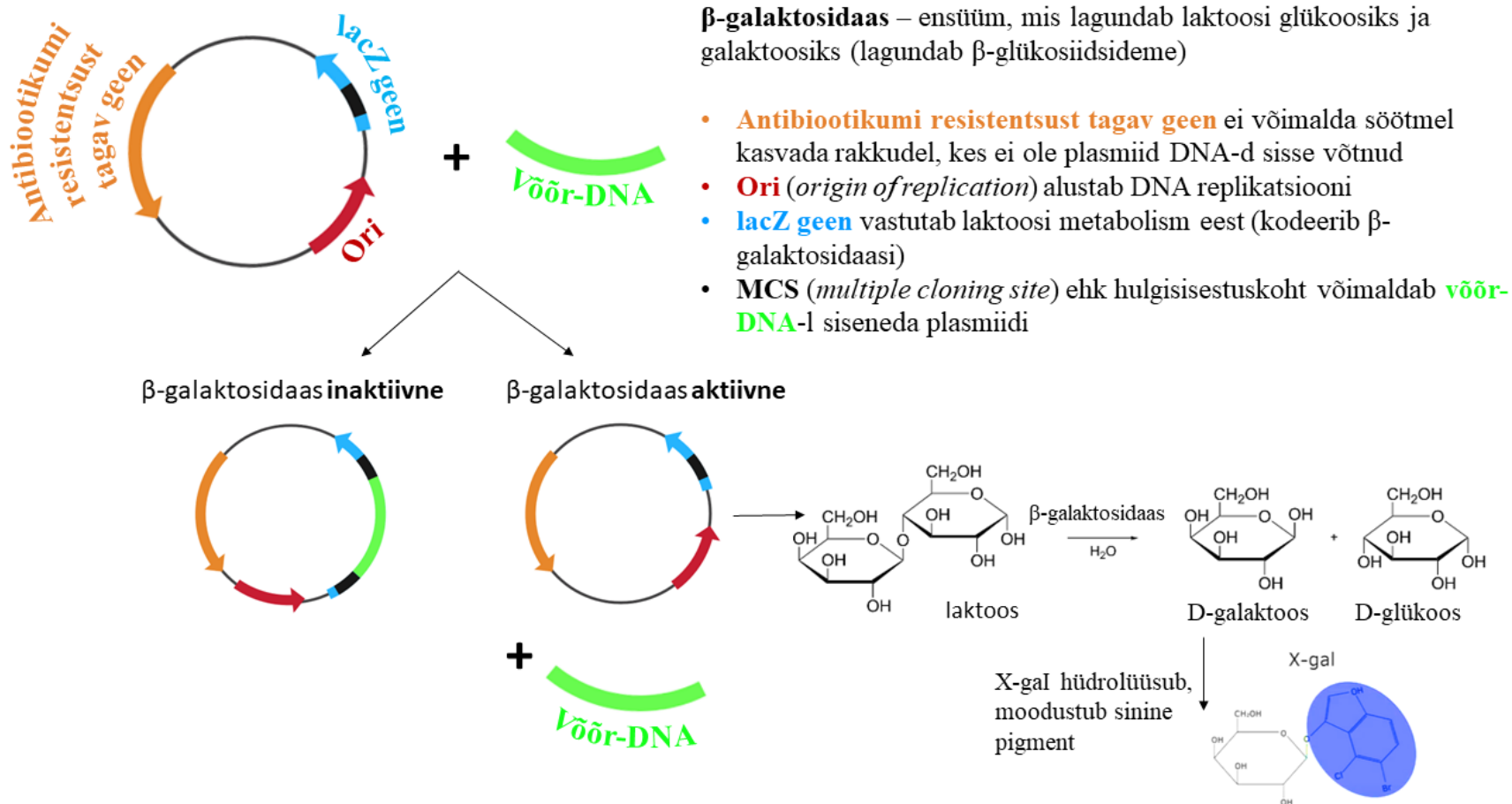
Lisa 1. G-valgu aktiveerimismehhanism. A: Inaktiivne G-valk ning membraani läbiv GPCR, B: Aktivaatori seondumisel GPCRga toimub retseptori konformatsiooniline muutus, mis võimaldab G-valgul seonduda GPCRga, C: G-valgu seondumisel GPCRga asendub α -alaühikus paiknev GDP GTPga, mis aktiveerib G-valgu. Aktiveeritud G-valk eemaldub GPCRst, aktiveerides erinevaid rakusiseseid signaaliradasid, D: GTP hüdrolyüsib GDP-ks ning taastub G-valgu esialgne struktuur.



