Tartu Ülikool

Loodus- ja täppisteaduste valdkond

Keemia instituut

Bioorgaanilise keemia õppetool

Jane Torp

# Fluorestsentsmetoodikate arendamine ligandi

# seostumismehhanismi uurimiseks muskariinsele M4 retseptorile

Bakalaureusetöö keemias (6 EAP)

Juhendajad: Tõnis Laasfeld, MSc

Maris-Johanna Tahk, MSc

Tartu 2020

# 1 Sisukord

1		Sisu	ukord2					
2		Kasutatud lühendid						
3		Sissejuhatus						
4	4 Kirjanduse ülevaade				6			
	4.1 G-		G-v	b-valguga seotud retseptorid6				
	4.	2	Ligand-retseptor interaktsioon ja selle modelleerimine					
	4.	3	Muskariinsed retseptorid ja ligandide seostumismehhanismid					
	4.4		GPCR-ide ekspressioonisüsteemid9					
	4.	4.5 Flu		luorestsentsanisotroopia meetod10				
	4.	4.6 Epi		fluorestsentsmikroskoopia1	1			
5		Eksj	perir	perimentaalne osa12				
	5.	5.1 Ral		uliinid ja söötmed1	2			
	5.	5.2 Ap		ratuur ja töövahendid1	2			
	5.	5.3 Rel		ombinantse viirusvektori (DNA) paljundamine1	3			
	5.	5.4 Sf9		rakkude transfekteerimine1	3			
	5.	5.5 Rel		ombinantsete bakuloviiruste tiitrimine1	4			
	5.	5.6 M <sub>4</sub>		retseptoritega pungunud bakuloviiruse eraldamine1	5			
	5.	5.7 M <sub>4</sub>		retseptoritega bakuloviiruse preparaadi ruumala varieerimise katse1	5			
5.8		Ligandide konkureerimiskatsed M4 retseptorile bakuloviirusel16						
	5.	9	Katsed CHO-K1-hM4 rakkudega		6			
		5.9.1		CHO rakkude värvimine DiI fluorestsentsvärviga1	6			
5		5.9.2		CG72 seostumiskineetika uurimine CHO-K1-hM4 rakkudel1	7			
		5.9.	3	Konkureerimiskatsed CHO-K1-hM4 rakkudel1	7			
	5.	10	And	lmeanalüüs1	7			
		5.10.1		Fluorestsentsanisotroopia meetodi katsete analüüs1	7			
5.1		5.10	).2	Ligand-retseptor interaktsiooni kineetika modelleerimine1	8			

5.10.3		.10.3	Ilastik tarkvaraga rakutuvastusmudelite loomine			
5.10.4		.10.4	Mikroskoopiapiltidelt ligandi sidumisparameetrite arvutamine19			
6 Tulem		ulemus	ed ja arutelu			
	6.1	$M_4$	bakuloviiruse preparaadi ruumala varieerimine20			
	6.2	Flue	prestsentsligandide MK342 ja CG72 M4 retseptorile seostumise kineetika21			
6.3 Fluorestsentsligandide MK342 ja CG72 M <sub>4</sub> retseptorile seostu modelleerimine		Fluo delleeri	prestsentsligandide MK342 ja CG72 M4 retseptorile seostumise mehhanismide mine			
6.4		Kor	nkureerimiskatsed fluorestsentsligandi MK342-ga bakuloviiruse süsteemis25			
	6.5	CG	72 seostumiskineetika CHO-K1-hM4 rakkudele			
	6.6	Kor	18 hkureerimiskatsed CHO-K1-hM4 rakkudel			
7	K	lokkuv	õte			
8	S	ummar	y34			
9	9 Kasutatud kirjandus					
1(	)	Infole	ht			
11	l	Lisad.				
12	2	Lihtlit	sents			

### 2 Kasutatud lühendid

- AIC Akaike informatsioonikriteerium (ingl k Akaike information criterion)
- cAMP tsükliline adenosiinmonofosfaat (ingl k cyclic adenosine monophosphate)
- CHO Hiina hamstri munasarja rakud (ingl k *Chinese hamster ovary cells*)
- CP Cheng-Prusoffi valem
- DiI 1,1'-dioktadetsüül-3,3,3',3'-tetrametüülindokarbotsüaniin perkloraat

DPBS – Dulbecco fosfaatpuhverdatud füsioloogiline lahus (ingl k Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)

- EDTA etüleendiamiintetraäädikhape (ingl k ethylenediaminetetraacetic acid)
- FA fluorestsentsanisotroopia
- FN valenegatiivne (ingl k false negative)
- FP valepositiivne (ingl k false positive)
- GPCR G-valguga seotud retseptorid (ingl k *G-protein coupled receptors*)
- G-valk guanosiintrifosfaati siduv valk
- IC<sub>50</sub> inhibitoorne kontsentratsioon (ingl k inhibitory concentration)
- $K_d-dissotsiatsioonikonstant$
- $K_i inhibiitori tasakaalukonstant$
- MOI nakatuskordsus (ingl k multiplicity of infection)
- MR muskariinsed retseptorid

Na-HEPES – 4-(2-hüdroksüetüül)piperasiin-1-etüülsulfoonhappe naatriumi sool (ingl k 4-(2hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)

- NMS N-metüülskopolamiin
- RS rakusisese ala piksel
- TP tõeselt positiivne (ingl k true positive)

### 3 Sissejuhatus

Muskariinsete retseptorite viis alatüüpi on seotud näiteks õppimisvõime, mälu ja südamelihase talitlusega. Häireid M<sub>4</sub> alatüübi toimimises seostatakse mitme neurodegeneratiivse haigusega. Seetõttu peetakse M<sub>4</sub> retseptorit potentsiaalseks ravimi sihtmärgiks. Muskariinsete retseptorite ortosteeriline sidumistasku on geneetiliselt konserveerunud, mistõttu on keeruline leida kindla alatüübi suhtes selektiivseid ligande. Alternatiivseks lahenduseks on sünteesida ligande, mis seostuvad allosteerilisse sidumistaskusse. Selleks on vaja paremini mõista ligandide seostumismehhanisme ja luua neid kirjeldavad mudelid.

Ligandide seostumismehhanismide uurimiseks ei piisa vaid afiinsuste määramisest, vaid oluline on ka ligand-retseptor interaktsiooni kineetika. Fluorestsentsanisotroopia meetod bakuloviiruse süsteemiga võimaldab uurida ligandide seostumise kineetikat retseptorile. Samas erineb bakuloviirusesüsteem füsioloogilistest tingimustest, mistõttu on oluline võrrelda mõõdetud tulemusi imetajaraku süsteemiga. Ligandide seostumise kirjeldamises imetajaraku süsteemiga sobivad erinevad mikroskoopiameetodid.

Käesoleva töö eesmärgiks on arendada fluorestsentsanisotroopia ja epifluorestsentsmikroskoopia metoodikad ligandide seostumise uurimiseks M4 retseptorile kasutades dualsteeriliste fluorestsentsligandide struktuurianalooge. Teiseks töö eesmärgiks on mõõtetulemuste alusel pakkuda välja mudel kahe fluorestsentsligandi seostumise kirjeldamiseks ning kontrollida saadud mudeli kehtivust M4 retseptorile. Lisaks on eesmärk kirjeldada klassikaliste ja uudsete sünteesitud ligande sidumisparameetreid retseptorile pungunud bakuloviiruse osakeste ja imetajarakkude pinnal.

## 4 Kirjanduse ülevaade

#### 4.1 G-valguga seotud retseptorid

G-valguga seotud retseptorid (ingl *G-protein coupled receptors*, GPCR) on membraanvalgud, mis vahendavad signaali raku välis- ja sisekeskkonna vahel. GPCR-id reageerivad mitmetele rakuvälistele signaalidele (hormoonid, neurotransmitterid, ioonid, footonid) ning edastavad info rakusisestele guanosiintrifosfaati (GTP) siduvatele valkudele (G-valkudele). Retseptori aktiveerumisel kandub signaal edasi raku sisse ning sõltuvalt G-valgust toimub rakus erinevaid muutusi: näiteks võib tõusta või langeda tsüklilise adenosiinmonofosfaadi (*cyclic adenosine monophosphate*, cAMP) kontsentratsioon või muutub tsütosoolne Ca<sup>2+</sup> ioonide kontsentratsioon (Rosenbaum *et al.* 2009).

Inimese genoom sisaldab ~800 erinevat GPCR-i kodeerivat geeni. Häired GPCR-ide funktsioonides põhjustavad erinevaid haiguslikke seisundeid, mis teeb GPCR-id oluliseks ravimi sihtmärgiks (Sriram and Insel 2018).

#### 4.2 Ligand-retseptor interaktsioon ja selle modelleerimine

Ligand on molekul, mis seostudes retseptorile moodustab ligand-retseptor kompleksi. Ligande klassifitseeritakse retseptori sidumistasku asukoha ning bioloogilise vastuse tekitamise võime alusel. Kehaomaste ehk endogeensete ligandide sidumistaskut retseptoril nimetatakse ortosteeriliseks sidumistaskuks. Allosteerilised modulaatorid võivad interakteeruda retseptoriga ortosteerilisest sidumistaskust eemal ning võivad muuta ortosteeriliste ligandide seostumise afiinsust. Positiivsed allosteerilised modulaatorid suurendavad ja negatiivsed allosteerilised modulaatorid vähendavad ortosteerilise ligandi afiinsust retseptorile. On ka dualsteerilisi ligande, mis seostuvad korraga nii allosteerilseks kui ka ortosteerilises sidumistaskusse. Agonist on ligand, mis seostudes retseptorile tekitab antud retseptorile omase bioloogilise vastuse. Antagonistiks nimetatakse ligandi, mis takistab agonisti seostumist ja ei aktiveeri retseptorit (Kamal and Jockers 2009).

Lisaks sidumistasku asukohale ja bioloogilise vastuse tüübile on oluline ka ligand-retseptor kompleksi moodustumise ja dissotsiatsiooni kineetika. Lihtsaim reaktsioon, mis kirjeldab ligandi seostumist retseptorile, on:

$$R + L \rightleftharpoons RL, \tag{a}$$

milles R on retseptor, L on ligand ning RL on ligand-retseptor kompleks. Reaktsiooni (a) pärisuunalise reaktsiooni kiirus  $v_f$  avaldub kui:

$$v_f = k_f[R][L] \tag{1}$$

ning pöördsuunalise reaktsiooni kiirus vr:

$$v_r = k_r [RL], \tag{2}$$

milles  $k_f$  ja  $k_r$  on vastavalt päri- ja pöördsuunalise reaktsiooni kiiruskonstandid. Ligandide afiinsust kirjeldatakse ligand-retseptor kompleksi tasakaalulise dissotsiatsioonikonstandi  $K_d$ abil, mida saab avaldada nii reaktsioonis osalevate ainete kontsentratsioonide kui ka päri- ja pöördsuunalise reaktsiooni kiiruskonstantide suhte kaudu võrranditest (1) ja (2) (Kenakin 2016):

$$K_d = \frac{[R][L]}{[RL]} = \frac{k_r}{k_f}.$$
 (3)

Sageli ei ole võimalik uuritava ligandi dissotsiatsioonikonstanti otse mõõta, vaid kasutatakse konkureerivat ligandi teadaoleva afiinsusega märgistatud ligandi väljatõrjumiseks. Võrrand (3) kehtib nii märgistatud kui ka konkureeriva ligandi kohta. Eelnevast saab tuletada Cheng-Prusoffi võrrandi (Cheng and Prusoff 1973):

$$pK_i = pIC_{50} + \log\left(\frac{[A]}{K_d} + 1\right),\tag{4}$$

milles  $K_i$  on konkureeriva ligandi tasakaaluline dissotsiatsioonikonstant, IC<sub>50</sub> (*inhibitory concentration*, inhibitoorne kontsentratsioon) on kontsentratsioon, mille juures märgistatud ligandi tekitatav signaal on vähenenud poole võrra, [A] tähistab kasutatud märgistatud ligandi kontsentratsiooni ning  $K_d$  tähistab märgistatud ligandi dissotsiatsioonikonstandi väärtust. Cheng-Prusoffi valem kehtib järgmiste eelduste korral:

- 1. Nii konkureeriv kui ka märgistatud ligand seostuvad konkureerivalt samasse sidumistaskusse.
- Nii märgistatud ligandi kui ka konkureeriva ligandi seostumine retseptorile on täielikult pöörduv.
- 3. Süsteem on tasakaaluolekus.
- 4. Märgistatud ligandi tasakaaluline kontsentratsioon on teada.
- 5. Konkureeriva ligandi afiinsus ei tohi olla palju kõrgem kui märgistatud ligandi afiinsus.

Igas mõõtesüsteemis võrrandi (4) eeldused ei kehti, seetõttu tuleb kasutada keerulisemat analüüsimetoodikat. Näiteks võib toimuvaid reaktsioone kirjeldada harilike diferentsiaalvõrrandite süsteemiga, mis võimaldab kirjeldada mitme reaktsiooni samaaegset toimumist (Rinken *et al.* 2018). Üheks võimaluseks on kasutada süsteemibioloogia tarkvarasid, mis kasutavad reaktsioonide simuleerimiseks numbrilisi meetodeid (Schmidt and Jirstrand 2006; Raue *et al.* 2015). Mudelite kirjeldused esitatakse tüüpiliselt standardiseeritud SBML (*systems biology markup language*) formaadis (Hucka *et al.* 2003).

Mudeli parameetreid optimeeritakse lähtuvalt katseandmetest, misjärel saab mudeli ennustuse ja katseandmete võrdlemisel kontrollida reaktsioonimehhanismi kehtivust. Tervikanalüüsi korral teostatakse regressioonanalüüs korraga kõikidele mõõdetud andmetele ning eeldatakse, et kõikide andmehulkade korral on mudeli parameetrid samad. Mudeli loomisel ja valideerimisel lähtutakse põhimõttest, et süsteemi kirjeldamiseks sobilik mudel peaks olema matemaatiliselt võimalikult lihtne, kuid piisavalt hästi ennustama mõõdetud süsteemi käitumist. Mudeli valideerimise statistiliseks hinnanguks võib kasutada Akaike või Bayesi informatsioonikriteeriumit (Akaike 1974; Schwarz 1978).

#### 4.3 Muskariinsed retseptorid ja ligandide seostumismehhanismid

Muskariinsed retseptorid (MR) on GPCR-id, mida ekspresseeritakse nii kesk- kui ka piirdenärvisüsteemis. MR-ide endogeenne ligand atsetüülkoliin aktiveerib fosfolipaas C $\beta$ -d (M<sub>1</sub>, M<sub>3</sub> ja M<sub>5</sub> alatüüpide puhul) või inhibeerib adenülaadi tsüklaasi (M<sub>2</sub> ja M<sub>4</sub> alatüüpide puhul), mis omakorda viib rakusisese cAMP-i sisalduse languseni (Foreman *et al.* 2011: 80-81). Kesknärvisüsteemis olevad MR-id on seotud näiteks õppimise, mälu, une, tähelepanuvõime ja motoorika reguleerimisega (Haga 2013).

