

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

Keemia Instituut

Mari-Liis Tsernant

**MUSKARIINSETE ATSETÜÜLKOLIINI RETSEPTORITE M_1
JA M_2 ISELOOMUSTAMINE RADIOLIGANDI
SIDUMISKATSETES**

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Juhendaja: Anni Allikalt, MSc

Tartu 2018

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	3
SISSEJUHATUS	5
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1.1 Signaaliülekanne	6
1.2 G-valguga seotud retseptorid	6
1.3 Muskariinsed atsetüülkoliini retseptorid	7
1.3.1 M ₁ retseptor	9
1.3.2 M ₂ retseptor	10
1.4 Ligandi sidumiskatsed	10
1.4.1 Radioligandi küllastussidumine	11
1.4.2 Radioligandi väljatõrjumine ehk konkureeriv sidumine	11
1.5 Bakuloviirustel ja Sf9 rakkudel põhinev ekspressioonisüsteem	12
2 EKSPERIMENTAALNE OSA	14
2.1 Materjalid ja aparatuur	14
2.2 Bakuloviiruste ja rakumembraanide valmistamine	14
2.3 Viirus- ja membraanpreparaatide testimine	16
2.4 Radioligandi küllastussidumine	16
2.4.1 Valgu kontsentratsiooni määramine	17
2.5 Radioligandi väljatõrjumiskatsed	17
3 TULEMUSED JA ARUTELU	19
3.1 Viiruspreparaatide valmistamine	19
3.2 Viirus- ja membraanpreparaatide testimine	19
3.3 Küllastussidumine	20
3.4 Väljatõrjumiskatsed	22
KOKKUVÕTE	25
SUMMARY	26
KASUTATUD KIRJANDUS	27
TÄNUAVALDUSED	30
INFOLEHT	31

KASUTATUD LÜHENDID

AC – ensüüm adenülaadi tsüklaas

ACh – atsetüülkoliin

AcMNVP – *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus

cAMP – tsükliline adenosiinmonofosfaat

B_{\max} – maksimaalne ligandi spetsiifiline seostumine, mida väljendatakse mol ligandi/mg valgu kohta

BSA – veise seerumi albumiin (Bovine Serum Albumin)

BV - bakuloviirus

cpm – lugemid minutis (*counts per minute*)

DTT – ditiotreitol

EDTA – etüleendiamiintetraatsetaat

FDA – Ameerika Ühendriikide Toidu- ja ravimiamet (The Food and Drug Administration)

GDP - guanosiindifosfaat

GPCR – G-valguga seotud retseptorid

GTP - guanosiintrifosfaat

G-valk – guaniin nukleotiidi siduv valk

^3H – tritium

IC_{50} – määrgistamata ligandi kontsentratsioon, mis inhibeerib radioligandi sidumist 50% ulatuses

K_i – inhibeerimiskonstant

K_D – radioligandi dissotsiatsiooni tasakaalukonstant

[L] – radioligandi molaarne kontsentratsioon

M₁-M₅ – muskariinsete atsetüülkoliini retseptorite alatüübid

mAChR – muskariinsed atsetüülkoliini retseptorid

MOI – nakatuskordsus

NMS – N-metüülskopolamiin, (1R,2R,4S,5S)-7-{{[(2S)-3-hüdroksü-2-fenüülpropanoüül]oksü}-
9,9-dimetüül-3-oksa-9-asatritsüklo[3.3.1.0^{2,4}]nona-9-ium (IUPAC)

TM – transmembraanne

Tris – 2-amino-2-hüdroksümetüül-propaan-1,3-diool

SISSEJUHATUS

Atsetüülkoliin on neurotransmitter, mis seostub kahte tüüpi retseptoritele: nikotiinsetele atsetüülkoliini retseptoritele ja muskariinsetele atsetüülkoliini retseptoritele. Neist viimane kuulub G-valkudega seotud retseptorite hulka, mis on suurim membraansete valkude perekond. Nende peamiseks funktsiooniks on edastada rakuväliseid signaale raku sisemusse. Häired G-valguga seotud retseptorite aktivatsioonis on seotud mitmesuguste haigustega, mistõttu on need farmaatsiatööstuse jaoks olulised uurimisobjektid. Hinnanguliselt on G-valguga seotud retseptorid märklauaks ligi 40%-le tänapäevastele retseptiravimitele.