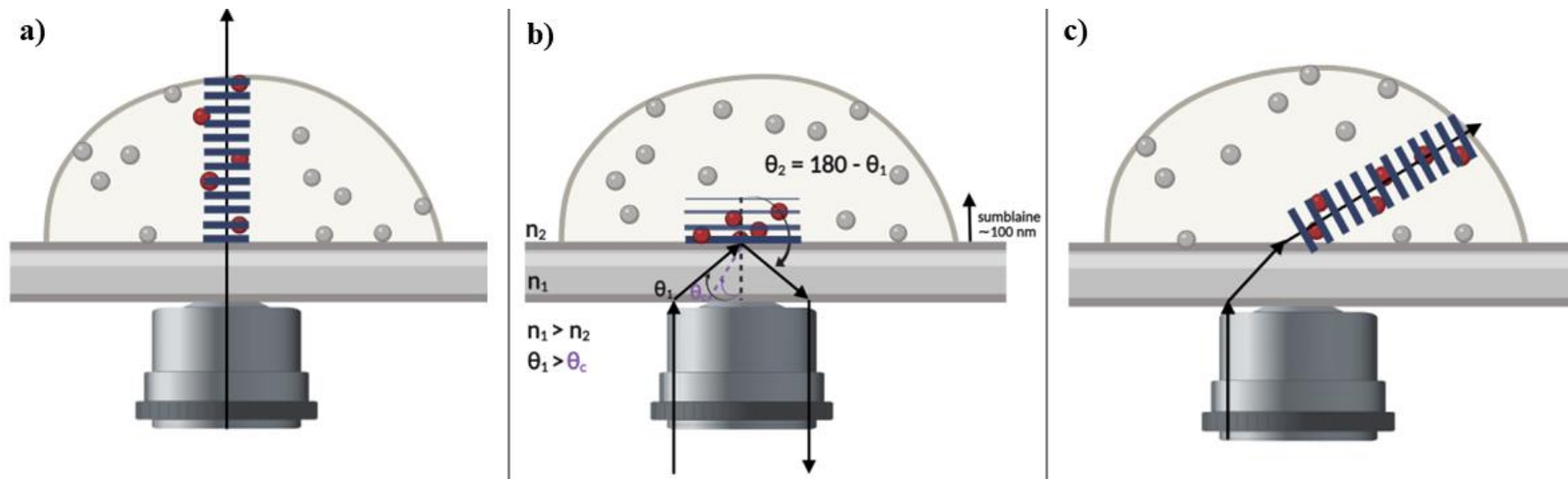
Lisa 2. WNT/FZD β -kateniinist sõltuv signaalirada. **A:** WNT-ligandi mitte-seundumine FZD-retseptorile. Transkriptsiooni koaktivaator β -kateniini fosforüleerimine degradatsiooni kompleksi kuuluva glükogeeni süntaasi kinaas 3 β (GSK-3 β) poolt, ubikineerimine β -trandutsiini kordusi sisaldava valgu (β -Trcp) poolt ning degradatsioon proteosoomis. **B:** WNT-ligandi seundumine FZD-retseptorile. Näidatud on FZD-retseptori ja koretseptori (LRP 5/6) heterodimeriseerumine ning FZD-retseptorite homodimeriseerumine. WNT-ligandi, FZD-retseptori ja koretseptori (LRP 5/6) vastastikmõjul inhibeeritakse GSK-3 β , fosforüleerimata β -kateniin siseneb raku tuuma, seostub transkriptsioonifaktoritega (TCF/LEF1) ning aktiveerib vastavate geenide transkriptsiooni.



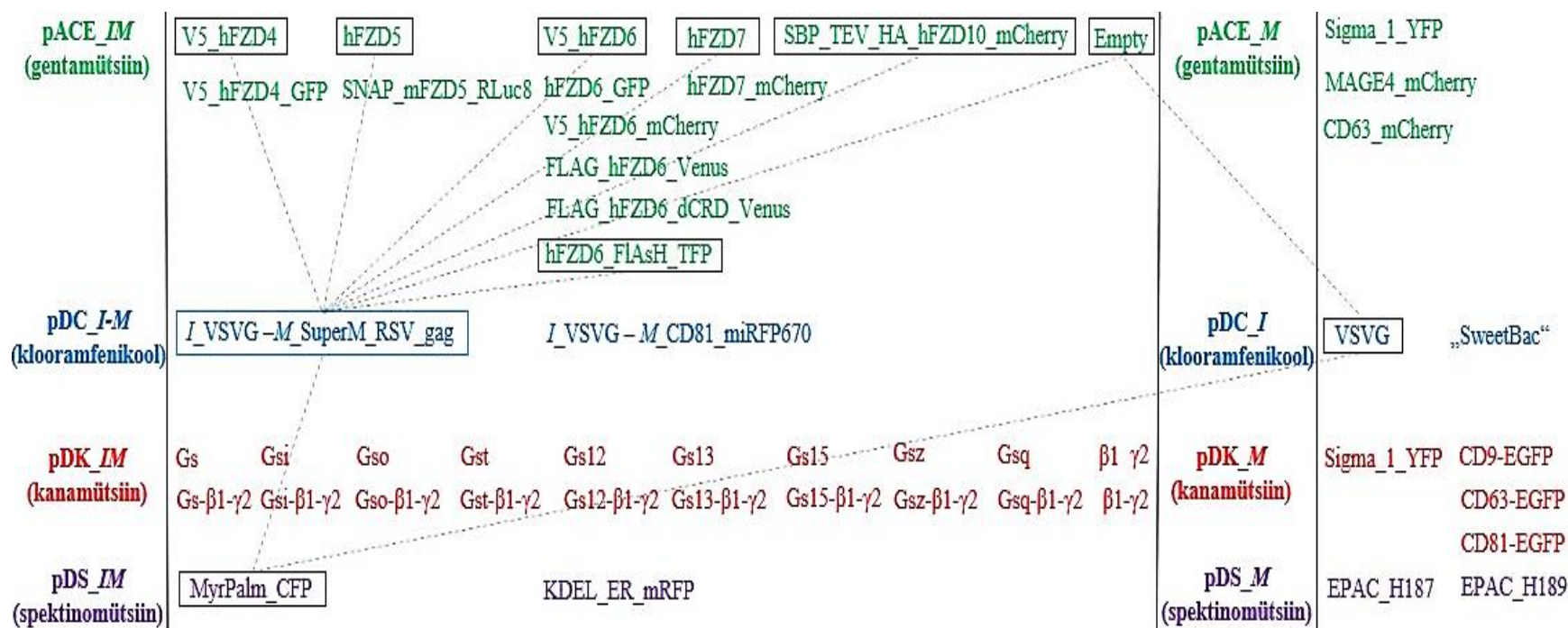
Lisa 3. Gag-valgu N-terminaalses osas paiknev 86-st aminohappest koosnev M-domeen ja modifitseeritud SuperM-domeen. M-domeenis on 11 aluseliselist aminohapet, mis interakteeruvad happeliste fosfolipiidide kaudu negatiivselt laetud raku sisemembraaniga ning mängivad olulist rolli VLPde pungumisel plasmamembraanist. Et suurendada VLPde pungumise efektiivsuse, on SuperM-domeenis on kaks happelist aminohapet asendatud aluseliste aminohapetega positsioonides 25 ja 70. Joonis on kohandatud Callahan and Wills (2003) artiklist.