Antud uurimistöö raames keskenduti MR M<sub>4</sub> alatüübile, kuna seda on seostatud mitme neurodegeneratiivse haigusega, sh skisofreenia, alkoholism (Walker *et al.* 2020) ja Alzheimeri tõbi. M<sub>4</sub> alatüübi uudsed selektiivsed ligandid võivad osutuda ravimikandidaatideks eelpool nimetatud haiguste ravimisel (Dencker *et al.* 2012). MR alatüüpide ortosteeriliste sidumistaskute sarnasuse tõttu on keeruline leida MR alatüüpide suhtes selektiivseid ligande (Felder *et al.* 2018; Thal *et al.* 2016). Alternatiivse võimalusena uuritakse allosteerilisi ligande, sest MR alatüüpide allosteerilised sidumistaskud on piisavalt erineva struktuuriga (Chan *et al.* 2008). Huynh *et al.* 2015 sünteesisid mitmeid allosteerilisi modulaatoreid M<sub>4</sub> retseptorile, mis moduleerivad ortosteerilise ligandi atsetüülkoliini afiinsust.

Dualsteerilised ligandid annavad samuti võimaluse suurendada ligandide selektiivsust MR-i alatüübi suhtes, sest dualsteeriliste ligandide afiinsus tuleneb nii ortosteerilisse kui ka allosteerilisse sidumistaskusse seostuvast molekuli osast. Näiteks M<sub>2</sub> retseptorile on sünteesitud klassikalise MR-ide antagonisti pirensepiini struktuuri põhjal mitu selektiivset ligandi, mis olid 30 korda afiinsemad M<sub>2</sub> retseptorile võrreldes M<sub>3</sub> või M<sub>5</sub> retseptoriga (She *et al.* 2020). Ka käesolevas töös kasutatud ligandid UR-SK-II-75, UR-SK-III-59 (*Lisa 1*) (She *et al.* 2017), UR-MK259 (Pegoli *et al.* 2017), MK342 ja CG72 (*Lisa 2*) on varasemalt sünteesitud ligandide analoogid. Dualsteeriliste ligandide puhul on alust arvata, et lihtsa ühe seostumissaidi mudeliga arvutatud konkureeriva ligandi afiinsus erineb tegelikust afiinsusest. Seega ei pruugi Cheng-Prusoffi võrrand anda piisavalt täpseid tulemusi ning võib osutuda vajalikuks eelistada keerulisemat mudelit, mis võtab arvesse võimalust, et ligand saab seostuda nii ortosteerilisse kui ka allosteerilisse sidumistaskusse.

MR-idele on pakutud ka dünaamilisi mudeleid, mis kirjeldavad retseptor-ligand kompleksi tekkimise kineetikat. N-metüülskopolamiini (NMS) dissotsiatsiooni sõltuvus geneetilistest modifikatsioonidest ja vastavad molekulaardünaamika simulatsioonid M<sub>2</sub> retseptorile näitasid, et ortosteerilise antagonisti N-metüülskopolamiini (NMS) seostumine retseptori ortosteerilsse sidumistaskusse on mitmeetapiline protsess. Kõigepealt interakteerub NMS aminohapetega retseptori rakuvälistel aasadel allosteerilises saidis, misjärel liigub NMS sügavamale retseptori sisse ortosteerilsse sidumistaskusse (Jakubík *et al.* 2017). Samas ei ole teada, kas saadud tulemused on üldistatavad ka teistele MR alatüüpidele.

#### 4.4 GPCR-ide ekspressioonisüsteemid

GPCR-ide ekspressioonitase füsioloogilistes süsteemides ei ole tavaliselt piisavalt suure läbilaskevõimega ligandi sidumise uurimismeetodite jaoks, näiteks fluorestsentsanisotroopia või epifluorestsentsmikroskoopia meetodid. Seetõttu on vaja GPCR-e üleekspresseerida, milleks saab kasutada näiteks *Escherichia coli*, pärmseeni, imetajarakke ja bakuloviirusi (Massotte 2003). Neist kaks viimast on kasutusel selles töös retseptorite üleekspresseerimiseks.

Bakuloviirused on looduslikud putukate DNA viirused, mis paljunevad putukarakkude tuumas. Nakatades putukarakke rekombinantse *Autographa californica* multikapsiidse nukleopolühedroviirusega (AcMNPV), ekspresseerub uuritava GPCR-i tootmist kodeeriv geen ning ühtlasi paljundatakse bakuloviirust. Rakust pungudes saab viirus putukaraku membraani koos üleekspresseeritud GPCR-idega (Massotte 2003). Saadud bakuloviiruse preparaadis on bakuloviiruse osakesed ovoidi kujulised mõõtmetega 30-70 nM x 200-400 nM (Wang *et al.*  2016). Varasemalt on Tartu Ülikooli Bioorgaanilise keemia töörühmas selle süsteemiga edukalt saavutatud näiteks melanokortiini  $MC_4$  ja dopamiin  $D_1$  retseptorite üleekspresseerimine (Veiksina *et al.* 2014; Allikalt *et al.* 2018).

Võrreldes imetajarakkudega on putukarakkude membraanide koostises rohkem küllastumata lipiide ning madalam kolesterooli hulk, mis mõjutavad membraanide fluiidsust. Käesolevas töös toodetud bakuloviiruse preparaadis puuduvad G-valgud, mis võib põhjustada agonistide madalamat afiinsust võrreldes füsioloogilise süsteemidega (Massotte 2003).

#### 4.5 Fluorestsentsanisotroopia meetod

Fluorestsentsanisotroopia (FA) on molekulide interaktsioonide uurimisel kasutatav mõõtemeetod. FA mõõtmisel ergastatakse fluorestsentsmärgisega molekuli lineaarselt polariseeritud valgusega ning seejärel mõõdetakse ergastuskiirguse polarisatsioonitasandi suhtes risti ja paralleelselt polariseeritud fluorestsentsi intensiivsust (*Joonis I*). Fluorestsentsmärgisega ligandi seostumisel valgule väheneb fluorestsentsligandi rotatsiooniline difusiooni ajakonstant  $\varphi$ .  $\varphi$  erinevus põhjustab FA väärtuste erinevust vaba ja seotud ligandi vahel, mida kirjeldab Perrini võrrand (Weber 1952) (5):

$$FA = \frac{FA_0}{1 + \frac{\tau}{\phi}}.$$
(5)

 $FA_0$  on fluorestsentsanisotroopia kui molekuli rotatsioonist tulenevat depolarisatsiooni ei esine ning  $\tau$  on fluorestsentsi eluiga.



Joonis 1. Fluorestsentsanisotroopia meetod. Fluorestsentsmärgisega molekuli ergastatakse lineaarselt polariseeritud valgusega. Sõltuvalt sellest, kui suur on ergastatava fluorestsentsligandi rotatsiooniline vabadus, on emiteeruval fluorestsentsvalgusel kõrge või madal anisotroopia.

FA meetodit saab kasutada ka ravimikandidaatide uurimiseks, kuid selleks on tarvis sobivat fluorestsentsligandi. Käesolevas töös kasutatakse fluorestsentligandidena uusi dibensodiasepinooni põhjal sünteesitud ligande MK342 ja CG72. Fluorestsentsanisotroopia

muutuse detekteerimiseks on vajalik tingimus, et retseptori ja ligandi kontsentratsioonid oleksid samas suurusjärgus (Rinken *et al.* 2018).

FA meetodi eelis võrreldes teiste meetoditega, näiteks radioligandi meetodiga, on võimalus koguda andmeid retseptor-ligand interaktsiooni kohta vaba ligandi eraldamata. Võrreldes mikroskoopiameetoditega on FA eeliseks kiire andmeanalüüs (Rinken *et al.* 2018).

Potentsiaalse ravimikandidaadi puhul on oluline tekitatava farmakoloogilise efekti pikkus, mida määrab peamiselt ligandi viibeaeg retseptoril. Seetõttu pole tasakaalulistes tingimustes määratud tasakaalukonstandi K<sub>i</sub> teadmine piisav ligandi farmakoloogiliste omaduste ennustamiseks. Farmakoloogilise efekti kestuse ennustamiseks on oluline esmalt mõista ligandi seostumismehhanismi retseptorile ning seejärel määrata ligandi assotsiatsiooni- ja dissotsiatsioonireaktsioonide kiiruskonstandid (Copeland 2016). FA meetod on sobilik ligandide kineetiliste parameetrite määramiseks (Link *et al.* 2017).

#### 4.6 Epifluorestsentsmikroskoopia

Ligandi sidumisparameetrite uurimiseks saab kasutada erinevaid mikroskoopiameetodeid. Võimalik on mõõta interaktsioone nii raku kui ka üksikmolekulide tasandil. Selles töös kasutati epifluorestsentsmikroskoopiat, mis mõõdab proovist emiteerunud fluoretsentsi intensiivsust. Epifluorestsentsmikroskoopias läbib nii ergastav valgus kui ka proovist emiteeruv valgus sama filtri. Proovi ergastakse kasutatavale fluorofoorile vastavas ergastuslainepikkuste vahemikus. Stokesi nihke tõttu saab lihtsa filtrite süsteemiga eraldada molekulide ergastuse tagajärjel emiteerunud fluorestsentsvalgust tagasipeegeldunud valgusest. Sobivate fluorestsentsligandidega on võimalik epifluorestsentsmikroskoopia meetodit kasutades mõõta ligand-retseptor interaktsioone elusrakkude membraanidel. Mõõtmistel tuleb arvesse võtta aspekti, et kogu kasutatav fluorestsentsligand on lahuses, seega võib taustfluorestsents segada spetsiifilise signaali mõõtmist. Epifluorestsentsmikroskoopia võimaldab koguda andmeid korraga paljude rakkude kohta ning mõõtmine on lihtsasti automatiseeritav (Webb and Brown 2012).

# 5 Eksperimentaalne osa

### 5.1 Rakuliinid ja söötmed

Töös kasutati tähtöölase *Spodoptera frugiperda* munasarjast eraldatud Sf9 rakuliini (Invitrogen). Sf9 rakkude kasvatamiseks kasutati  $ExCell^{TM}$  420 seerumivaba söödet (Sigma-Aldrich). Rakke kasvatati temperatuuril 27 °C Erlenmeyer-i kolvis loksutil. Rakkude kontsentratsioon hoiti 1–4 x 10<sup>6</sup> rakku/ml.

Rakukatsetes kasutati M<sub>4</sub> retseptorit ekspresseeriva Hiina hamstri munasarja CHO-K1 liini rakke (CHO-K1-hM<sub>4</sub>), mis saadi dr Max Kelleri töörühmast (Regensburgi Ülikool, Saksamaa). CHO-K1-hM<sub>4</sub> rakke kasvatati Petri tassidel 37 °C juures 5%-lises CO<sub>2</sub> atmosfääris DMEM/F12 söötmes (Sigma-Aldrich), millele oli lisatud 9% veiseloote seerumit (*fetal bovine serum*, FBS) (Sigma-Aldrich) antibiootikumide ja fungitsiidi segu (100 U/ml penitsilliini, 0,1 mg/ml streptomütsiini, 0,25  $\mu$ g/ml amfoteritsiin B-d) (Sigma-Aldrich) ja selektsiooni antibiootikumi 750  $\mu$ g/ml genetitsiini (G418) (Capricorn Scientific).

### 5.2 Aparatuur ja töövahendid

Sf9 rakkude loendamiseks ning elusrakkude osakaalu hindamiseks lisati Sf9 rakkudele 0,4% trüpaansinise lahust DPBS puhvris (Sigma-Aldrich) ning kasutati rakuloendurit TC10<sup>™</sup> Automated Cell Counter (Bio-Rad laboratories).

Ligandid UR-MK259, UR-SK-II-75, UR-SK-II-59, CG72 ja MK342 saadi dr Max Kelleri käest (Regensburgi Ülikool, Saksamaa). Konkureerivate ligandidena kasutati agoniste karbakool (Tocris), atsetüülkoliin, arekoliin, pilokarpiin ja antagoniste skopolamiin, atropiin, pirensepiin (kõik Sigma-Aldrich) (*Lisa 3*). Ligande säilitati temperatuuril -20 °C DMSO lahuses. Fluorestsentsligandide CG72 ja MK342 emalahuste kontsentratsioonid olid 5  $\mu$ M, arekoliini, atsetüülkoliini, pilokarpiini ja karbakooli emalahuste kontsentratsioonid olid 100 mM ning teiste ligandide emalahuste kontsentratsioonid olid 10 mM.

Bakuloviiruse kogumisel ning fluorestsentsanisotroopia mõõtmistel kasutati värskelt valmistatud modifitseeritud Krebs-Ringer puhvrit koostisega Milli-Q vesi, 135 mM NaCl (AppliChem), 1 mM CaCl<sub>2</sub> (AppliChem), 5 mM KCl (AppliChem), 1 mM MgCl<sub>2</sub> (AppliChem), 11 mM Na-HEPES (pH = 7,4) (Sigma-Aldrich), 25-kordse lahjendusega EDTA-vaba proteaasi inhibiitorkokteil (Roche) ning 0,1% Pluronic® F-127 (Sigma-Aldrich).

Fluorestsentsintensiivsuse mõõtmiseks bakuloviiruse süsteemiga kasutati mikrotiiterplaadi lugejat Synergy<sup>™</sup> NEO (BioTek) ja polarisatsioonifiltrit ergastuslainepikkusel 530 nm ribalaiusega 30 nm ning valgusfiltrit emissioonlainepikkusel 590 nm ribalaiusega 35 nm. Emiteeruva valguse eraldamiseks ergastuskiirguse polarisatsioonitasandi suhtes paralleelseks ja risti polariseeritud valguseks kasutati kiirelõhestit. CHO-K1-hM4 rakkude pildistamiseks ja fluorestsentsintensiivsuse mõõtmiseks kasutati mikroplaadi lugejat Cytation<sup>™</sup> 5 (BioTek Instruments). Kasutati LUCPLFLN 20x objektiivi (Olympus), LED valgusallikat ergastuslainepikkusel 531 nm ribalaiusega 40 nm ja optilist filtrit (BioTek Instruments) emissioonlainepikkusel 593 nm ribalaiusega 40 nm.

Andmete kogumisel Synergy<sup>™</sup> NEO aparaadiga kasutati programmi Gen5 v2.07.17 (BioTek) ja Cytation<sup>™</sup> 5 aparaadiga mõõtmiste tegemisel kasutati programmi Gen5 Image v3.0.4 (BioTek).

#### 5.3 Rekombinantse viirusvektori (DNA) paljundamine

Rekombinantsete bakuloviiruste valmistamiseks kasutati Bac-to-Bac<sup>™</sup> bakuloviiruse ekspressioonisüsteemi (ThermoFischer) *E. Coli* DH10Bac liini rakkude ja pFastBac<sup>™</sup> 1 doonorplasmiidiga. M<sub>4</sub> retseptorit ekspresseeriva geeni kloonimise pFastBac<sup>™</sup> 1 doonorplasmiidi viis läbi dr Anni Allikalt. DH10Bac rakkude transformeerimine viidi läbi Bac-to-Bac juhendi (Thermo Fischer Scientific 2018: 17-19) järgi.