Antud töös uuriti muskariinseid atsetüülkoliini retseptoreid, mis on organismis laialdaselt levinud ning mis mõjutavad paljusid erinevaid funktsioone nagu mälu, õppimisvõime, südametöö, silelihaste kontraktsioonid ja isu kontrollimine. Selle tõttu on need retseptorid ka märklauaks paljudele ravimitele, mis on seotud haigustega nagu Alzheimeri tõbi, skisofreenia, diabeet, astma ja Parkinsoni tõbi.

Käesoleva töö eesmärgiks oli kahe muskariinse retseptori alatüübi iseloomustamine radioligandi sidumiskatsete abil. Selleks kasutati kahte erinevat retseptorpreparaati – Sf9 rakumembraanide homogenaate ja pungunud bakuloviiruseid. Mõlema süsteemi puhul tehti kindlaks ekspresioonitase ja määrati erinevate ligandide afiinsused vastavatele retseptoritele. Nii on võimalik erinevaid preparaate ja retseptorite alatüüpe omavahel võrrelda.

1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Signaaliülekanne

Kõik elusorganismid koosnevad rakkudest, mis on pidevas informatsioonivahetuses ümbritseva keskkonnaga. Kui raku välispinnale jõuab signaal, siis käivitab see raku sees keemiliste reaktsioonide rea, mida nimetatakse signaali ülekandeks (Kilk 2007). Viise, kuidas signaal jõuab raku välispinnale ja kuidas seda vastu võetakse on mitmeid. Ühed olulised signaali ülekande vahendajad on retseptorid. Antud töös keskendutakse G-valkudega seotud retseptoritele (GPCR-d), mida tuntakse ka kui seitsme transmembraanse domeeniga retseptorid (Nelson *et al.* 2005).

1.2 G-valguga seotud retseptorid

G-valguga seotud retseptorid moodustavad ühe suurima ja tähtsaima retseptorite klassi. Need vahendavad signaali paljudele erinevatele signaalmolekulidele: footonid, feromoonid, hormoonid või neurotransmitterid. GPCR-id on tuntud ka kui seitsme transmembraanse (TM) alfa-heeliksiga retseptorid, mis aktiveerivad rakuvälise signaali tulemusena guaniin nukleotiidi siduvaid retseptorivalke, mida nimetatakse G-valkudeks. Need kuuluvad GTPaaside hulka, mis jaotatakse kaheks: väiksed GTPaasid ja heterotrimeersed G-valgud. Viimased neist on seotud retseptoritega (Ferguson and Caron 1998).

Heterotrimeersed G-valgud koosnevad kolmest alaühikust: alfa (α), beeta (β) ja gamma (γ). Alfa alaühik suudab siduda ja hüdrolüüsida guanosiin trifosfaati (GTP). Beeta ja gamma alaühikud moodustavad dimeeri, mis dissotsieerub ainult denatureerimisel. Kui retseptor võtab vastu signaali, dissotsieerub G-valgust guanosiin difosfaat (GDP) ning kuna GTP kontsentratsioon rakus on kõrgem kui GDP-l seostub α -alaühikuga eelistatult GTP, mille tulemusena dissotsieerub α -alaühik retseptori ning $\beta\gamma$ dimeeri küljest. Mõlemad kompleksid, nii α kui ka $\beta\gamma$, on võimelised edasi interakteeruma erinevate rakusiseste efektoritega. Suurem osa G-valgu omadusi on määratud alfa alaühikuga. Need on omakorda jaotatud nelja suuremasse rühma: $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha i}$, $G_{\alpha q}$ ja $G_{\alpha 12}$. $G_{\alpha s}$ alaühik olles seostunud GTP-ga aktiveerib adenülaadi tsüklaasi (AC), mis põhjustab rakus tsüklilise adenosiinmonofosfaadi (cAMP) kontsentratsiooni tõusu. $G_{\alpha i}$ alaühik vastupidiselt inhibeerib AC-i ja rakusisese cAMP-i juurde tootmist. $G_{\alpha q}$ alaühik reguleerib ensüümi fosfolipaas, mille abil on võimalik membraani komponente lagundada. $G_{\alpha 12}$ alaühik aktiveerib guaniini nukleotiidide

vahetusfaktoreid ning reguleerib ka Na^+/K^+ vahetust (Neer 1995; Suga and Haga 2007).