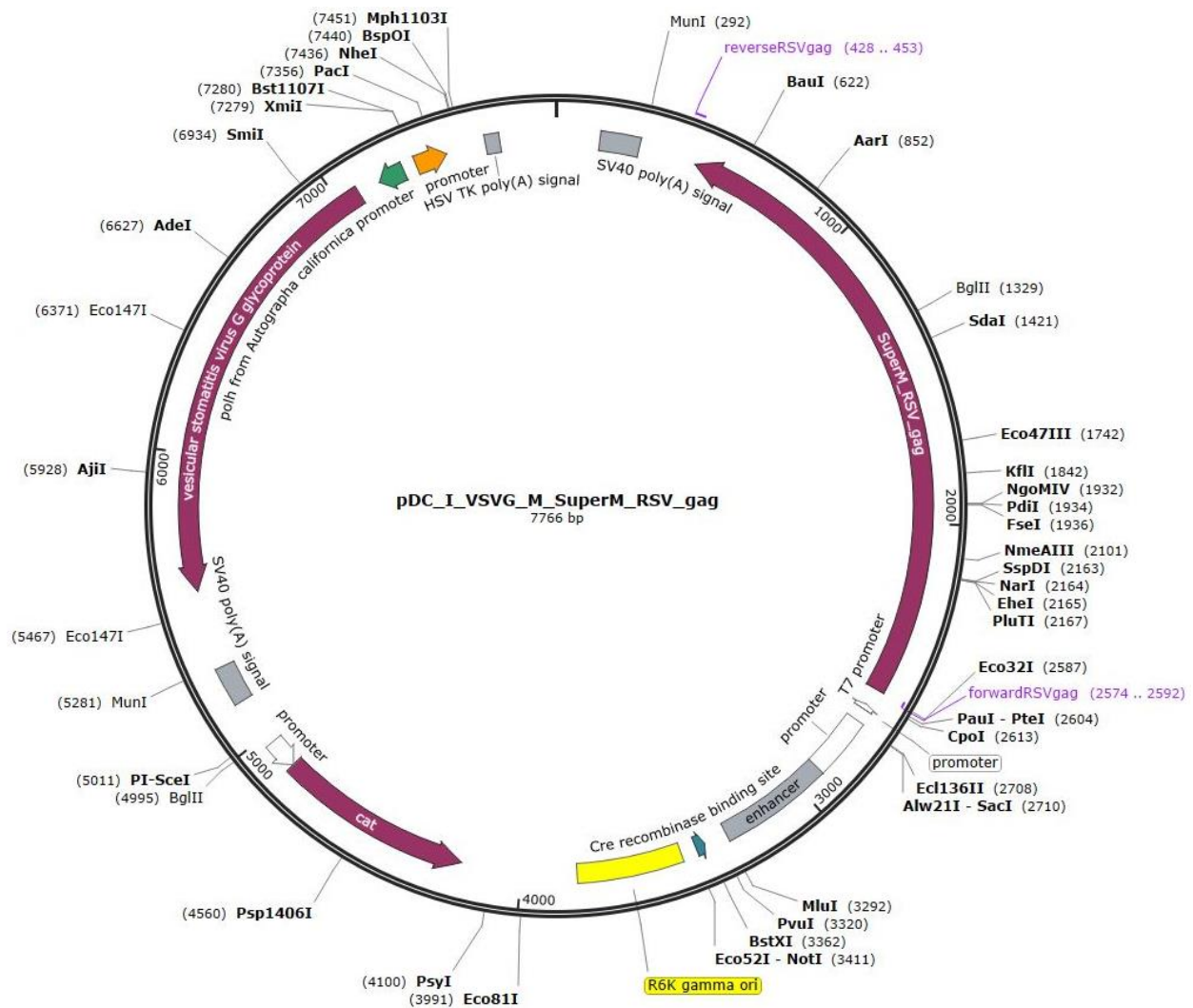
Lisa 4. Sinise/valge koloonia selektsioon. Laktoosi metabolismi eest vastutav geen lacZ säilitab aktiivsuse, kui võõr-DNA ei ole transponeeritud bakmiidi. Aktiivne lacZ kodeerib ensüümi β-galaktosidaas, mis lagundab laktoosis β-glükosiidsideme. Lagundamise käigus hüdrolüüsib aga ensüümi kromogeenne substraat X-gal, hüdrolüüsi käigus moodustub sinine pigment ning kasvavad kolooniad värvuvad siniseks. Õnnestunud transpositsiooni korral on ensüüm β-galaktosidaas inaktiivne, X-gal hüdrolüüsi ei toimu ning kasvavaid kolooniaid näeme valgetena.