Rekombinantse bakmiidi DNA puhastamise etapi viis läbi Maris-Johanna Tahk MidiPrep Kit (ThermoFischer) juhendi järgi, kuid spinnkolonni asemel kasutati isopropanooliga ümbersadestamist. Peale puhastamist mõõdeti spektromeetriga NanoDrop 1000 (ThermoFischer) DNA puhtus ja kontsentratsioon. DNA proovide mõõtmisel kasutatakse puhtuse hindamiseks lainepikkuste 260/280 ja 260/230 suhteid. Lainepikkusel 260 nm on nii DNA kui ka RNA neeldumismaksimum. Mõõtes neelduvust 280 nm juures, saab hinnata valkude põhjustatud saastatust proovis. Puhaste nukleiinhapete 260/280 lainepikkuste suhe jääb vahemikku 1,8-2,0. 230 nm juures neelavad valgust guanidiin, fenool, glükogeen ning süsivesikud. Puhaste DNA proovide puhul peaks 260/230 lainepikkuste suhe jääma vahemikku 2,0-2,2 (Matlock 2015). Käesolevas töös oli pärast DNA puhastamist 260/280 ja 260/230 lainepikkuste suhted vastavalt 1,95 ja 2,48 ning kontsentratsioon 840 ng/µl.

#### 5.4 Sf9 rakkude transfekteerimine

Sf9 rakkude transfekteerimiseks kasutati transfektsioonireagenti FuGene 6 (Promega) järgides tootja protokolli (Promega: 6) ning 3 µg rekombinantset DNA-d. DNA-ga nakatatud rakud

kanti edasi Erlenmeyer-i kolbi, millele lisati 3 ml Sf9 rakke kontsentratsiooniga 2,4 x  $10^6$  rakku/ml elumusega 95% ning kasvatati loksutil inkubaatoris temperatuuril 27 °C kuni elumus langes alla 30%. Nakatatud rakususpensioon tsentrifuugiti kiirendusega 1300 g 10 minutit ja koguti supernatant bakuloviirustega (P1 põlvkonna viirus), mida säilitati valguskindlalt temperatuuril 4 °C. Viiruse amplifitseerimiseks nakatati 40 ml Sf9 rakke kasvufaasis (2,8 x  $10^6$  rakku/ml, elus rakkude osakaal 99%) 160 µl P1 põlvkonna viirusega. Bakuloviirus (P2 põlvkond, I partii) koguti supernatandina nagu eelnevalt kirjeldatud kui Sf9 rakkude elumus oli langenud alla 40%. P2 põlvkonna bakuloviiruse II partii valmistati P1 põlvkonna viirusest analoogselt eespool kirjeldatule.

#### 5.5 Rekombinantsete bakuloviiruste tiitrimine

Pärast bakuloviirusega nakatumist suureneb Sf9 rakkude diameeter ning loendades suurenenud diameetriga rakke on võimalik määrata nakatumisvõimeliste osakeste kontsentratsiooni (Janakiraman *et al.* 2006). Käesolevas töös leiti P2 põlvkonna bakuloviiruse tiiter rakusuuruse muutuse mõõtmisel põhineva pildianalüüsimeetodiga (*Image-based cell size estimation*, ICSE) (Laasfeld *et al.* 2017).

Sf9 rakud kanti Nuclon 24-kohalisele plaadile (2 x 10<sup>5</sup> rakku/250 µl ExCell söötme kohta) ning inkubeeriti 60 minutit. P2 bakuloviirusest tehti 12 kolmekordset seerialahjendust, 250 µl igat seerialahjendust pipeteeriti duplikaatides katseplaadil kinnitunud rakkudele. Viiruse lahusega rakke inkubeeriti 24 h temperatuuril 27 °C ning pildistati seejärel kõiki süvendeid kasutades Cytation<sup>™</sup> 5 aparaati ühilduva Gen5 tarkvaraga.

Bakuloviiruse tiitrimisest saadud tulemusi analüüsiti programmi GraphPad Prism abil mittelineaarse regressiooniga (kolmeparameetriline logistiline kontsentratsioon-vastus mudel) ning arvutati nakatusvõimeliste viirusosakeste kontsentratsioon C<sub>nakatusvõimelised</sub> valemist (4) (Laasfeld *et al.* 2017):

$$C_{nakatusv\tilde{o}imelised} = \frac{Sf9\,rakkude\,arv}{EC_{50}},\tag{4}$$

milles rakkude arv tähistab Sf9 rakkude arvu süvendis, mis oli 2 x 10<sup>5</sup>. Bakuloviiruse P2 põlvkonna viiruse tiitrimiskõver on *Lisa 5*. Nakatumisvõimeliste viirusosakeste kontsentratsiooni ühikuks on ivp/ml (*infectious virus particles*, ivp/ml).

#### 5.6 M<sub>4</sub> retseptoritega pungunud bakuloviiruse eraldamine

Suure ruumala kõrge retseptori kontsentratsiooniga bakuloviiruse osakeste tootmiseks amplifitseeriti P2 põlvkonna I partii viirust. Tiitrimise tulemustest arvutati P3 põlvkonna viiruse tootmiseks vajaminev viiruse ruumala valemist (3):

$$V_{viirus} = \frac{MOI * Sf9 \, rakkude \, arv}{C_{nakatusvõimelised}},\tag{3}$$

milles MOI (multiplicity of infection) on nakatuskordsus.

P3 viirus valmistati madala nakatuskordsusega (MOI = 0,01) nakatades 110 ml Sf9 rakke (tihedus = 1,5 x  $10^6$  rakku/ml) 20 µl P2 põlvkonna viirusega (tiiter = 7,9 x  $10^7$  ivp/ml).

Kõrge retseptori kontsentratsiooniga bakuloviiruse osakeste tootmiseks nakatatakse Sf9 rakke MOI väärtusega 2,5-5. 900 ml Sf9 rakke (tihedus = 2,4 x  $10^6$  rakku/ml) nakatati 100 ml P3 põlvkonna viirusega (tiiter = 5,6 x  $10^7$  ivp/ml) ning saadi MOI = 2,6. Kolm päeva pärast nakatamist koguti bakuloviiruse osakesed (I partii) kui Sf9 rakkude elumus oli 55%.

Pungunud bakuloviiruse II partii tootmiseks nakatati 2 x 300 ml Sf9 rakke (tihedus =  $2,8 \times 10^6$  rakku/ml) 35 ml P2 põlvkonna II partii viirusega (tiiter =  $1,2 \times 10^8$  ivp/ml) ning saadi MOI = 5,0. Neli päeva pärast nakatamist koguti bakuloviiruse osakesed (II partii) kui Sf9 rakkude elumus oli 29%.

Sf9 rakkude eraldamiseks tsentrifuugiti suspensiooni kiirendusega 1300 g 10 min ning koguti supernatant. Saadud suspensiooni tsentrifuugiti bakuloviirusosakeste eraldamiseks temperatuuril 4 °C kiirendusega 48 000 g 45 minutit. Edaspidised sammud viidi läbi hoides lahuseid jääl, et vähendada valke lagundavate ensüümide aktiivsust. 50-kordseks kontsentreerimiseks eemaldati supernatant ning pungunud bakuloviiruse pelletit pesti 700 µl modifitseeritud Krebs-Ringer puhvriga. Seejärel resuspendeeriti sade 500 µl modifitseeritud Krebs-Ringer puhvriga kõigist tuubidest segati kokku, homogeniseeriti süstlaga, mille diameeter oli 0,3 mm, jagati alikvootidesse ja säilitati -90 °C juures. Enne katsetes kasutamist homogeniseeriti sulatatud bakuloviiruse preparaadi lahus taas süstlaga.

#### 5.7 M<sub>4</sub> retseptoritega bakuloviiruse preparaadi ruumala varieerimise katse

Bakuloviiruse preparaadi ruumala varieerimise katses kasutati fluorestsentsmärgisega ligande MK342 või CG72 ja konkureeriva ligandina M<sub>4</sub> retseptori antagonisti skopolamiini (Sigma-Aldrich). Nii bakuloviiruse preparaadi kui ka ligandide lahjenduste tegemiseks kasutati modifitseeritud Krebs-Ringer puhvrit. Bakuloviiruse preparaadist tehti kaheksa

seerialahjendust kahekordse lahjendusfaktoriga, kusjuures viimane lahus jäi bakuloviiruse preparaadita kontrolliks. Fluorestsentsligandi spetsiifilise seostumise uurimiseks kanti 96värvi süvendiga poole ruumalaga musta lamedapõhjalisele plaadile (Corning) fluorestsentsligand kahe erineva kontsentratsiooniga: MK342 lõppkontsentratsioonid olid 1 nM ja 6 nM; CG72 lõppkontsentratsioonid olid 5 nM ja 20 nM. Mittespetsiifilise seostumise süvenditesse kanti lisaks MK342 puhul 1 µM või 6 µM ja CG72 puhul 5 µM või 20 µM skopolamiini. Bakuloviiruse preparaadi seerialahjenduste lisamisega süvenditesse algatati reaktsioon. Tühiproovi süvenditesse kanti ainult bakuloviiruse preparaadi seerialahjendus. Fluorestsentsanisotroopia mõõtmiseks kasutati Synergy Neo-d.

#### 5.8 Ligandide konkureerimiskatsed M<sub>4</sub> retseptorile bakuloviirusel

Konkureerimiskatsetes kasutati fluorestsentsligandi MK342. Konkureerivatest ligandidest tehti seerialahjendused, süvenditesse lisati MK342 lõppkontsentratsiooniga 5 nM ja uuritava ligandi lahjendused duplikaatides. Baasijoone korrigeerimiseks lisati kahte süvendisse modifitseeritud Krebs-Ringer puhvrit ja 20 µl bakuloviiruse preparaati. Ligandidega süvendites alustati reaktsioon 20 µl bakuloviiruse preparaadi lisamisega. Lahuste lõppruumala süvendites oli 100 µl ning temperatuur kogu mõõtmise vältel oli 27 °C. Aurustumise vähendamiseks asetati plaadile katteklaas. Iga konkureeriva ligandiga teostati vähemalt kolm korduskatset eri päevadel. Fluorestsentsanisotroopiat mõõtmise algust 2 µl konkureerivat ligandi sellise lõppkontsentratsiooniga, mis põhjustab täieliku dissotsiatsiooni ( $C_{konkureeriv ligand} > 1000 x K_i$  v.a. atsetüülkoliini ja karbakooli puhul ( $C_{konkureeriv ligand} > 10 x K_i$ ).

#### 5.9 Katsed CHO-K1-hM4 rakkudega

Petri tassil kasvatatud rakke pesti 2 ml DPBS puhvriga (Sigma-Aldrich) ning inkubeeriti 2 ml 0.05% trüpsiini (Gibco) lahusega DPBS puhvris (Ca<sup>2+</sup> ja Mg<sup>2+</sup> vaba) 2 min temperatuuril 37 °C 5%-lises CO<sub>2</sub> atmosfääris. Seejärel eemaldati trüpsiini lahus ning rakud resuspendeeriti DMEM/F12 söötmes. 96-süvendiga läbipaistva ning lameda põhjaga katseplaadi (Ibidi) ruudukujulisse süvenditesse pipeteeriti 200  $\mu$ l DMEM/F12 söödet ning ~25 000 rakku suspensioonina iga süvendi kohta. Rakkudel lasti kuus tundi enne katset katseplaadile kinnituda. Temperatuur kogu mõõtmise vältel rakukatsetes oli 37 °C ning CO<sub>2</sub> sisaldus oli 5%.

#### 5.9.1 CHO rakkude värvimine Dil fluorestsentsvärviga

Rakkude tuvastamise mudeli väljatöötamiseks Ilastik tarkvaraga teostati eraldi katse, milles värviti kõik CHO-K1-hM4 rakud DiI (1,1'-dioktadetsüül-3,3,3',3'-

tetrametüülindokarbotsüaniin perkloraat) (AAT Bioquest) (*Lisa 4*) fluorestsentsvärviga. DiI emalahusest valmistati 2  $\mu$ M DiI lahus DPBS puhvris. Rakkudelt eemaldati sööde, pipeteeriti 200  $\mu$ l 2  $\mu$ M DiI lahust ja inkubeeriti 10 minutit temperatuuril 37 °C 5%-lises CO<sub>2</sub> atmosfääris enne mõõtmist. Ühe süvendi 196 erinevat asukohta pildistati 20x suurendusega 10 erineval fookustasandil 3  $\mu$ m fookuskauguste erinevustega heleväljakanalis ning fluorestsentskanalis ergastuslainepikkusel 531 nm ribalaiusega 40 nm ja emissioonlainepikkusel 593 nm ribalaiusega 40 nm. Mõõtmiseks kasutati mikroskoopi Cytation 5.

#### 5.9.2 CG72 seostumiskineetika uurimine CHO-K1-hM4 rakkudel

Fluorestsentsligandi CG72 seostumiskineetika uurimiseks eemaldati rakkudelt sööde ning pipeteeriti 200  $\mu$ l 2 nM CG72 lahust lisanditega DMEM/F12 söötmes duplikaatides. Kolm tundi pärast mõõtmise algust lisati skopolamiini lahus lisanditega DMEM/F12 söötmes lõppkontsentratsiooniga 5  $\mu$ M. Iga süvendi nelja erinevat asukohta pildistati minimaalse aparaadi mõõtmisvahemiku (26 s) tagant eelnevalt kirjeldatud parameetritega. Teostati kolm korduskatset eraldi päevadel.

#### 5.9.3 Konkureerimiskatsed CHO-K1-hM4 rakkudel

Konkureerimiskatsetes kasutati fluorestsentsligandi CG72 ning konkureeriva ligandina kasutati skopolamiini või karbakooli. CG72 lõppkontsentratsioon süvendis oli 2 nM ning konkureerivast ligandist tehti seerialahjendused lisanditega DMEM/F12 söötmes. Eelnevalt 6 tundi katseplaadil kinnitunud rakkudelt eemaldati sööde ning pipeteeriti 200 µl CG72 ja konkureeriva ligandi seerialahjenduse segu rakkudele duplikaatides. Iga süvendi nelja erinevat asukohta pildistati minimaalse aparaadi mõõtmisvahemiku (30 min) tagant eelnevalt kirjeldatud parameetritega.

#### 5.10 Andmeanalüüs

Andmetöötluseks kasutati programme Aparecium 2.0 (Laasfeld 2019), MATLAB R2016a (The MathWorks, Inc), IQMTools v1.2.2.2 (Schmidt and Jirstrand 2006), GraphPad Prism 5 (GraphPad Software) ja Ilastik (Berg *et al.* 2019).

#### 5.10.1 Fluorestsentsanisotroopia meetodi katsete analüüs

FA arvutati valemi (5) järgi:

$$FA = \frac{I_{II} - I_{\perp}}{I_{II} + 2I_{\perp}},\tag{5}$$

milles I<sub>II</sub> tähistab paralleelselt ning I $_{\perp}$  ergastustasandi suhtes risti polariseeritud fluorestsentsi intensiivsust (Rinken *et al.* 2018).

Bakuloviiruse preparaadi ruumala varieerimise katsete ja konkureerimiskatsete andmehaldus teostati tarkvara Aparecium 2.0 abil. Bakuloviiruse optimaalse ruumala leidmiseks arvutati signaal-müra suhe. Konkureerimiskatsetest arvutati programmi GraphPad Prism abil logistilise inhibiitor-vastus mudeli järgi uuritud konkureerivate ligandide pIC<sub>50</sub> väärtused fluorestsentsanisotroopia järgi. Korduskatsete tulemustest arvutati katsete kaalutud keskmine pIC<sub>50</sub> väärtus, võttes kaaluks vastava pIC<sub>50</sub> väärtuse standardhälbe ruudu pöördväärtuse (Jakobson 2011). Tulemuste võrdlemiseks kirjanduse andmetega arvutati pK<sub>i</sub> väärtused konkureerimiskatsetest Cheng-Prusoffi võrrandiga.