G-valkudega seotud retseptorite perekonna täpne suurus ei ole teada, kuid praeguseks on avastatud üle 800 erineva liikme. Need jaotatakse kolme põhiklassi: A, B ja C. Kõige suurem on klass A ehk rodopsiinilaadsed, kuhu alla kuuluvad ka antud töös käsitletud muskariinsed atsetüülkoliini retseptorid. GPCR-id on ühed tähtsamad ravimite märklauad ja ligikaudu 40% tänapäevasest retseptiravimitest on suunatud selle retseptorite perekonna mõjutamisele (Tautermann 2014). On mitmeid näited, milles GPCR-de signaaliradades esinevad mutatsioonid on seotud mõne inimeste haigusega nagu allergiad, skisofreenia, diabeet, depressioon, südame- ja veresoonkonna haigused ja Alzheimeri tõbi. Seega GPCR-de uurimine on jätkuvalt üks tähtsamaid ravimiarenduse suundi maailmas (Lem 1998).

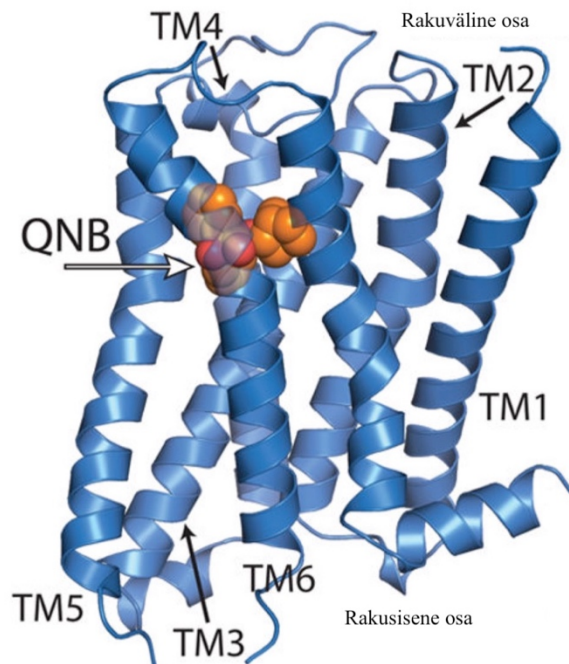
1.3 Muskariinsed atsetüülkoliini retseptorid

Atsetüülkoliin (ACh) on neurotransmitter, mis omab organismis tähtsat rolli. Näiteks stimuleerib see lihaste kontraktsioone ja vahendab koordinatsiooniga seotud impulsse. ACh seondub ja aktiveerib kahte tüüpi kolinergilisi retseptoreid: nikotiinsed atsetüülkoliini retseptorid ja muskariinsed atsetüülkoliini retseptorid (mAChR). Neist esimesed on tuntuimaid ligand-sõltuvad ionkanalid ning viimased kuuluvad GPCR-i perekonda (Wess *et al.* 2007).

mAChR-id defineeris 1914. aastal Sir H. Dale kui retseptorid, mida aktiveerib muskariin ning blokeerib atropiin (Dale 1914). Muskariinseid retseptoreid on viis erinevat alatüüpi: M_1 , M_2 , M_3 , M_4 ja M_5 . Retseptori alatüüpe iseloomustab erinev selektiivsus G-valkude suhtes ning sellest tulenevad ka raku eri vastused kui retseptor aktiveerida. Alatüübid saab omakorda jaotada kaheks funktsionaalseks klassiks vastatavalt sellele, millise G-valgu alfa alaühikuga peamiselt seostumine toimub. M_1 , M_3 ja M_5 seostuvad valdavalt $G_{\alpha q}$ -valkudega põhjustades fosfolipaas C aktivatsiooni ja reguleerides rakusisest kaltsiumi. M_2 ja M_4 seostuvad hoopis $G_{\alpha i}$ -valkudega, mis põhjustavad ensüümi AC inhibeerimise, tuues kaasa rakusisese cAMP-i taseme vähenemise (Jiang *et al.* 2014).