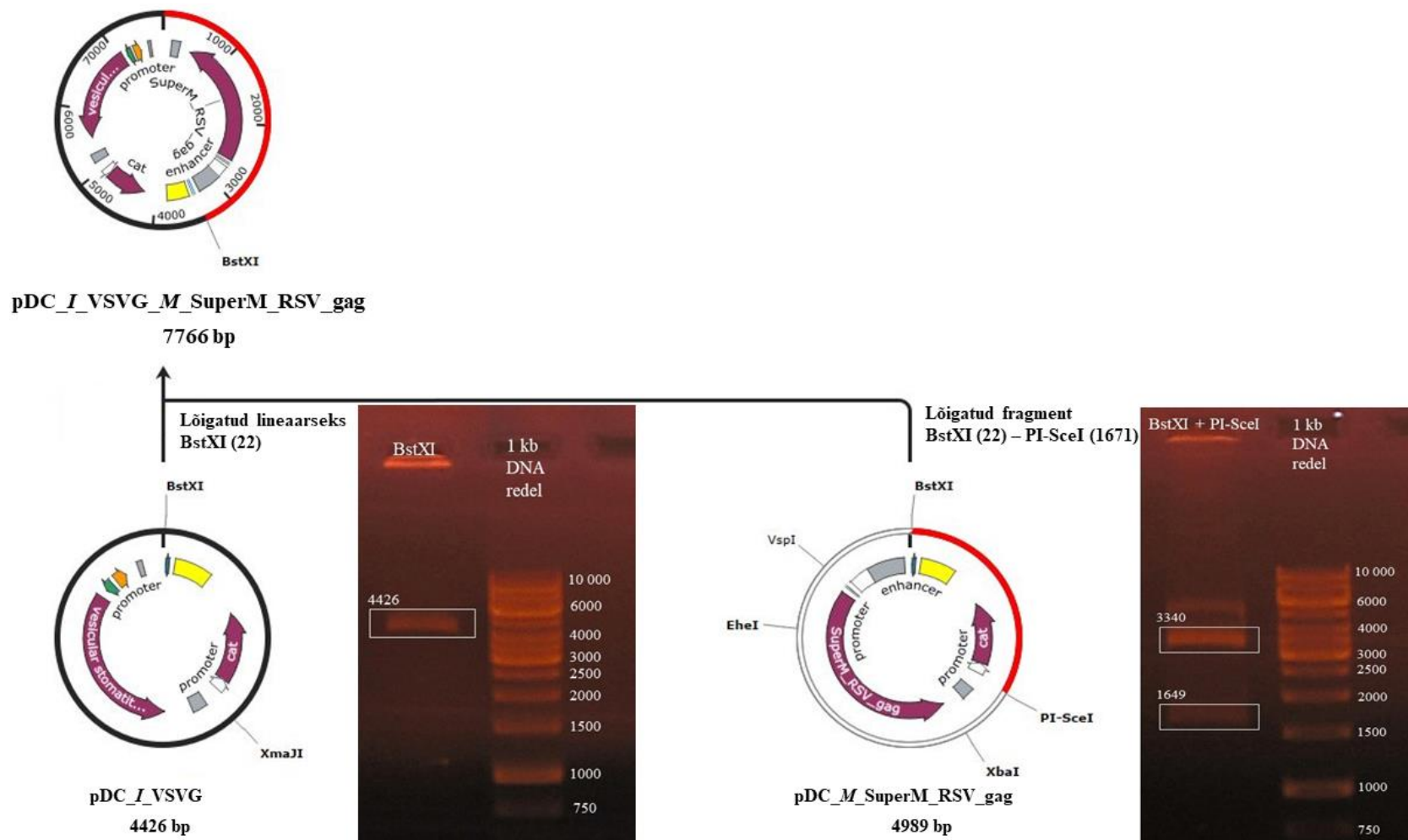
Lisa 5. Erinevad proovi ergastamisviisid fluorestsentsmikroskoopias: a) epifluorestsentsmikroskoop, b) TIRF mikroskoop, c) HILO mikroskoopia.