#### 5.10.2 Ligand-retseptor interaktsiooni kineetika modelleerimine

Bakuloviiruse preparaadiga mõõdetud fluorestsentsanisotroopia katsete kineetikat modelleeriti IQMTools tarkvaraga, kasutades Nelder-Mead algoritmi (Nelder and Mead 1965). Paremini sobituva matemaatilise mudeli valimiseks hinnati mudelite sobivust Akaike informatsioonikriteeriumi (Akaike 1974) abil, mille valem (5) on

$$AIC = 2 * k - 2 * \ln(L).$$
(5)

Tõenäosusfunktsioonina L kasutati Wald-Wolfowitzi seeriatesti ja märgitesti p-väärtuste korrutist ning k tähistab mudeli vabade parameetrite arvu.

Fluorestsentsligandide kiiruskonstandid rakukatsetes arvutati programmiga GraphPad Prism, kasutades ühefaasilise assotsiatsiooni- ja dissotsiatsioonimudelit. FA meetodi korral kasutati ühe- või kahefaasilist eksponentsiaalse kasvu mudelit assotsiatsioonil ja ühefaasilist eksponentsiaalse kahanemise mudelit dissotsiatsioonil.

#### 5.10.3 Ilastik tarkvaraga rakutuvastusmudelite loomine

Fluorestsentspiltidelt rakkude tuvastamiseks loodi Ilastik mudel 1. DiI-ga värvitud rakkude treenimiseks valiti DiI-ga värvitud rakkude piltidest 30 juhuslikku fluorestsentspilti fookustasandil või fookustasandilt kuni  $\pm$  3 µm kaugusel rakkude tuvastuse treenimiseks fluorestsentspiltidelt. Treenimisel klassifitseeriti pikslid käsitsi kahte klassi: rakk või taust. Seejärel rakendati saadud mudelit kõigile 196-le fluorestsentspildile ning eksporditi klassifitseeritud pikslid segmentatsioonpiltidena.

Heleväljapiltidelt pikslite klassi ennustamiseks loodi Ilastik mudel 2. Helevälja piltidest tehti lineaarse regressiooni tõusu pildid, nagu on kirjeldatud Tõnis Laasfeld-i magistritöös (Laasfeld 2019). Ilastik mudelist 1 saadud segmentatsioonpilte kasutati Ilastik mudeli 2 treenimiseks. Ilastik mudelit 2 kasutati edaspidi CHO-K1-hM4 rakkudega teostatud katsetest saadud piltide

pikslite klassifitseerimiseks. Pikslite intensiivsuste analüüsimiseks kasutati Apareciumi mooduli *MembraneTools* modifitseeritud versiooni.

Ilastik mudeli 2 pikslite ennustusõigsust hinnati  $F_1$  skoori abil, võttes pikslite ennustamise õigsuse referentsiks Ilastik mudeli 1 ennustused fluorestsentspiltide järgi.  $F_1$  skoor arvutati valemi (6) järgi:

$$F_1 skoor = \frac{2*TP}{2*TP+FP+FN},\tag{6}$$

milles TP tähistab õigesti ennustatud rakusisese ala pikslite arvu, FP valepositiivsete pikslite arvu ja FN valenegatiivsete pikslite arvu.  $F_1$  skoori väärtuste vahemik on 0 kuni 1, kusjuures suurem väärtus tähendab mudeli paremat ennustustäpsust. Selles töös oli  $F_1$  skoori väärtus 0,824.

#### 5.10.4 Mikroskoopiapiltidelt ligandi sidumisparameetrite arvutamine

Rakukatsetest saadud pilte analüüsiti Aparecium 2.0 tarkvara ja Ilastik mudeli 2 abil. Analüüsimisel kasutati vaid normaalse morfoloogiaga rakke ning kõigi piltide tausta korrigeeriti (ingl k *flat-field correction*).

CG72 assotsiatsiooni- ja dissotsiatsioonikineetika analüüsimiseks arvutatati rakusisese ala (RS) pikslite keskmine intensiivsus ning jagati läbi taustapikslite keskmise väärtusega. Saadud väärtusi analüüsiti GraphPad Prism-is. Iga pildi tulemused normaliseeriti vahemiku 0% kuni 100% assotsiatsioonikineetika ning 100% kuni 0% dissotsiatsioonikineetika puhul. Assotsiatsioonikineetika 0% võeti väärtus 1 ning 100% väärtuseks võeti keskmine ülemise platoo väärtus. Dissotsiatsioonikineetika normaliseerimiseks arvutati GraphPad Prism-is ühefaasilise eksponentsiaalse kahanemise mudeliga alumise platoo väärtus, mis võeti iga pildi 0% väärtuseks. 100% väärtuseks võeti dissotsiatsiooni mõõtepunktide maksimaalne väärtus. Tulemused esitati nelja pildi keskmisena ühe süvendi kohta. GraphPad Prism-i abil arvutati globaalse assotsiatsiooni- ja dissotsiatsioonikineetika mudeliga CG72-le näilised kiiruskonstandid  $k_f$  ja  $k_r$  ning dissotsiatsioonikonstant K<sub>d</sub>.

Konkureerimiskatsetes kasutati ülaltoodud pilditöötlusalgoritmi. Saadud intensiivsuste jagatisi analüüsiti GraphPad Prism-is logistilise inhibiitor-vastus mudeli abil. Konkureerivate ligandide afiinsused arvutati Cheng-Prusoffi valemi järgi, milles kasutatud fluorestsentsligandi kontsentratsioon oli  $C_{CG72} = 2$  nM ning fluorestsentsligandi K<sub>d</sub> väärtus 3,7 nM (määratud dr Kelleri töörühmas).

## 6 Tulemused ja arutelu

#### 6.1 M<sub>4</sub> bakuloviiruse preparaadi ruumala varieerimine

Fluorestsentsligandide CG72 ja MK342 kineetika, afiinsuse ja signaaliakna leidmiseks teostati bakuloviiruse preparaadi ruumala varieerimise katsed mõlema fluorestsensligandiga. Bakuloviiruse ruumala edaspidiste katsete jaoks valiti bakuloviiruse ruumala varieerimise katsest fluorestsentsligandi MK342-ga (*Joonis 2*), tulemusi analüüsiti kaheksa tundi peale katse algust, sest oli püstitunud tasakaal (*Lisa 6*). Lähtudes dr Kelleri töörühmas määratud MK342 dissotsiatsioonikonstandist ( $K_d = 0.95$  nM) ning fluorestsentsligandiga süvendi ja bakuloviirusega tühiproovi intensiivsuste erinevustest ( $C_{MK342} = 1$  nM puhul erinevus 5-kordne,  $C_{MK342} = 6$  nM puhul erinevus 19-kordne) otsustati kasutada konkureerimiskatsetes 5 nM MK342. Bakuloviiruse optimaalse ruumala valimisel on oluline minimeerida bakuloviiruse preparaadi kulu, kuid säilitada piisav signaaliaken. Totaalse ja mittespetsiifilise signaali vahe 20 µl bakuloviiruse preparaadiga ja 6 nM MK342-ga süvendis oli signaal-müra suhe piisavalt hea.

CG72 madalama afiinsuse tõttu ( $K_d = 3,7$  nM, määratud dr Kelleri töörühmas) kasutati bakuloviiruse preparaadi ruumala varieerimise katsetes fluorestsentsligandi kontsentratsioone 5 nM ja 20 nM (*Joonis 2*). Signaaliaken määrati 50 minutit pärast katse algust, mil oli saavutunud madalama CG72 kontsentratsiooniga maksimaalne spetsiifiline signaal (*Lisa 7*). Hilisematel ajapunktidel ei olnud signaal stabiilne ning mõõdetud 15 tunni vältel ei tekkinud eristatavat signaaliplatood. Seetõttu ei ole võimalik tasakaalulisi mudeleid kasutades katsetulemusi usaldusväärselt analüüsida (Veiksina *et al.* 2014).



Joonis 2. Fluorestsentsanisotroopia (FA) sõltuvus  $M_4$  retseptoriga bakuloviiruse ruumalast erinevatel fluorestsentsligandi MK342 (joonis A) või CG72 (joonis B) kontsentratsioonidel. Joonisel on näidatud spetsiifilise seostumise fluorestsentsanisotroopia mõõdetuna kaheksa tundi (joonis A) või 50 minutit (joonis B) pärast bakuloviiruse preparaadi lisamist. Totaalse ja mittespetsiifilise seostumise süvendites oli fluorestsentsligandi kontsentratsioon joonisel A  $C_{MK342} = 1$  nM ( $\blacksquare$ ),  $C_{MK342} = 6$  nM ( $\blacksquare$ ) ja joonisel B  $C_{CG72} = 5$  nM ( $\blacksquare$ ),  $C_{CG72} = 20$  nM ( $\blacksquare$ ). Mittespetsiifilise seostumise süvendites oli skopolamiini kontsentratsioon joonisel A vastavalt  $C_{skopolamiin} = 1$   $\mu$ M,  $C_{skopolamiin} = 6$   $\mu$ M ja joonisel B  $C_{skopolamiin} = 5$   $\mu$ M,  $C_{skopolamiin} = 20$   $\mu$ M. Joonisel A mõõdeti mittespetsiifilist seostumist duplikaatides, joonisel B mõõdeti totaalset seostumist duplikaatides. Veavälbad tähistavad duplikaatide aritmeetilise keskmise standardhälbeid.

MK342 signaaliaken on suurem kui CG72-1, võimaldades viia läbi kineetilisi mõõtmisi suurema tundlikkusega. Lisaks saab MK342 kasutades valida väiksema bakuloviiruse ruumala kui CG72-ga, mis võimaldab teostada sama bakuloviiruse preparaadiga rohkem katseid.

# 6.2 Fluorestsentsligandide MK342 ja CG72 M<sub>4</sub> retseptorile seostumise kineetika

Konkureerimiskatsetest ligandide farmakoloogiliste parameetrite ja seostumise kohta järelduste tegemiseks on oluline mõista esmalt fluorestsentsligandide seostumismehhanismi. Üheks võimaluseks on uurida ligandide seostumise kineetikat retseptorile ning varasemate teadmiste ja ligandide struktuuri põhjal pakkuda välja võimalik ligand-retseptor kompleksi tekkemehhanism. MK342 seostumiskineetika M<sub>4</sub> retseptorile järgib lihtsat eksponentsiaalse kasvu mudelit assotsiatsioonil, kuid signaal platoostub pärast kaheksat tundi (*Joonis 3*). MK342 M<sub>4</sub> retseptorile seostumise näiliseks kiiruskonstandiks  $k_f$  arvutati ühefaasilise eksponentsiaalse kasvu mudeliga 1,117 x 10<sup>-3</sup> ± 0,012 x 10<sup>-3</sup> min<sup>-1</sup> nM<sup>-1</sup> ja dissotsiatsioonireaktsiooni kiiruskonstandiks  $k_r$  arvutati 2,13 x 10<sup>-3</sup> ± 0,08 x 10<sup>-3</sup> min<sup>-1</sup>. Mittespetsiifilisest signaalist ilmneb, et fluorestsentsanisotroopia tõuseb ajas aeglaselt 12 tunni vältel, mis võib olla põhjustatud ebapiisavast skopolamiini hulgast.



Joonis 3. Fluorestsentsligandide MK342 (joonis A) ja CG72 (joonis B) seostumiskineetika M4 retseptoritele bakuloviirusel ( $\blacksquare$ ). Joonisel A on  $V_{bakuloviirus} = 20 \ \mu$ l,  $C_{MK342} = 5 \ n$ M; joonisel B on  $V_{bakuloviirus} = 40 \ \mu$ l,  $C_{CG72} = 20 \ n$ M. Dissotsiatsioon ( $\blacksquare$ ) alustati kolm tundi peale mõõtmise algust skopolamiini lisamisega. Mittespetsiifikat ( $\blacksquare$ ) mõõdeti konkureeriva ligandi skopolamiiniga. Nii dissotsiatsioonil kui ka mittespetsiifika mõõtmisel olid skopolamiini kontsentratsioonid  $C_{skopolamiin} = 83 \ \mu$ M (joonis A) või  $C_{skopolamiin} = 20 \ \mu$ M (joonis B). Seostumise mudelina kasutati ühefaasilise (joonis A) või kahefaasilise (joonis B) eksponentsiaalse kasvu mudelit. Veavälbad tähistavad duplikaatide aritmeetilise keskmise standardhälbeid.

CG72 seostumise kineetikal M<sub>4</sub> retseptorile on kaks etappi: kiire seostumine esimese 50 minuti jooksul ning seejärel aeglase seostumise faas. Kahefaasilise eksponentsiaalse mudeliga arvutati CG72 M<sub>4</sub> retseptorile seostumise kiire faasi näiliseks kiiruskonstandiks  $k_{f,1}$  5,6 x 10<sup>-3</sup> ± 0,6 x 10<sup>-3</sup> min<sup>-1</sup> nM<sup>-1</sup> ja aeglase faasi näiliseks kiiruskonstandiks  $k_{f,2}$  arvutati 2,32 x 10<sup>-4</sup> ± 0,04 x 10<sup>-4</sup> min<sup>-1</sup> nM<sup>-1</sup>. Dissotsiatsioonireaktsiooni näiliseks kiiruskonstandiks  $k_r$  arvutati 3,9 x 10<sup>-4</sup> ± 0,2 x 10<sup>-4</sup> min<sup>-1</sup>. Mudeli jääkliikmete (*Lisa 8*) järgi hinnates võib sellise meetodiga arvutatud kiiruskonstantide väärtusi usaldusväärseks pidada ning ka *Joonis 3* on näha, et mudeli ennustus järgib mõõdetud andmeid. Eelpool kirjeldatule toetudes võib väita, et CG72 seostumise mehhanism retseptorile on keerulisem kui MK342 seostumise mehhanism, näiteks võib olla retseptoril mitu CG72 sidumistaskut.

# 6.3 Fluorestsentsligandide MK342 ja CG72 M<sub>4</sub> retseptorile seostumise mehhanismide modelleerimine

Näilise kiiruskonstandi arvutused eksponentsiaalsete mudelitega ei arvesta fluorestsentsanisotroopia meetodi eripäradega nagu näiteks ligandi kontsentratsiooni vähenemist lahuses katse vältel. Seega tuleb täpsemaks analüüsiks kasutada globaalmudeleid. MK342 seostumismehhanismi kirjeldamiseks modelleeriti bakuloviiruse ruumala varieerimise katset mudeliga 1 (*Joonis 4, Lisa 9*), milles fluorestsentsligand ja retseptor konkureerivad ühele seostumissaidile. Samuti võetakse selles mudelis arvesse fluorestsentsligandi mittespetsiifilise seostumise võimalust ning ligandide ja retseptori hetkkontsentratsioonide muutusi reaktsiooni käigus.