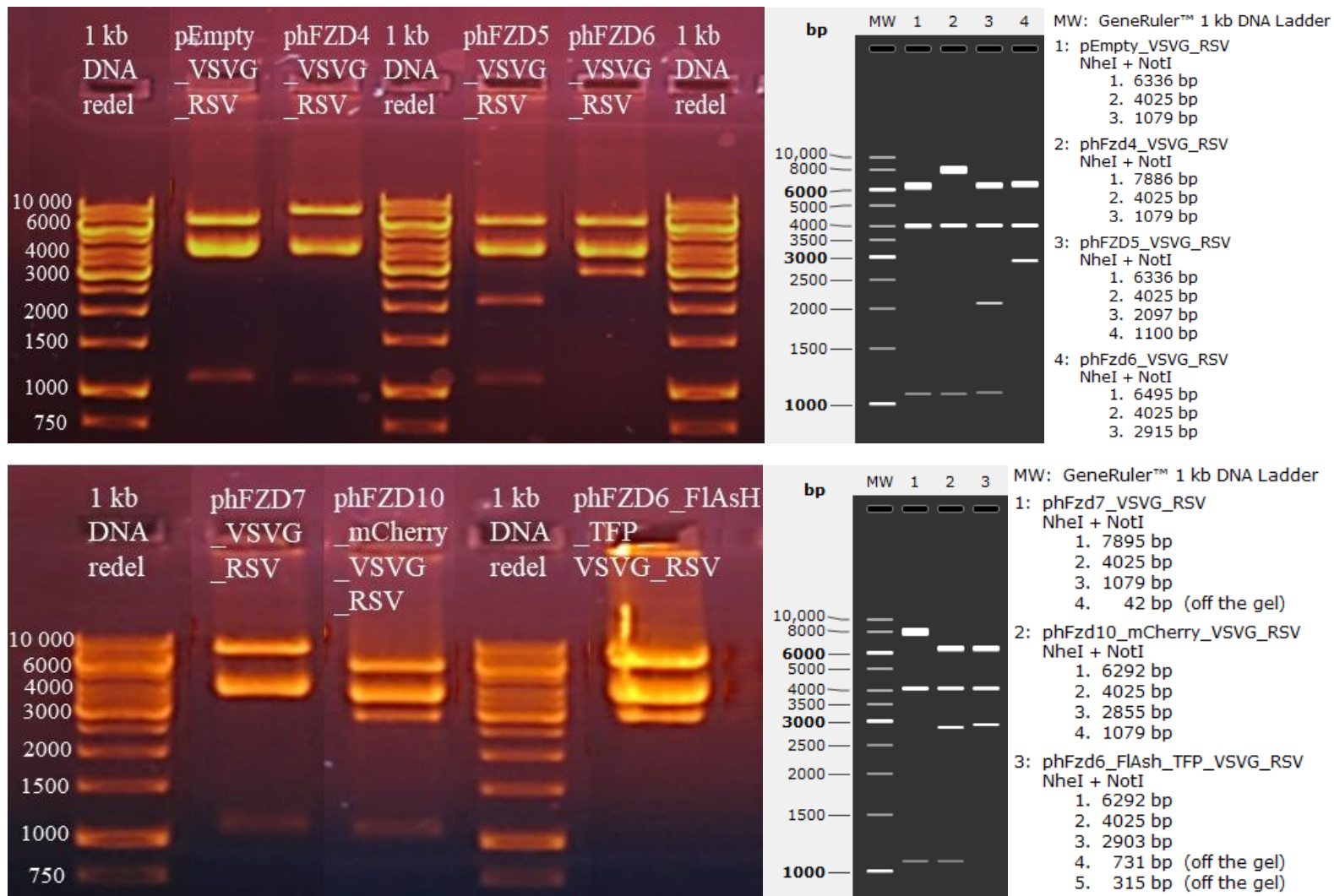
Lisa 6. Osa (Sweet)MultiBac(Mam)(VLP) plasmiidide raamatukogust Bioorgaanilise keemia õppetoolis. Kastidega on näidatud plasmiidid, mida kasutati käesolevas töös Cre-LoxP rekombinatsiooniks. Kriipsjooned kujutavad mõningaid näiteid Cre-LoxP rekombinatsiooniteedest tehtud töös. Sinisese kastiga on näidatud kassettkloonimise teel loodud plasmiid. Rohelisega on kujutatud gentamütsiini resistentsusega akseptorplasmiidid (pACE) ning sinise, punase ja violetsega doonorplasmiidid, mis on resistentsed erinevate antibiootikumide suhtes (klooramfenikool – pDC, kanamütsiin – pDK, spektinomütsiin – pDS). Promootorid (putukate - I, imetajate – M, topelt funktsiooniga (ühes kassetis putuka ja imetaja promootor) – IM ja erinevates kassetides putuka ja imetaja promootor – I-M) on näidatud kursiivkirjas.



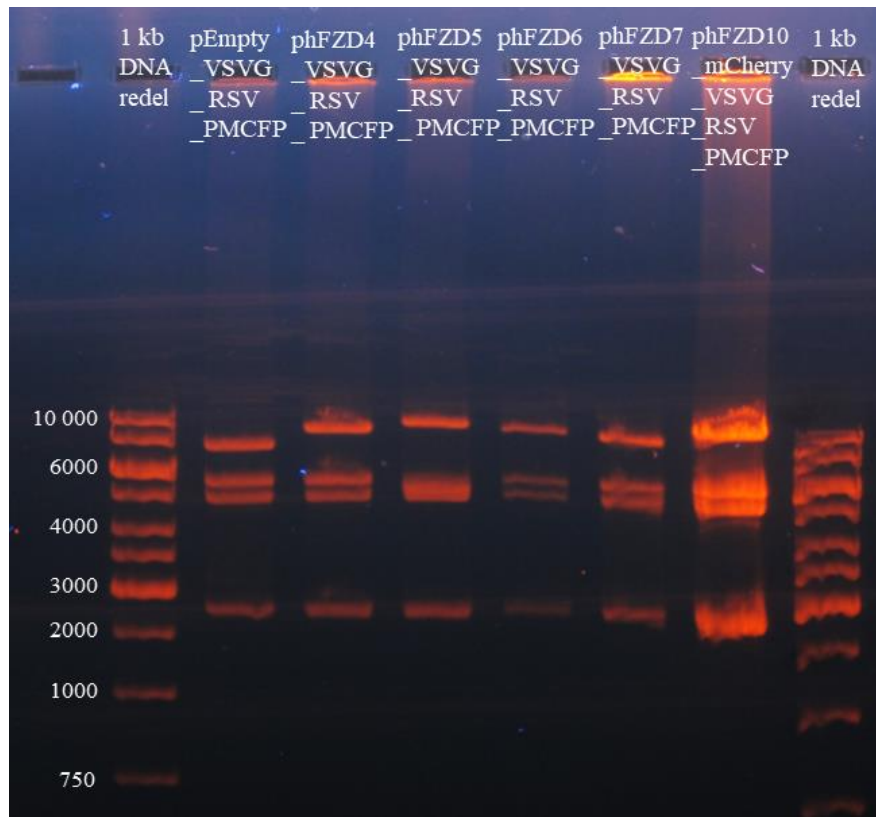
Lisa 7. Töös konstrueeritud plasmidi pDC_I_VSVG_M_SuperM_RSV_gag vektorkaart.
Vektorkaart on koostatud programmis SnapGene®.



Lisa 8. Plasmidi pDC_I_VSVG_M_SuperM_RSV_gag kassettkloonimise skeem. Näidatud on ensüümiga BstXI lõigatud lähteplasmid pDC_I_VSVG ning ensüümidega BstXI ja PI-SceI lõigatud lähteplasmid pDC_M_SuperM_RSV_gag. Toodud on ka eksperimentaalsed geelelektroforeesi pildid. Plasmiidide vektorkaardid on koostatud programmis SnapGene®.



Lisa 9. Restriksioonanalüüs Cre-LoxP reaktsiooni produktidele: plasmidi pDC_I_VSVG_M_SuperM_RSV_gag ühendamine FZD-retseptoreid kodeerivaid gene sisaldavate plasmiididega. Toodud on eksperimentaalne geelelektroforeesi pilt (vasakul) ning programmis SnapGene® simuleeritud geelelektroforeesi pilt ning teoreetiliselt arvutatud produktide suurused (paremal).



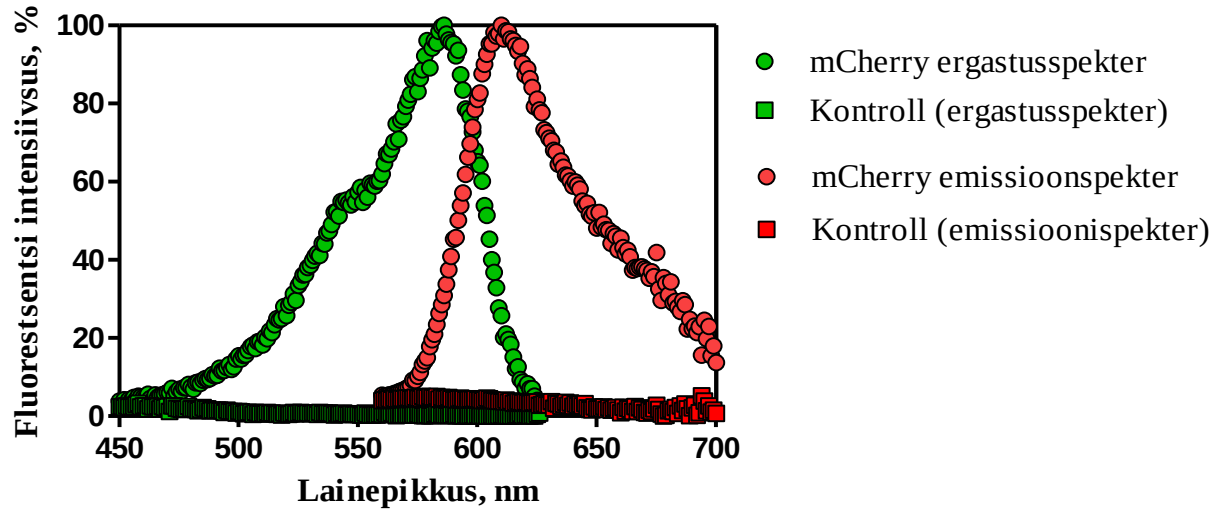
Lisa 10. Restriktsoonianalüüs Cre-LoxP reaktsiooni produktidele: plasmiidide FZD(x)_VSVG_RSV_PMCFP ühendamine plasmiidiga pDS_IM_MyrPalm_CFP. Toodud on eksperimentaalne geelelektroforeesi pilt.

Bakuloviiruse nimi	Tiiter [log(ivp/ml) ± sd]
1. Empty_VSVG_RSV_PMCFP	7,21 ± 0,13
2. Empty_VSVG_PMCFP	6,32 ± 0,13
3. Empty_VSVG_RSV	7,3 ± 0,3
4. hFZD4_VSVG_RSV_PMCFP	6,1 ± 0,3
5. hFZD4_VSVG_RSV	7,6 ± 0,3
6. hFZD5_VSVG_RSV_PMCF	6,8 ± 0,3
7. hFZD5_VSVG_RSV	7,8 ± 0,3
8. hFZD6_VSVG_RSV_PMCFP	6,5 ± 0,2
9. hFZD6_VSVG_RSV	7,3 ± 0,3
10. hFZD7_VSVG_RSV_PMCFP	7,16 ± 0,15
11. hFZD7_VSVG_RSV	8,1 ± 0,4
12. hFZD6_FlAsH_TFP_VSVG_RSV	7,1 ± 0,2
13. hFZD10_mCherry_VSVG_RSV	6,70 ± 0,19
14. hFZD10_mCherry_VSVG_RSV_PMCFP	6,81 ± 0,18