Joonis 4. Mudeli 1 reaktsiooniskeem. Mudelis 1 on nii fluorestsentsligandil (L) kui ka konkureerival ligandil (C) üks ja sama sidumistasku retseptoril R (tekib vastavalt RL või RC). NBV mittespetsiifilisi seostumissaite ning mittespetsiifiliselt seostunud fluorestsentsligandi tähis on NBVL. Reaktsioonid (R) on pöörduvad ( $\blacksquare$ ).

**Mudeliga 1** teostatud globaalanalüüs kirjeldab bakuloviiruse ruumala varieerimise katset hästi (*Joonis 5*). **Mudel 1** kirjeldab ka RL kompleksi dissotsiatsiooni, millest võib järeldada, et MK342 ja skopolamiin konkureerivad samale seostumissaidile. MK342 M<sub>4</sub> retseptorile seostumise kiiruskonstandiks  $k_f$  arvutati 3,1 x 10<sup>-3</sup> ± 0,9 x 10<sup>-3</sup> min<sup>-1</sup> nM<sup>-1</sup>, mis on sarnane lihtsa ühefaasilise eksponentmudeliga arvutatud näilisele kiiruskonstandile. MK342 K<sub>d</sub> väärtus **mudeli 1** järgi on 1,5 ± 0,4 nM, mis on kooskõlas varasemalt määratud afiinsusega (K<sub>d</sub> = 0,95 nM). Retseptori emalahuse kontsentratsioon (5,5 ± 1,7 nM) oli väiksem kui sarnase meetodiga valmistatud teiste retseptoritega bakuloviiruse preparaatidel, näiteks dopamiini D<sub>1</sub> retseptori emalahuse kontsentratsiooniks on varsemalt saadud 293 ± 2 nM (Allikalt *et al.* 2018). Väiksem

kontsentratsioon võib tuleneda nii retseptori madalast ekspressioonitasemest kui ka fluorestsentsligandi eripärast.



Joonis 5. Mudeliga 1 modelleeritud MK342 seostumiskineetika  $M_4$  retseptorile erinevate bakuloviiruse preparaadi ruumalade juures,  $C_{MK342} = 1$  nM (joonis A) või  $C_{MK342} = 6$  nM (joonis B). 180 min pärast katse algust lisati skopolamiini. Nii dissotsiatsioonil kui ka mittespetsiifika mõõtmiel oli skopolamiini kontsentratsioon  $C_{skopolamiin} = 1 \mu M$  (joonis A) või  $C_{skopolamiin} = 6 \mu M$  (joonis B). Modelleerimisel kasutati IQMTools tarkvara ja Nelder-Mead algoritmi.

CG72 kahefaasilise assotsiatsiooni esimene faas võib tähistada CG72 seostumist retseptorile ning teine faas näidata täiendavat konformatsiooni muutust. Lisaks võib pärast dissotsiatsiooni lõppu toimuva fluorestsentsanisotroopia aeglast tõusu selgitada CG72 seostumine RC kompleksile. Skopolamiin on teadaolevalt ortosteeriline ligand (Svoboda *et al.* 2017), seega peaks CG72 seostuma allosteerilisse sidumistaskusse. See võib selgitada ka kahefaasilist seostumist: esmalt toimub CG72 seostumine allosteerilisse sidumistaskusse ning seejärel seostub CG72 ka ortosteerilise sidumistaskuga. Hüpoteesi kontrollimiseks modelleeriti CG72 assotsiatsiooni- ja dissotsiatsioonikineetika andmeid erinevate mudelitega. Kõigepealt modelleeriti 20 nM CG72 seostumiskineetika andmeid **mudeliga 1**, et võrrelda erinevate mudelite sobivust kineetiliste andmetega. **Mudeli 1** kohaselt platoostub signaal ~60 min jooksul, kuid mõõdetud katseandmed ei jõua platoole isegi kolm tundi peale mõõtmise algust (*Joonis 6*). Teine erisus katseandmete ja mudeli ennustuse vahel ilmneb peale dissotsiatsiooni, mil mudel ennustab jällegi platoostumist, kuid FA signaal tõuseb aeglaselt katse lõpuni. Seega ei õnnestu **mudeli 1** abil kirjeldada katseandmetes esinevaid kvalitatiivseid efekte.



Joonis 6. Mudeliga 1 modelleeritud CG72 seostumiskineetika  $M_4$  retseptorile erinevate bakuloviiruse preparaadi ruumalade juures,  $C_{CG72} = 20$  nM. 180 min pärast katse algust lisati skopolamiini, mille kontsentratsioon nii dissotsiatsioonil kui ka mittespetsiifika mõõtmisel oli  $C_{skopolamiin} = 20 \mu M$ . Modelleerimisel kasutati IQMTools tarkvara ja Nelder-Mead algoritmi.

CG72 struktuurianaloogidele pakutud mehhanismis She *et al.* 2020 artiklis interakteerub molekulaardünaamika simulatsioonide kohaselt fluorestsentsligand M<sub>2</sub> retseptori allosteerilise seostumissaidiga. Seega võib sarnane efekt esineda ka CG72 seondumisel M<sub>4</sub> retseptorile. Katseandmete kahefaasilise assotsiatsiooni kirjeldamiseks loodi **mudel 2**, milles võetakse arvesse fluorestsentsligandi allosteerilise seostumise võimalust (*Joonis 7, Lisa 10*). **Mudelis 2** seostub fluorestsentsligand esmalt retseptori ortosteerilisse sidumistaskusse ning tekib kompleks *RaL*, seejärel liigub ligand retseptori ortosteerilise saidi asukohast retseptoril otsustati lisada mudelisse erinevad anisotroopia parameetrid kummagi kompleksi jaoks, vastavalt *Aral* või *Arl*. Vaba ligandi fluorestsentsanisotroopia fluktuatsiooni arvesse võtmiseks lisati mudelile polünoomfunktsioon (*Lisa 11*), mis kirjeldab vaba ligandi fluorestsentsanisotroopia muutust ajas. AIC väärtuste järgi kirjeldab **mudel 2** CG72 M<sub>4</sub> retseptorile seostumise kineetikat paremini (*Joonis 7*) kui **mudel 1** (





Joonis 7. Mudeli 2 reaktsiooniskeem (joonis A) ja mudeliga 2 modelleeritud CG72 seostumiskineetika M<sub>4</sub> retseptorile erinevate bakuloviiruse ruumalade juures (joonis B). Mudelis 2 on nii fluorestsentsligandil (L) kui ka konkureerival ligandil (C) üks ja sama sidusmistasku retseptoril R (tekib vastavalt RL või RC). Võimalik on ka fluorestsentsligandi allosteeriline seostumine retseptorile (RaL) või retseptor-konkureeriv ligand kompleksile retseptori allosteerilisse sidumistaskuse (RCL). NBV tähistab mittespetsiifilisi seostumissaite ning mittespetsiifiliselt seostunud fluorestsentsligandi tähis on NBVL. Reaktsioonid (R) on pöörduvad ( $\blacksquare$ ). Joonisel B totaalsel ja mittespetsiifilisel seostumisel on C<sub>CG72</sub> = 20 nM. 180 min pärast katse algust lisati skopolamiini, mille kontsentratsioon nii dissotsiatsioonil kui ka mittespetsiifika mõõtmisel oli C<sub>skopolamiin</sub> = 20  $\mu$ M. Modelleerimisel kasutati IQMTools tarkvara ja Nelder-Mead algoritmi.

**Mudel 2** ennustab nii CG72 kiire kui ka aeglase seostumise faasi, kusjuures kiire seostumise reaktsiooniks on CG72 seostumine retseptori allosteerilsse sidumistaskusse ehk *RaL* kompleksi teke. CG72 retseptori allosteerilisse sidumistaskusse seostumise kiiruskonstant *kf1* (2,70 x  $10^{-2} \pm 0,12 \times 10^{-2} \min^{-1} nM^{-1}$ ) on suurem kui MK342 vastava reaktsiooni kiiruskonstant, mis on oodatav ka kineetikate visuaalse hindamise järgi. CG72 K<sub>d</sub> väärtuseks **mudeli 2** järgi arvutati 3,72 ± 0,14 nM, mis langeb kokku varasemalt radioligandiga määratud tulemusega (K<sub>d</sub> = 3,7 nM). *RaL* ja *RL* vormide tasakaalukonstanti (7)

$$K_{RaL-RL} = \frac{[RaL]}{[RL]} \tag{7}$$

väärtus 3,09  $\pm$  0,15 näitab, et fluorestsentsligand on valdavalt retseptori allosteerilises saidis ning *RL* kompleksi osakaal on väike. Viimase järelduse põhjal on oodatav, et CG72 pK<sub>d</sub> väärtused radioligandiga mõõdetud katsest ja modelleerimise tulemustest langevad kokku, sest radioligandi katses kasutatud [<sup>3</sup>H]NMS seostub retseptori ortosteerilisse sidumistaskusse (Thal *et al.* 2016) ning **mudeli 2** järgi takistab konkureeriva ortosteerilise ligandi seostumist nii RaL kui ka RL komplekside teke. CG72 kineetika modelleerimisel **mudeliga 2** arvutatud teiste parameetrite väärtused on *Lisa 14*. K<sub>d</sub> väärtuste kokkulangevuse seletamiseks võib püstitada hüpoteesi, et retseptori allosteerilisse sidumistaskusse seostunud CG72 blokeerib konkureerivale ligandile sissepääsu retseptori ortosteerilisse sidumistaskusse või moduleerib ortosteerilise saidi afiinsust. **Mudel 2** ei kirjelda CG72 kineetikat madala fluorestsentsligandi kontsentratsiooni juures, seega võib retseptor-ligand interaktsioon olla siiski keerulisem kui **mudelis 2** pakutud mehhanism. Seega tuleks mudelit veel täiendada enne kui CG72 saaks kasutada konkureerivate ligandide sidumisparameetrite mõõtmiseks fluorestsentsanisotroopia meetodiga. Seetõttu viidi konkureerimiskatsed läbi kasutades reporterligandina MK342-e.

# 6.4 Konkureerimiskatsed fluorestsentsligandi MK342-ga bakuloviiruse süsteemis

Fluorestsentsanisotroopia meetodi peamine rakendus on uudsete ligandide sidumisparameetrite määramine. Selleks mõõdeti väljatöötatud metoodika abil kümne erineva ligandi kontsentratsioon-vastus sõltuvused, arvutati afiinsused ning võrreldi neid kirjandusest leitavate andmetega.

Skopolamiini kontsentratsioon-vastus sõltuvusel moodustus alumine platoo, kuid fluorestsentsanisotroopia väärtus kasvas endiselt ka kõrgematel skopolamiini kontsentratsioonidel. Seega ei saa bakuloviiruse preparaadi ruumala varieerimise katsetes vaadeldud mittespetsiifiliste punktide tõusu selgitada liiga madala konkureeriva ligandi kontsentratsiooni kasutamisega. Kõikide mõõdetud klassikaliste ligandide FA väärtus tõusis aeglaselt mõõtmise lõpuni isegi konkureerivate ligandide kõrgeimate kontsentratsioonide juures (*Lisa 13*), kuid UR-MK259, UR-SK-II-75 ja UR-SK-III-59 puhul sellist efekti ei täheldatud.

Eelneva põhjal võib arvata, et lihtne ühe seostumisaidi mudel siiski ei kirjelda täielikult MK342 seostumismehhanismi  $M_4$  retseptorile ning klassikalised konkureerivad ligandid ei blokeeri ära allosteerilist sidumistaskut, kuid uued ligandid seevastu blokeerivad nii ortosteerilise kui ka allosteerilise seostumissaidi. Püsitati hüpotees, et MK342 on sarnaselt CG72-le dualsteeriline ning tal on võime seostuda retseptori allosteerilisse ja ortosteerilisse sidumistaskusse. Hüpoteesi kinnitamiseks modelleeriti vastavate katsete kineetikat nii **mudeliga 1** kui ka **mudeliga 2** ning Akaike informatsioonikriteeriumi põhjal selgus, et klassikaliste ligandide afiinsuste määramiseks on sobivam **mudel 2** (

). **Mudeli 2** ennustatud skopolamiiniga mõõdetud konkureerimiskatse seostumiskineetika on *Joonis 8*, millelt on näha, et mudel ennustab ka kõrge skopolamiini kontsentratsiooni juures aeglast fluorestsentsanisotroopia tõusu.

Modelleerimise tulemustest **mudeliga 2** ilmnes, et MK342 anisotroopia ortosteerilsse sidumistaskusse seotuna ( $Arl = 0,203 \pm 0,002$ ) erines allosteerilisse sidumistaskusse seotud MK342 anisotroopiast ( $Aral = 0,157 \pm 0,004$ ). See näitab, et ortosteerilses saidis on fluorofoori liikumisvabadus väiksem, mis on kooskõlas mudeli mehhanismiga. MK342 K<sub>d</sub> väärtuseks arvutati 0,34 ± 0,03 nM, mis on sarnane MK342 varasemalt radioligandi katses määratud afiinsusega (K<sub>d</sub> = 0,95 nM), kuid erineb oluliselt **mudeliga 1** ennustatud väärtusest (K<sub>d</sub> = 1,5 ± 0,4 nM). *RaL* ja *RL* vormide esinemise tasakaalukonstandi K<sub>RaL-RL</sub> väärtuseks arvutati 3,4 x  $10^{-2} \pm 0,4 \times 10^{-2}$  mille järgi on MK342 peamiselt retseptori ortosteerilses seostumissaidis. See põhjendab ka erinevust MK342 ja CG72 kineetilistes andmetes, isegi kui pakutud seostumismehhanism mõlemale ligandile on sama. Retseptori emalahuse kontsentratsiooni *n* optimaalseim väärtus oli 21,3 nM ± 1,1 nM, mis erineb varasemalt **mudeliga 1** arvutatud kontsentratsioonist.



Joonis 8. Fluorestsentsligandiga MK342 ( $C_{MK342} = 5 \text{ nM}$ ) teostatud konkureerimiskatsete modelleerimine. Mudeliga 1 (A) ja mudeliga 2 (B) modelleeritud skopolamiini konkureerimiskatsed. Modelleerimisel kasutati IQMTools tarkvara ja Nelder-Mead algoritmi.



Joonis 9. Fluorestsentsligandiga MK342 ( $C_{MK342} = 5 \text{ nM}$ ) teostatud konkureerimiskatsete modelleerimine. Mudeliga 1 (A) ja mudeliga 2 (B) modelleeritud UR-MK259 konkureerimiskatsed. Modelleerimisel kasutati IQMTools tarkvara ja Nelder-Mead algoritmi.

Kolme uue ligandi konkureerimiskatsete modelleerimisel oli AIC väärtus madalam mudelile 1. Sellest võib järeldada, et uued sünteesitud ligandid hõivavad M<sub>4</sub> retseptoril nii allosteerilise kui ka ortosteerilise seostumissaidi. Viimast hüpoteesi toetab ka kolme uue ligandi struktuurianaloogia fluorestsentsligandi MK342-ga (*Lisa 1* ja *Lisa 2*).