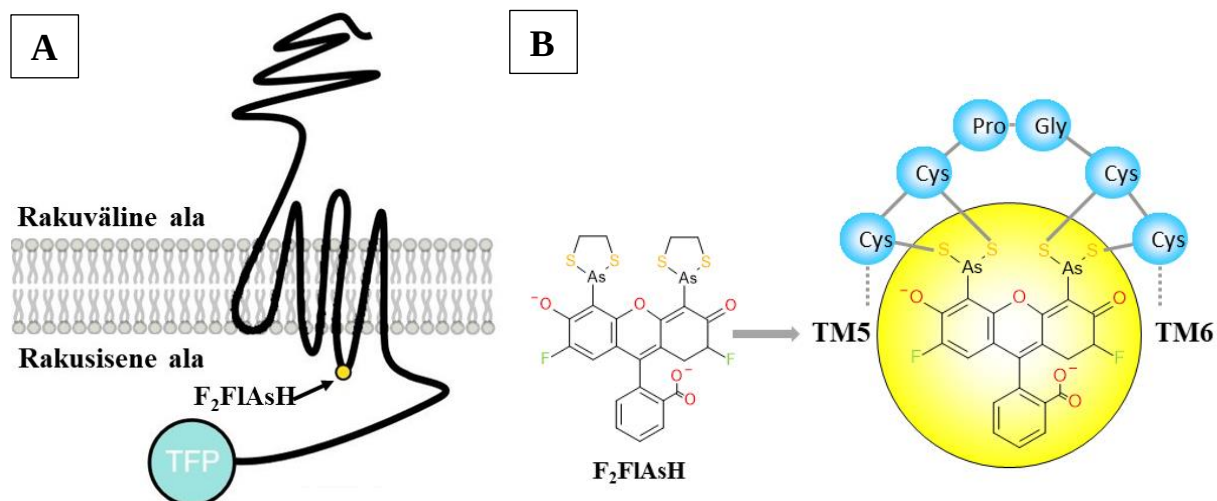
Lisa 11. Bakuloviiruste tiitrid.



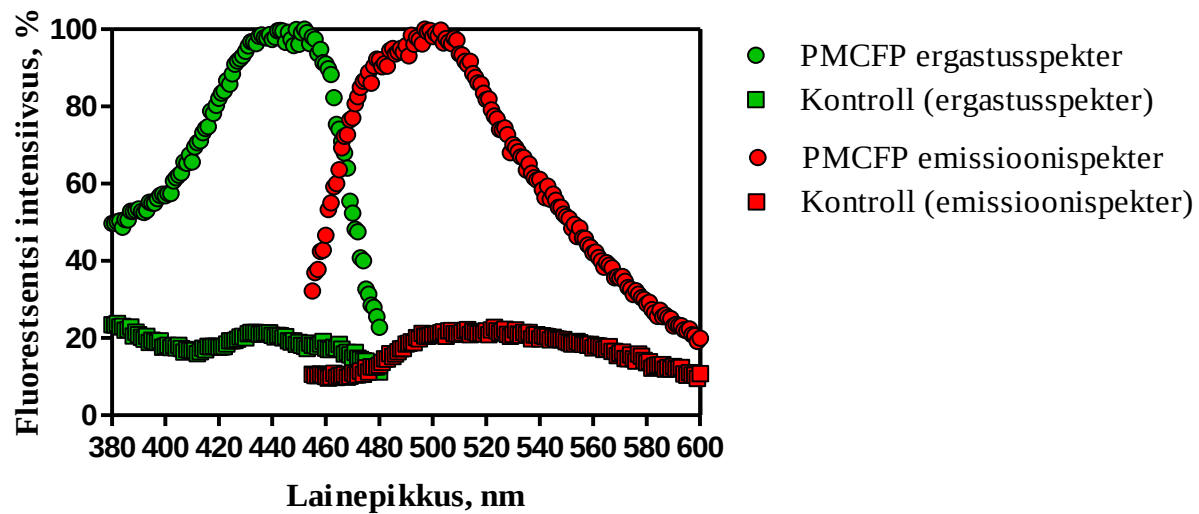
Lisa 12. Bakuloviirusega hFZD10-mCherry-VSVG-RSV nakatatud ja 72 tunni möödudes tsentrifugeeritud *Sf9* rakud.