Uute ligandide ja antagonistide kontsentratsioon-vastus sõltuvuste alumise platoo väärtus on üldiselt madalam kui agonistidel, erandiks on pirensepiin (*Joonis 10*). Agonistide alumise platoo erinevust võib vastavalt **mudel 2** ennustusele seletada sellega, et sõltuvalt konkureerivast ligandist varieerub MK342 seostumise afiinsus RC kompleksile, kusjuures agonistide korral on see väärtus suurem kui antagonistide korral. Seda võib põhjustada allosteerilise sidumistasku konformatsiooni muutus agonisti sidumisel ortosteerilisse sidumistaskusse. Selle hüpoteesi kinnitamiseks oleks vaja süsteemi simuleerida molekulaardünaamika või molekulaarsildamise abil.



Joonis 10. Uuritud ligandide kontsentratsioon-vastus sõltuvused mõõdetuna üheksa tundi peale katse algust. Fluorestsentsligandina kasutati MK342 (C = 5 nM). Mõõdeti agoniste atsetüülkoliin  $\blacksquare$ , karbakool  $\blacksquare$ , arekoliin  $\blacksquare$ , pilokarpiin  $\blacksquare$ ; antagoniste skopolamiin  $\blacksquare$ , atropiin  $\blacksquare$ , pirensepiin  $\blacksquare$ ) ja uusi sünteesitud ligande UR-MK259  $\blacksquare$ , UR-SK-II-75  $\blacksquare$ , UR-SK-III-59  $\blacksquare$ . Veavälbad tähistavad duplikaatide aritmeetilise keskmise standardhälbeid. Joonisel on toodud kõigi ligandide kolme korduskatse esinduslikud graafikud.

Mudeliga ennustatud afiinsuste ja Cheng-Prusoffi võrrandiga arvutatud pK<sub>i</sub> väärtuste lineaarse regressiooni tõus on  $0.91 \pm 0.05$ , millest järeldub, et Cheng-Prusoffi võrrandiga arvutatud tulemused erinevad kineetilise mudeliga arvutatud väärtustest (Joonis 11, Lisa 15). Kineetilise mudeli kasutamine konkureerivate ligandide Ki väärtuste arvutamisel on eelistatud, sest Cheng-Prusoffi võrrandi kasutamisel ei ole alati kõik eeldused täidetud. Teisalt näitab korrelatsioon, et Cheng-Prusoffi võrrandiga saab arvutada ligandidele ligikaudsed afiinsuste hinnangud ligandide täpset seostumismehhanismi teadmata korrigeerides võrrandist 2 saadud tulemusi joonisel 11 näidatud regressiooniga. Seda meetodit on lihtsuse tõttu sobilik kasutada ligandide suuremahulistel sõeluuringutel. Edaspidisteks uuringuteks välja valitud konkureerivate ligandide afiinsuste täpseks arvutamiseks on oluline arvesse võtta ligandide seostumise mehhanismi ja kineetikat. Mudeliga arvutatud ja kirjanduse andmete lineaarse regressiooni tõus on  $0.96 \pm 0.10$ . See kinnitab, et FA meetodiga saab sarnaseid tulemusi võrreldes radioligandi sidumise meetodiga. FA meetodi eeliseks on hea ajaresolutsiooniga ligandide seostumise kineetiliste andmete kogumise võimalus, mille abil saab teha järeldusi ka konkureerivate ligandide seostumismehhanismi kohta.



Joonis 11. Kineetilise mudeliga arvutatud ligandide pKi sõltuvus vastavast Cheng-Prusoff-i võrrandiga arvutatud pKi väärtusest (joonis A). Kineetilise mudeliga arvutatud pKi sõltuvus vastavast <sup>3</sup>[H]NMS-iga määratud kirjanduses avaldatud pKi väärtusest (joonis B). Veavälbad tähistavad kordusmõõtmiste aritmeetilise keskmise standardhälbeid.

#### 6.5 CG72 seostumiskineetika CHO-K1-hM4 rakkudele

Vaatamata bakuloviirusesüsteemi kasutusmugavusele erineb keskkond füsioloogilistest tingimustest. Bakuloviiruse süsteemist puudub näiteks kolesterool ning G-valgud (Massotte 2003). Bakuloviirusesüsteemi esinduslikkuse hindamiseks M<sub>4</sub> retseptorite uurimisel mõõdeti kõigepealt CG72 seostumiskineetikat CHO-K1-hM<sub>4</sub> rakkudele.

Ühefaasiline assotsiatsiooni- ja dissotsiatsioonikineetika mudel kirjeldab rakusüsteemis mõõdetud intensiivsusi hästi (*Joonis 12*,

*Lisa 16*). CG72 seostumiskineetikas on eristatav vaid üks kiire faas, bakuloviirusesüsteemis esinenud aeglase tõusu faasi rakukatsetes ei esinenud. Üheks põhjuseks võib olla rakukatsetes kasutatud madal CG72 kontsentratsioon, kuid tuleb arvesse võtta ka kasutatud meetodite erinvust. Eelnevalt mõõdeti fluorestsentsanisotroopiat, mis võimaldas eristada CG72 seotust retseptori erinevatesse sidumistaskutesse, kuid mikroskoopiakatsetes mõõdeti fluorestsentsi intensiivsust ning erinevatesse sidumistaskutesse seotud fluorestsentsligand on mikroskoopia meetodiga eristamatu. CG72 näiline kiiruskonstant  $k_f$  ühefaasilise eksponentmudeli järgi on 3,6 x 10<sup>-3</sup> ± 1,7 x 10<sup>-3</sup>, min<sup>-1</sup> nM<sup>-1</sup>, mis on kooskõlas kahefaasilise eksponentmudeli järgi arvutatud kiire faasi kiiruskonstandiga ( $k_{f,1} = 5.6 \times 10^{-3} \pm 0.6 \times 10^{-3} \min^{-1} nM^{-1}$ ). Näilise kiiruskonstandi  $k_r$  väärtus on 3,8 x 10<sup>-2</sup> ± 0,7 x 10<sup>-2</sup> min<sup>-1</sup>. GC72 rakukatsetest arvutatud K<sub>d</sub> väärtus (8 ± 4 nM) on sarnane <sup>3</sup>[H]NMS-iga varasemalt määratud väärtusega (K<sub>d</sub> = 3,7 nM) ning bakuloviirusesüsteemiga FA meetodiga määratud afiinsusega.



Joonis 12. Fluorestsentsligandi CG72 seostumiskineetika CHO-K1-hM<sub>4</sub> rakkudele. Y-teljel on mõõdetud intensiivsuste suhe skaleerituna %-deks, arvutuskäik on kirjeldatud peatükis 5.10.4. Fluorestsentsligandina kasutati CG72 ( $C_{CG72}=2$  nM) ning dissotseeriva ligandina kasutati skopolamiini ( $C_{skopalamiin}=5 \mu M$ ). Dissotsiatsiooni alustati 180 minutit pärast CG72 lisamist. Roheline • ja sinine • tähistavad kahte eri süvendit. Veavälbad tähistavad ühe süvendi nelja pildi rakusisese ala pikslite aritmeetilise keskmise standardhälbeid. Pidev joon on globaalse assotsiatsiooni- ja dissotsiatioonikineetika mudeli ennustus. Joonisel on toodud kolme korduskatse esinduslik graafik.

Fluorestsentsligandi seostumine CHO rakkudele ei muuda rakkude morfoloogiat ning rakud näevad sarnased välja kogu mõõtmise vältel, pilte rakkudest mõõtmise eri ajahetkedel võib näha *Joonis 13*.



Joonis 13. CHO-K1-hM4 rakud fluorestsentsligandi CG72 seostumiskineetika mõõtmise erinevatel ajahetkedel, teostati kolm katset eri päevadel. Katse algusaeg (t = 0 min) tähistab CG72 lisamise hetke rakkudele. Helevälja pildid on tähisega "a", fluorestsentskanali vastavad pildid on tähisega "b". Piltidel 1a ja 1b on rakud mõõtmise alguses (t = 2 min), piltidel 2a ja 2b on CG72 täielik seostumine rakkudele (t = 103 min), piltidel 3a ja 3b on rakud peale CG72 dissotsiatsiooni (t = 291 min). Fluorestsentsligandina kasutati CG72 ( $C_{CG72}=2$  nM) ning dissotseeriva ligandina kasutati skopolamiini ( $C_{skopalamiin}=5 \mu$ M).

#### 6.6 Konkureerimiskatsed CHO-K1-hM4 rakkudel

Bakuloviirusesüsteemist FA meetodiga saadud tulemuste võrdlemiseks elussüsteemiga teostati lisaks kineetika mõõtmistele konkureerimiskatsed karbakooli ning skopolamiiniga (*Joonis 14*, *Lisa 17*). Saadud kontsentratsioon-vastus sõltuvuste kvaliteet on kõrge, mis võimaldab mikroskoopiameetodi võrdlemist fluorestsentsanisotroopia meetodiga. Tasakaalu püstitumise kontrollimiseks arvutati pK<sub>i</sub> väärtused ühele konkureerimiskatsele skopolamiiniga 2 tundi (pK<sub>i</sub> = 9,06 ± 0,11) ja 5,5 tundi (pK<sub>i</sub> = 9,16 ± 0,12) ning karbakooliga 2 tundi (pK<sub>i</sub> = 5,11 ± 0,15) 4,5 tundi (pK<sub>i</sub> = 5,12 ± 0,14) pärast mõõtmise algust. Erinevatel ajahetkedel mõõdetud pK<sub>i</sub> väärtused kattusid omavahel, seega otsustati tulemusi analüüsida kaks tundi pärast katse algust. Kolmest korduskatsest arvutati skopolamiini kaalutud keskmiseks pK<sub>i</sub> väärtuseks 9,17  $\pm$  0,11 ning karbakooli kaalutud keskmiseks pK<sub>i</sub> väärtuseks 5,0  $\pm$  0,3.



Joonis 14. Konkureerimiskatse kontsentratsioon-vastus kõver 2 h peale katse algust. Konkureeriva ligandina kasutati skopolamiini  $\bullet$  või karbakooli  $\bullet$  ning fluorestsentsligandina CG72 ( $C_{CG72} = 2 nM$ ). Y-teljel on mõõdetud intensiivsuste vahe, arvutuskäik on kirjeldatud peatükis 5.10.4. Veavälbad tähistavad kaheksa pildi aritmeetilise keskmise standardhälbeid.  $R^2$  arvutamisel kasutati kaheksa pildi aritmeetiliste keskmiste jääkliikmete ruutude summat.

Nii skopolamiini kui ka karbakooli afiinsused CHO-K1-hM<sub>4</sub> rakkudel mõõdetuna on kõrgemad kui bakuloviiruse süsteemis mõõdetud afiinsused. Karbakooli afiinsuste erinevus kahe süsteemi vahel võib tuleneda G-valkude olemasolust CHO rakkudes. Kirjanduses esitatud pK<sub>i</sub> väärtused karbakoolile (pK<sub>i</sub> = 4,29  $\pm$  0,09) ja skopolamiinile (pK<sub>i</sub> = 9,47  $\pm$  0,06) ei erine oluliselt mõõdetud väärtustest. Seega võib järeldada, et mikroskoopia metoodika on sobiv konkureerivate ligandide afiinsuse mõõtmiseks. Skopolamiini ja karbakooli konkureerimiskõverate ülemiste platoode väärtused on erinevad, kuid see tuleneb tõenäoliselt rakkude bioloogilisest varieeruvusest. Seega annavad kontsentratsioon-vastus sõltuvused infot ainult afiinsuse kohta.

Nii fluorestsentsligandi kineetika mõõtmisel kui ka konkureerimiskatsetes kasutati ligandide lahjendusi söötmes, mistõttu oli rakule seotud fluorestsentsligandi ja tausta pikslite intensiivsuste erinevused palju väiksemad kui varasemalt DPBS puhvriga mõõdetud süsteemis (Laasfeld 2019). Söötme kasutamise tõttu mõõtmistel võib olla kindel, et rakkude käitumine on loomulikum kui puhvriga mõõdetud süsteemis.

Väljatöötatud metoodikatega mõõdetud ligandide afiinsused on kooskõlas varasemalt kirjanduses publitseeritud andmetega, seega sobivad mõlemad metoodikad ligandide sidumisparameetrite määramiseks. Töös pakuti välja seostumismehhanism kahele fluorestsentsligandile MK342 ja CG72, mida peaks kindlasti arvesse võtma konkureerivate

ligandide afiinsuste määramisel. Loodud eksperimentaalsed ning analüüsimetoodikad võimaldavad edaspidi süvitsi uurida ligandide seostumismehhanisme M4 retseptorile.

# 7 Kokkuvõte

Muskariinsete retseptorite erinevate alatüüpide suhtes on selektiivsete ortosteeriliste ligandide leidmine osutunud keeruliseks, seetõttu arendatakse üha enam allosteerilisi ligande. Selleks, et muskariinsete retseptorite allosteerilisi sidumistaskuid uurida, on välja töötatud erinevaid dualsteerilisi ligande. Selles töös keskenduti muskariinsete retseptorite M4 alatüübile.

Töös loodi kaks metoodikat ligandide seostumise iseloomustamiseks M<sub>4</sub> retseptorile: fluorestsentsanisotroopia metoodika ning epifluorestsentsmikroskoopia metoodika. Fluorestsentsanisotroopia meetodiga mõõdeti kõrge ajalise lahutusega fluorestsentsligandide seostumise kineetikat M<sub>4</sub> retseptorile bakuloviiruse pinnal ja arvutati kahe uudse fluorestsentsligandi CG72 ja MK342 sidumisparameetreid M<sub>4</sub> retseptorile. Mõlemale fluorestsentsligandile pakuti dualsteeriline seostumise mehhanism, mille alusel loodi mudel ligandide seostumisparameetrite täpsemaks arvutamiseks. Konkureerimiskatsetes mõõdeti kümmet märgistamata ligandi ning loodud mudeliga arvutati afiinsused.

Epifluorestsentsmikroskoobiga mõõdeti ühe fluorestsentsligandi seostumise kineetikat M<sub>4</sub> retseptorile elusrakkudel. Väljatöötatud metoodika eelis on suurem sarnasus füsioloogilistele tingimustele, võrreldes bakuloviiruse süsteemiga. Mikroskoopiapiltide analüüsimiseks loodi ning valideeriti pildianalüüsi algoritm. Seda metoodikat rakendati fluorestsentsligandi CG72 kineetiliste parameetrite määramiseks ning kahe konkureeriva ligandi afiinsuse mõõtmiseks.

Mõlema metoodikaga arvutatud ligandide afiinsused olid kooskõlas kirjanduse andmetega. Väljatöötatud metoodikad ja mudelid aitavad tulevikus paremini mõista ligandide seostumise mehhanisme M<sub>4</sub> retseptori erinevatesse sidumistaskutesse.

# 8 Summary

Muscarinic receptor subtypes share a similar orthosteric binding site, which complicates the development of subtype-selective ligands. As an alternative, allosteric ligands are currently under investigation as potential drug candidates. Dualsteric ligands have been developed in order to investigate the allosteric binding site. The current thesis focused on muscarinic  $M_4$  receptor.

Two assays were developed in order to characterize the binding properties of muscarinic ligands: fluorescence anisotropy assay and epifluorescence microscopy assay. The kinetics of two newly synthesized fluorescent ligands was measured using fluorescence anisotropy method with budded baculovirus particles. A model with dualsteric binding mechanism was proposed for both ligands and used to calculate ligand binding properties. Ten unlabeled ligands were measured and the binding parameters were calculated in order to validate the developed assay.