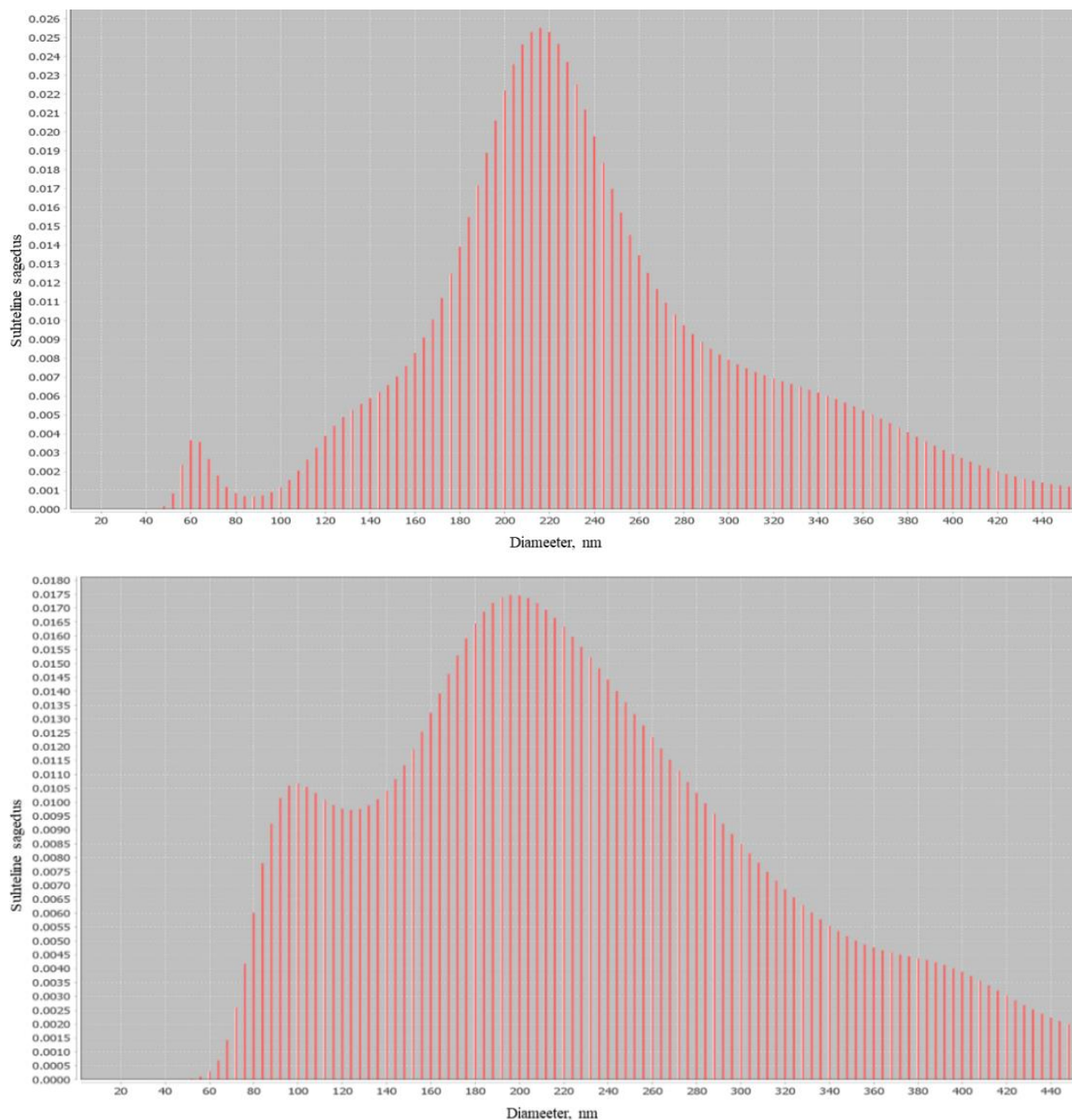
Lisa 13. mCherry ergastus- ja emissioonspekter. mCherry spekter mõõdeti bakuloviirusega hFZD10_mCherry_VSVG_RSV nakatatud imetajarakkudest kogutud ja TFF-ga kontsentreeritud rakuvälistest osakekestest. Kontrollina kasutati bakuloviirusega Empty_VSVG_RSV_PMCFP nakatatud imetajarakkudest samadel tingimustel kogutud ja TFF-ga kontsentreeritud rakuväliseid osakesi. mCherry ergastusspekter koguti lainepikkustel 450 nm kuni 625 nm, emissiooniga lainepikkusel 650 ± 10 nm ning emissioonspekter lainepikkustel 560 nm kuni 700 nm, ergastusega lainepikkusel 535 ± 10 nm.



Lisa 14. FZD6-FlAsH-TFP proov. A: Näidatud on modifitseeritud FZD6-retseptor, mille C-terminaalses alas paikneb TFP ning TM5 ja TM6 vahelises alas paineb $F_2\text{FlAsH}$. Joonis on kohandatud Kozielwicz et al. (2020) artiklist. B: Näidatud on $F_2\text{FlAsH}$ struktuur ning $F_2\text{FlAsH}$ seondumine tetratsüsteiinse aminohappejärjestusega (-Cys-Cys-Pro-Gly-Cys-Cys-), mis paikneb FZD6-retseptori TM5 ja TM6 vahelises aasas. $F_2\text{FlAsH}$ struktuurvalem on tehtud programmis ISIS/Draw.



Lisa 15. PMCFP ergastus- ja emissioonispekter. PMCFP spekter mõõdeti bakuloviirusega Empty_VSVG_RSV_PMCFP nakatatud imetajarakkudest. Kontrollina kasutati bakuloviirusega hFZD10_mCherry_VSVG_RSV nakatatud imetajarakke. PMCFP ergastusspekter koguti lainepikkustel 380 nm kuni 480 nm, emissiooniga lainepikkusel 500 ± 10 nm ning emissioonispekter lainepikkustel 455 nm kuni 600 nm, ergastusega lainepikkusel 435 ± 10 nm.



Lisa 16. Fluorestsentsosakeste diameetri tõenäosusjaotus. Ülemine joonis: bakuloviirusega Empty_VSVG_PMCFP nakatatud imetajarakkudest kogutud ja TFF-ga kontsentreeritud rakuvälised osakesed. Alumine joonis: bakuloviirusega Empty_VSVG_RSV_PMCFP nakatatud imetajarakkudest kogutud ja TFF-ga kontsentreeritud rakuvälised osakesed. Graafikute loomiseks kasutati Thorsten Wagneri poolt loodud NanoTrackJ ImageJ plugin-i.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Carmen Piirsalu

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

“ MultiBacMam süsteem Frizzled-retseptorite kuvamiseks nanoosakestel“,

mille juhendajad on Sergei Kopantšuk ja Santa Veikšina,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse 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 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Carmen Piirsalu
26.05.2022