The binding kinetics of one fluorescent ligand and affinities of two competitive ligands were determined using mammalian cell culture and epifluorescence microscopy. Compared with budded baculovirus system, this assay is more representative of physiological conditions. Additionally, image analysis algorithm was created and validated to analyse microscopy data.

The affinities of the ligands measured in both assays were consistent with previously published data. The developed assays and models are a step forward in understanding the binding mechanisms of ligands to different binding sites of the muscarinic  $M_4$  receptor.

## 9 Kasutatud kirjandus

- Akaike H. (1974) A New Look at the Statistical Model Identification, in *Sel. Pap. Hirotugu Akaike*, (Parzen E., Tanabe K., Kitagawa G., eds), pp. 215–222. Springer New York, New York, NY.
- Allikalt A., Kopanchuk S., Rinken A. (2018) Implementation of fluorescence anisotropy-based assay for the characterization of ligand binding to dopamine D1 receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **839**, 40–46.
- Berg S., Kutra D., Kroeger T., Straehle C. N., Kausler B. X., Haubold C., Schiegg M., et al. (2019) ilastik: interactive machine learning for (bio)image analysis. *Nat. Methods* 16, 1226–1232.
- Chan W. Y., McKinzie D. L., Bose S., Mitchell S. N., Witkin J. M., Thompson R. C., Christopoulos A., et al. (2008) Allosteric modulation of the muscarinic M4 receptor as an approach to treating schizophrenia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 10978–10983.
- Cheng Y.-C., Prusoff W. H. (1973) Relationship between the inhibition constant (KI) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I50) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* **22**, 3099–3108.
- Copeland R. A. (2016) The drug-target residence time model: a 10-year retrospective. *Nat. Rev. Drug Discov.* **15**, 87–95.
- Croy C. H., Chan W. Y., Castetter A. M., Watt M. L., Quets A. T., Felder C. C. (2016) Characterization of PCS1055, a novel muscarinic M4 receptor antagonist. *Eur. J. Pharmacol.* **782**, 70–76.
- Dencker D., Thomsen M., Wörtwein G., Weikop P., Cui Y., Jeon J., Wess J., Fink-Jensen A. (2012) Muscarinic Acetylcholine Receptor Subtypes as Potential Drug Targets for the Treatment of Schizophrenia, Drug Abuse, and Parkinson's Disease. ACS Chem. Neurosci. 3, 80–89.
- Felder C. C., Goldsmith P. J., Jackson K., Sanger H. E., Evans D. A., Mogg A. J., Broad L. M. (2018) Current status of muscarinic M1 and M4 receptors as drug targets for neurodegenerative diseases. *Neuropharmacology* 136, 449–458.
- Foreman J. C., Johansen T., Gibb A. J., eds (2011) *Textbook of receptor pharmacology*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Haga T. (2013) Molecular properties of muscarinic acetylcholine receptors. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B* **89**, 226–256.
- Huang F., Buchwald P., Browne C. E., Farag H. H., Wu W.-M., Ji F., Hochhaus G., Bodor N. (2001) Receptor binding studies of soft anticholinergic agents. *AAPS PharmSci* 3, 44– 56.
- Hucka M., Finney A., Sauro H. M., Bolouri H., Doyle J. C., Kitano H., and the rest of the SBML Forum:, et al. (2003) The systems biology markup language (SBML): a medium for representation and exchange of biochemical network models. *Bioinformatics* 19, 524–531.
- Huynh T., Valant C., Crosby I. T., Sexton P. M., Christopoulos A., Capuano B. (2015) Synthesis and Pharmacological Evaluation of M 4 Muscarinic Receptor Positive Allosteric Modulators Derived from VU10004. ACS Chem. Neurosci. 6, 838–844.

Jakobson E. (2011) Mõõtmised ja mõõtemääramatused (LOFY.01.004). Tartu Ülikool.

Jakubík J., Bačáková L., El-Fakahany E. E., Tuček S. (1997) Positive Cooperativity of Acetylcholine and Other Agonists with Allosteric Ligands on Muscarinic Acetylcholine Receptors. *Mol. Pharmacol.* **52**, 172–179.

- Jakubík J., Randáková A., Zimčík P., El-Fakahany E. E., Doležal V. (2017) Binding of Nmethylscopolamine to the extracellular domain of muscarinic acetylcholine receptors. *Sci. Rep.* 7, 40381.
- Janakiraman V., Forrest W. F., Chow B., Seshagiri S. (2006) A rapid method for estimation of baculovirus titer based on viable cell size. *J. Virol. Methods* **132**, 48–58.
- Kamal M., Jockers R. (2009) Bitopic ligands: all-in-one orthosteric and allosteric. *F1000 Biol. Rep.*
- Kenakin T. (2016) The mass action equation in pharmacology: Mass action applied to pharmacology. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **81**, 41–51.
- Laasfeld T. (2019) Aparecium tarkvara arendamine ja kasutamine retseptorsüsteemide biokeemilistes uuringutes. Tartu Ülikool. Magistritöö.
- Laasfeld T., Kopanchuk S., Rinken A. (2017) Image-based cell-size estimation for baculovirus quantification. *BioTechniques* **63**.
- Massotte D. (2003) G protein-coupled receptor overexpression with the baculovirus-insect cell system: a tool for structural and functional studies. *Biochim. Biophys. Acta BBA Biomembr.* **1610**, 77–89.
- Matlock B. (2015) Assessment of Nucleic Acid Purity. Thermo Scientific.
- Nelder J. A., Mead R. (1965) A Simplex Method for Function Minimization. *Comput. J.* 7, 308–313.
- Pegoli A., She X., Wifling D., Hübner H., Bernhardt G., Gmeiner P., Keller M. (2017) Radiolabeled Dibenzodiazepinone-Type Antagonists Give Evidence of Dualsteric Binding at the M<sub>2</sub> Muscarinic Acetylcholine Receptor. J. Med. Chem. 60, 3314–3334.
  Promote EuCENE 6 Transfaction Response to the page of the second sec
- Promega FuGENE 6 Transfection Reagent technical manual.
- Raue A., Steiert B., Schelker M., Kreutz C., Maiwald T., Hass H., Vanlier J., et al. (2015) Data2Dynamics: a modeling environment tailored to parameter estimation in dynamical systems: Fig. 1. *Bioinformatics* **31**, 3558–3560.
- Rinken A., Lavogina D., Kopanchuk S. (2018) Assays with Detection of Fluorescence Anisotropy: Challenges and Possibilities for Characterizing Ligand Binding to GPCRs. *Trends Pharmacol. Sci.* **39**, 187–199.
- Rosenbaum D. M., Rasmussen S. G. F., Kobilka B. K. (2009) The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* **459**, 356–363.
- Schmidt H., Jirstrand M. (2006) Systems Biology Toolbox for MATLAB: a computational platform for research in systems biology. *Bioinformatics* 22, 514–515.
- Schwarz G. (1978) Estimating the Dimension of a Model. Ann. Stat. 6, 461–464.
- She X., Pegoli A., Gruber C. G., Wifling D., Carpenter J., Hübner H., Chen M., et al. (2020) Red-Emitting Dibenzodiazepinone Derivatives as Fluorescent Dualsteric Probes for the Muscarinic Acetylcholine M 2 Receptor. J. Med. Chem. 63, 4133–4154.
- She X., Pegoli A., Mayr J., Hübner H., Bernhardt G., Gmeiner P., Keller M. (2017) Heterodimerization of Dibenzodiazepinone-Type Muscarinic Acetylcholine Receptor Ligands Leads to Increased M <sub>2</sub> R Affinity and Selectivity. *ACS Omega* **2**, 6741–6754.
- 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.
- Svoboda J., Popelikova A., Stuchlik A. (2017) Drugs Interfering with Muscarinic Acetylcholine Receptors and Their Effects on Place Navigation. *Front. Psychiatry* **8**, 215.
- Thal D. M., Sun B., Feng D., Nawaratne V., Leach K., Felder C. C., Bures M. G., et al. (2016) Crystal structures of the M1 and M4 muscarinic acetylcholine receptors. *Nature* 531, 335–340.
- Thermo Fischer Scientific (2018) *Bac-to-Bac<sup>TM</sup> Baculovirus Expression System*. Life Technologies Corporation.

- Veiksina S., Kopanchuk S., Rinken A. (2014) Budded baculoviruses as a tool for a homogeneous fluorescence anisotropy-based assay of ligand binding to G proteincoupled receptors: The case of melanocortin 4 receptors. *Biochim. Biophys. Acta BBA* - *Biomembr.* 1838, 372–381.
- Walker L. C., Berizzi A. E., Chen N. A., Rueda P., Perreau V. M., Huckstep K., Srisontiyakul J., et al. (2020) Acetylcholine Muscarinic M4 Receptors as a Therapeutic Target for Alcohol Use Disorder: Converging Evidence From Humans and Rodents. *Biol. Psychiatry*, S0006322320301311.
- Wang Q., Bosch B.-J., Vlak J. M., Oers M. M. van, Rottier P. J., Lent J. W. M. van (2016) Budded baculovirus particle structure revisited. *J. Invertebr. Pathol.* **134**, 15–22.
- Webb D. J., Brown C. M. (2012) Epi-Fluorescence Microscopy, in *Cell Imaging Tech.*, (Taatjes D. J., Roth J., eds), Vol. 931, pp. 29–59. Humana Press, Totowa, NJ.
- Weber G. (1952) Polarization of the fluorescence of macromolecules. 1. Theory and experimental method. *Biochem. J.* **51**, 145–155.

# 10 Infoleht

# Fluorestsentsmetoodikate arendamine ligandi seostumismehhanismi uurimiseks muskariinsele M4 retseptorile

Antud töös töötati välja kaks metoodikat M<sub>4</sub> retseptori uurimiseks: fluorestsentsanisotroopia meetod pungunud bakuloviiruse osakestega ja epifluorestsentsmikroskoopia meetod imetajarakkudega. Selle käigus kasutati kahte fluorestsentsligandi, millele määrati kineetilised parameetrid. Fluorestsentsanisotroopia meetodiga määrati kümne ja epifluorestentsmikroskoopiaga kahe märgistamata ligandi sidumisparameetrid.

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

# The development of fluorescent assays to explore the binding mechanism of ligands to muscarinic M<sub>4</sub> receptor

Two assays were developed in order to investigate muscarinic  $M_4$  receptor: fluorescence anisotropy method coupled with budded baculovirus particles and epifluorescence microscopy method using mammalian cell culture. The kinetic parameters for two fluorescent ligands were determined using the assays. Additionally, the affinities of ten or two unlabeled ligands were measured using fluorescence anisotropy method or epifluorescence method, respectively.

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

# 11 Lisad

Lisa 1. Regensburgi Ülikoolis sünteesitud uudsete bitoopsete ligandide struktuurid40
Lisa 2. Töös kasutatud fluorestsentsligandide MK342 ja CG72 struktuurid40
Lisa 3. Töös kasutatud klassikaliste ligandide struktuurid41
Lisa 4. Membraanvärvi DiI struktuur41
Lisa 5. ICSE meetodil mõõdetud M4 P2 põlvkonna I partii bakuloviiruse preparaadi tiitrimise
kontsentratsioon-vastus sõltuvus
Lisa 6. Fluorestsentsanisotroopia sõltuvus ajast, kasutades fluorestsentsligandi MK34242
Lisa 7. Fluorestsentsanisotroopia sõltuvus ajast, kasutades fluorestsentsligandi CG7242
Lisa 8. MK342 seostumiskineetika ühefaasilise eksponentsiaalse mudeli jääkliikmed ja CG72
seostumiskineetika kahefaasilise eksponentsiaalse mudeli jääkliikmed joonisel 3 esitatud
mudelitele
Lisa 9. Mudeli 1 detailne kirjeldus
Lisa 10. Mudeli 2 detailne kirjeldus
Lisa 11. Fluorestsentsligandi CG72 kineetika kirjeldamiseks kasutatud mudeli 2 erisused46
Lisa 12. Kahe mudeli võrdlus Akaike informatsioonikriteeriumi (AIC) järgi46
Lisa 13. MK342 kineetika erinevate konkureerivate ligandide kõrgeimate mõõdetud
kontsentratsioonide juures47
Lisa 14. Mudelite 1 ja 2 ennustatud parameetrite väärtused
Lisa 15. Konkureerivate ligandide kaalutud keskmised pIC50 väärtused, Cheng-Prusoff-i
valemiga (CP) arvutatud p $K_i$ väärtused ja kineetilise mudeliga arvutatud p $K_i$ väärtused48
Lisa 16. Fluorestsentsligandi CG72 seostumiskineetika CHO-K1-hM4 rakkudele48
Lisa 17. CHO-K1-hM4 rakkudel tehtud konkureerimiskatse pildid 2 h peale katse algust49



**UR-MK259** 

UR-SK-II-75



UR-SK-III-59

Lisa 1. Regensburgi Ülikoolis sünteesitud uudsete bitoopsete ligandide struktuurid.



MK342

CG72







Pirensepiin

Lisa 3. Töös kasutatud klassikaliste ligandide struktuurid.



Lisa 4. Membraanvärvi Dil struktuur.



Lisa 5. ICSE meetodil mõõdetud M<sub>4</sub> P2 põlvkonna I partii bakuloviiruse preparaadi tiitrimise kontsentratsioon-vastus sõltuvus. Veavälbad tähistavad duplikaatide aritmeetilise keskmise standardhälbeid. P2 põlvkonna II partii ja P3 põlvkonna I partii tiitrimiskõver oli sarnane P2 põlvkonna I partii tiitrimiskõverale.



Lisa 6. Fluorestsentsanisotroopia sõltuvus ajast, kasutades fluorestsentsligandi MK342. Joonisel on toodud andmed bakuloviiruse preparaadi ruumalaga  $V_{bakuloviirus} = 20 \ \mu$ l. Totaalsel seostumisel (•) oli  $C_{MK342} = 1 \ nM$  või  $C_{MK342} = 6 \ nM$  (•), dissotsiatsioon alustati 3 h peale mõõtmise algust skopolamiiniga,  $C_{skopolamiin} = 1 \ \mu M$  (•) või  $C_{skopolamiin} = 5 \ \mu M$  (•). Mittespetsiifilisel seostumisel oli  $C_{MK342} = 1 \ nM$ ,  $C_{skopolamiin} = 1 \ \mu M$  (•) või  $C_{MK342} = 6 \ nM$ ,  $C_{skopolamiin} = 6 \ \mu M$  (•).



Lisa 7. Fluorestsentsanisotroopia sõltuvus ajast, kasutades fluorestsentsligandi CG72. Joonisel on toodud andmed bakuloviiruse preparaadi ruumalaga  $V_{bakuloviirus} = 40 \ \mu$ l. Totaalsel seostumisel (•) oli  $C_{CG72} = 5 \ nM$  või  $C_{CG72} = 20 \ nM$  (•), dissotsiatsioon alustati 3 h peale mõõtmise algust skopolamiiniga,  $C_{skopolamiin} = 5 \ \mu M$  (•) või  $C_{skopolamiin} = 20 \ \mu M$  (•). Mittespetsiifilisel seostumisel oli  $C_{CG72} = 5 \ nM$ ,  $C_{skopolamiin} = 5 \ \mu M$  (•) või  $C_{CG72} = 20 \ nM$ ,  $C_{skopolamiin} = 20 \ \mu M$  (•).



Lisa 8. MK342 seostumiskineetika ühefaasilise eksponentsiaalse mudeli jääkliikmed (joonis A) ja CG72 seostumiskineetika kahefaasilise eksponentsiaalse mudeli jääkliikmed (joonis B) joonisel 3 esitatud mudelitele.

Lisa 9. Mudeli 1 detailne kirjeldus. Tähised on järgnevad: L - fluorestsentsligand, C - konkureeriv ligand, R - retseptor, RC - retseptor-konkureeriv ligand kompleks, RL - retseptor-fluorestsentsligand kompleks, NBV - mittespetsiifiline seostumissait, NBVL - mittespetsiifiliselt seostunud ligand, V - lisatud bakuloviiruse ruumala.

\*\*\*\*\*\*\*\* MODEL NAME

#### Mudel 1

\*\*\*\*\*\*\*\*\* MODEL NOTES

Lihtne ühe seostumissaidi mudel, milles märgistatud ja märgistamata ligand konkureerivad ühele seostumissaidile.

\*\*\*\*\*\*\*\* MODEL STATES

d/dt(C) = -R2 %konkureeriv ligand, nM

d/dt(L) = -R1-R3 % fluorest sentsligand, nM

d/dt(R) = -R1-R2+R4\*n % retseptor, nM

d/dt(RC) = +R2 % retseptor-konkureeriv ligand kompleks

d/dt(RL) = +R1 % retseptor-fluorestsentsligand kompleks

d/dt(NBV) = -R3+R4\*NBVcommon %mittespetsiifilise seostumise saidid

d/dt(NBVL) = +R3 % mittespetsiifiliselt seostunud fluorestsentsligand

d/dt(V) = -R4 %bakuloviiruse ruumala, µl

kf3 = 0.0083509

kr3 = 252.798

Afree = 0.0377974 %vaba ligandi anisotroopia

Arl = 0.353815 % retseptoriga seotud ligandi anisotroopia

Anbv = 0.0722786 % mittespetsiifiliselt seotud ligandi anisotroopia

n = 0.149056 % faktor, mis teisendab lisatud bakuloviiruse ruumala retseptori kontsentratsiooniks

NBVcommon = 1851.65 % faktor, mis teisendab lisatud bakuloviiruse ruumala mittespetsiifiliste seostumissaitide kontsentratsiooniks

\*\*\*\*\*\*\*\*\* MODEL VARIABLES

R2 = kf2\*C\*R-(kr2\*RC) {reversible}

R3 = kf3\*L\*NBV-(kr3\*NBVL) {reversible}

R4 = 1000 \* V

\*\*\*\*\*\*\*\*\* MODEL FUNCTIONS

\*\*\*\*\*\*\*\* MODEL MATLAB FUNCTIONS

Lisa 10. Mudeli 2 detailne kirjeldus. Tähised on järgnevad: L - fluorestsentsligand, C - konkureeriv ligand, R - retseptor, RC - retseptor-konkureeriv ligand kompleks, RL - retseptor-fluorestsentsligand kompleks, NBV - mittespetsiifiline seostumissait, NBVL - mittespetsiifiliselt seostunud ligand, V - lisatud bakuloviiruse ruumala.

\*\*\*\*\*\*\*\* MODEL NAME

Mudel 2

Mudel, mis võtab arvesse fluorestsentsligandi ortosteerilise ja allosteerilise seostumise võimalust.

\*\*\*\*\*\*\*\* MODEL STATES

d/dt(C) = -R2 %konkureeriv ligand, nM

d/dt(L) = -R1-R3-R4 % fluorest sentsligand, nM

d/dt(R) = -R1-R2+R8\*n % retseptor, nM

d/dt(RaL) = +R1-R5 % retseptor-fluorestsentsligand kompleks, fluorestsentsligand on seotud retseptori allosteerilisse sidumistaskusse

d/dt(RC) = +R2-R3 % retseptor-konkureeriv ligand kompleks

d/dt(RL) = +R5 %retseptor-fluorestsentsligand kompleks, fluorestsentsligand on seotud retseptori ortosteerilisse sidumistaskusse

d/dt(RCL) = +R3 % retseptor-konkureeriv ligand kompleks, fluorestsentsligand on seostunud retseptori allosteerilisse sidumistaskusse

d/dt(NBV) = -R4 + R8\*NBV common % mittespetsiifilise seostumise saidid

d/dt(NBVL) = +R4 % mittespetsiifiliselt seostunud fluorestsentsligand

d/dt(V) = -R8 %bakuloviiruse ruumala, µl

C(0) = 0L(0) = 0R(0) = 0RaL(0) = 0RC(0) = 0RL(0) = 0RCL(0) = 0NBV(0) = 0NBVL(0) = 0V(0) = 0\*\*\*\*\*\*\*\* MODEL PARAMETERS kf1 = 0.00498375kr1 = 0.00165521kf2 = 3.24395kr2 = 18.1702kf3 = 0.000494276kr3 = 3.60145e-05kf4 = 1.82956kr4 = 76.6648kf5 = 0.00214622kr5 = 7.42069e-05Afree = 0.00781098 %vaba ligandi anisotroopia Arl = 0.19 % retseptoriga seotud ligandi anisotroopia, ligand on retseptori ortosteerilises saidis Aral = 0.157139 % retseptoriga seotud ligandi anisotroopia, ligand on retseptori allosteerilises saidis Anbv = 0.055 % mittespetsiifiliselt seotud ligandi anisotroopia n = 0.212889% faktor, mis teisendab lisatud bakuloviiruse ruumala retseptori kontsentratsiooniks NBVcommon = 473 % faktor, mis teisendab lisatud bakuloviiruse ruumala mittespetsiifiliste seostumissaitide kontsentratsiooniks

\*\*\*\*\*\*\*\*\* MODEL VARIABLES Ltotal = L+RL+NBVL+RCL+RaL Rtotal = R+RL+RC+RCL+RaL Ctotal = C+RC+RCL FA = (Afree\*L+Arl\*RL+Aral\*RaL+Anbv\*NBVL+Aral\*RCL)/Ltotal

#### \*\*\*\*\*\*\*\* MODEL MATLAB FUNCTIONS

Lisa 11. Fluorestsentsligandi CG72 kineetika kirjeldamiseks kasutatud mudeli 2 erisused.

\*\*\*\*\*\*\* MODEL FUNCTIONS  $f(x) = -2.538034990568067e - 25*x^5 + 3.974670666653114e - 20*x^4 - 2.320283224514693e - 15*x^3 + 6.213445121869368e - 11*x^2 - 6.924438448880854e - 07*x$ 

Ligand	Vabade parameetrite arv k	ln(L)	AIC
CG72	11	-1972	3966
	16	-1691	3414
Skopolamiin	11	-1099	2220
	16	-813	1658
Pilokarpiin (ainult	11	-1238	2498
assotsiatsioon)	16	-798	1628
UR-SK-II-75	11	-1033	2088
	16	-1059	2150
UR-SK-III-59	11	-569	1160
	16	-1269	2570
UR-MK259	11	-856	1734
	16	-860	1752

Lisa 12. Kahe mudeli võrdlus Akaike informatsioonikriteeriumi (AIC) järgi. Väiksem AIC väärtus näitab sobivamat mudelit. L tähistab tõenäosusfunktsiooni.



Lisa 13. MK342 ( $C_{MK342} = 5 \text{ nM}$ ) kineetika erinevate konkureerivate ligandide kõrgeimate mõõdetud kontsentratsioonide juures. Ligandide skopolamiin ( $\blacksquare$ ), UR-MK259 ( $\blacksquare$ ), UR-SK-III-59 ( $\blacksquare$ ) ja UR-SK-II-75 ( $\blacksquare$ ) kontsentratsioonid on vastavalt  $C_{skopolamiin} = 83 \mu M$ ,  $C_{UR-MK259} = 10 \mu M$ ,  $C_{UR-SK-III-59} = 1 \mu M$  ning  $C_{UR-SK-II-75} = 1,7 \mu M$ . Joonisel on toodud kolme korduskatse esinduslikud graafikud. Igat ligandi mõõdeti duplikaatides, veavälbad tähistavad duplikaatide aritmeetilise keskmise standardhälbeid.

Parameeter	Mudeli 1 ennustus	Mudeli 2 ennustus	Mudeli 2 ennustused	
	MK342-le	CG72-le	konkureerimiskatsetele	
kf1	$3,1 \times 10^{-3} \pm 0,9 \times 10^{-3}$	$2,70 \ge 10^{-2} \pm 0,12 \ge 10^{-2}$	3,0 x $10^{-1} \pm 0,6$ x $10^{-1}$	
	10 <sup>-3</sup> min <sup>-1</sup> nM <sup>-1</sup>	$\min^{-1} n \mathbf{M}^{-1}$	$\min^{-1} nM^{-1}$	
kr1	$4,4 \times 10^{-3} \pm 0,4 \times 10^{-3}$	$1,002 \text{ x } 10^{-1} \pm 0,0002 \text{ x}$	$1,0 \times 10^{-1} \pm 0,13 \times 10^{-1}$	
	10 <sup>-3</sup> min <sup>-1</sup>	10 <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup>	min <sup>-1</sup>	
kf5	N/A	$2,33 \times 10^{-3} \pm 0,12 \times 10^{-3}$	$1,30 \ge 10^{-1} \pm 0,13 \ge 10^{-1}$	
		min <sup>-1</sup>	min <sup>-1</sup>	
kr5	N/A	7,18 x $10^{-3} \pm 0,14$ x $10^{-3}$	4,5 x $10^{-3} \pm 0,1$ x $10^{-3}$	
		min <sup>-1</sup>	min <sup>-1</sup>	
Arl	$0,25 \pm 0,06$	$0,258 \pm 0,008$	0,2032 ± 0,0018	
Aral	N/A	$0,126 \pm 0,003$	0,157 ± 0,005	
Anbv	$0,16 \pm 0,04$	0,06660 ± 0,00015	0,04500 ± 0,00004	
n	$0,055 \pm 0,017 \text{ nM}$	0,258 ± 0,013 nM	0,213 ± 0,011 nM	
NBVcommon	$1,1 \times 10^3 \pm 0,4 \times 10^3 \pm 0,4$	$2,30 \text{ x } 10^3 \pm 0,12 \text{ x } 10^3$	$4,7 \ge 10^3 \pm 0,3 \ge 10^3 \text{ nM}$	
	10 <sup>3</sup> nM	nM		

Lisa 14. Mudelite 1 ja 2 ennustatud parameetrite väärtused.

Lisa 15. Konkureerivate ligandide kaalutud keskmised  $pIC_{50}$  väärtused, Cheng-Prusoff-i valemiga (CP) arvutatud  $pK_i$  väärtused ja kineetilise mudeliga arvutatud  $pK_i$  väärtused vastavate standardhälvetega. Ligandi nimetuse järel n tähistab kordusmõõtmiste arvu. Võrdluseks on toodud kirjanduses avaldatud  $pK_i$  väärtused (\* - Jakubík et al. 1997a; # - Huang et al. 2001; § - Croy et al. 2016; ^ - (Pegoli et al. 2017); \$ - (She et al. 2017)).

	TZ 1 1 1	IC		17	TZ .
	Konkureeriv ligand	$\text{pIC}_{50} \pm \text{s}$	$pK_i \pm s(CP)$	$\mathbf{pK}_{i} \pm \mathbf{s}$	$\mathbf{pK}_{i} \pm \mathbf{s}$
				(mudeliga)	(kirjandusest)
_	Atsetüülkoliin, n = 3	3,81 ± 0,17	$4,\!40 \pm 0,\!17$	$4,2 \pm 0,3$	4,49 ± 0,08 *
uistid	Karbakool, $n = 3$	$2,99 \pm 0,15$	3,60 ± 0,15	$3,35 \pm 0,14$	4,29 ± 0,09 *
Agon	Arekoliin, n = 3	3,19 ± 0,03	$3,74 \pm 0,03$	4,3 ± 0,3	5,45 ± 0,05 *
ł	Pilokarpiin, n = 3	3,93 ± 0,03	$4,49 \pm 0,03$	$4,21 \pm 0,04$	5,22 ± 0,19 *
	Skopolamiin, n = 6	$7,6 \pm 0,3$	8,2 ± 0,3	$8,0 \pm 0,4$	9,47 ± 0,06 #
ntago nistic	Atropiin, n = 3	$7,\!89 \pm 0,\!03$	8,45 ± 0,03	$8,372 \pm 0,017$	8,74 ± 0,05 §
A	Pirensepiin, n = 3	$5,55 \pm 0,05$	$6,10 \pm 0,05$	5,73 ± 0,18	6,81 ± 0,08 §
l	UR-MK259, n = 3	$6,727 \pm 0,016$	$7,331 \pm 0,016$	$6,8 \pm 0,5$	8,63 ± 0,02 ^
Uuec gand	UR-SK-III-59, $n = 3$	8,22 ± 0,13	8,86 ± 0,13	8,46 ± 0,11	8,57 ± 0,02 \$
l Jigil	UR-SK-II-75, $n = 4$	8,3 ± 0,3	8,7 ± 0,3	$7,7 \pm 0,3$	8,59 ± 0,05 \$



Lisa 16. Fluorestsentsligandi CG72 seostumiskineetika CHO-K1-hM4 rakkudele korduskatsed (A ja B). Y-teljel on mõõdetud intensiivsuste vahe skaleerituna %-deks, arvutuskäik on kirjeldatud peatükis 5.10.4. Retseptorite ekspressiooni vähenemise tõttu skaleeriti joonisel B assotsiatsioonikineetika iga pildi madalaim väärtus kui 0%. Roheline • ja sinine • tähistavad duplikaate. Veavälbad tähistavad ühe süvendi nelja pildi RS pikslite aritmeetilise keskmise standardhälbeid. Pidev joon on globaalse assotsiatsiooni- ja dissotsiatioonikineetika mudeli ennustus.



Lisa 17. CHO-K1-hM<sub>4</sub> rakkudel tehtud konkureerimiskatse pildid 2 h peale katse algust. Konkureeriva ligandina kasutati karbakooli ning fluorestsentsligandina CG72 ( $C_{CG72} = 2 nM$ ). Näidatud on heleväljapildid tähisega "a" ning vastavad fluorestsentskanali pildid tähisega "b". Piltidel 1a ja 1b  $C_{karbakool} = 5,0 mM$ , piltidel 2a ja 2b  $C_{karbakool} = 8,0 \mu M$ , piltidel 3a ja 3b on ilma karbakoolita tühiproov.

# 12 Lihtlitsents

### Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, \_\_\_\_\_Jane Torp\_\_\_\_\_ (autori nimi)

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

Fluorestsentsmetoodikate arendamine ligandi seostumismehhanismi uurimiseks muskariinsele M4 retseptorile,

(lõputöö pealkiri)

mille juhendajad on \_\_\_\_\_Tõnis Laasfeld ja Maris-Johanna Tahk\_\_\_\_\_, (juhendajate nimed)

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 Commonsi litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, alates 28.05.2023 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.

Jane Torp

28.05.2020