Aastakümneid kirjeldati muskariinsete retseptorite struktuuri erinevate mudelite põhjal. 2012. aastal suudeti kindlaks teha M_2 ja M_3 kristallstruktuurid (Haga *et al.* 2012; Kruse *et al.* 2012). mAChR-ide üldine struktuur sarnaneb suuresti rodopsiinile. Mõlemad retseptorid moodustuvad ühest polüpeptiidist, millel on seitse hüdrofoobset membraani läbivat domeeni, mis on ühendatud rakusiseste ja -välise hüdrofiilsete silmustega, sealjuures N-terminaalne osa on rakuväline ja C-

terminaalne osa rakusisene (Felder *et al.* 2000). Alatüübid sarnanevad omavahel suuresti, kuid siiski on ka mitmesuguseid erinevusi. Näiteks, M_2 retseptori 1. ja 7. transmembraanse heeliksi kaldenurk ja positsioon erineb teistest alatüüpidest. Või kui vaadata atsetüülkoliini seostumist retseptori alatüüpidega selgus, et M_1 on struktuurselt sarnane M_3 retseptoriga, aga M_2 on sarnane M_4 -ga. M_1 ja M_3 alatüübid seostuvad ACh-i ammonium otsaga, kuid M_2 ja M_3 korral on seostumine märkimisväärselt kompleksem (Kruse *et al.* 2012; Pedretti *et al.* 2006).



Joonis 1. Muskariinse atsetüülkoliini retseptori kristallstruktuur. Joonisel on kujutatud M_2 retseptori kompleks koos antagonist QNB-ga (Haga *et al.* 2012).

Muskariinsetel retseptoritel on olemas mitu kohta, kuhu ligandil on võimalik seostuda. Tavapäraselt seostub ligand ortosteerilisse sidumiskohta, mis asub transmembraanse retseptori sees ja on mAChR-i kõikides alatüüpides kõrgelt konserveerunud, mis tähendab, et alatüübid sarnanevad üksteisele ja on raske ühe alatüübi suhtes selektiivseid ligande disainida. Olemas on ka allosteerilised sidumiskohad, mis asuvad ortosteerilisest sidumiskohast eemal, kas rakuvälistel silmustel või domeenidel. Nendes seostumine võib endaga kaasa tuua konformatsiooni muutuse retseptoris, mis mõjutab ligandi seostumist ortosteerilises sidumiskohas ja see võib tagada selektiivsuse alatüüptide seas. Allosteerilisse sidumiskohta seostuvaid aineid on erinevaid. Üheks võimaluseks on positiivsed allosteerilised modulaatorid, mis võimendavad ortosteerilist aktiivsust

või negatiivsed allosteerilised modulaatorid, mis seda inhibeerivad. Lisaks on viimastel aastatel hakatud disainima multivalentseid ligande, mis seostuvad allosteerilisse sidumiskohta, et tagada suurem alatüüp-selektiivsus ja ortosteerilisse sidumiskohta, et garanteerida kõrgem afiinsus (Felder *et al.* 2000; Kruse *et al.* 2014)

Kõiki muskariinsete retseptorite alatüüpe esineb ajus, eelkõige kesk- ja piirdenärvisüsteemis ning selle tõttu reguleerivad need paljusid olulisi funktsioone. Sinna alla kuuluvad kognitiivsed, käitumisega seotud, sensoorsed, motoorsed ja autonoomsed protsessid. mAChR-id on olnud tähtsad ravimi sihtmärgid aastaid ning mitmed muskariinsete agonistid ja antagonistid on FDA poolt heaks kiidetud. Näiteks on müügil Sjögreni sündroomi sümptomite leevendamiseks ravim Exovac ja kroonilise obstruktiivse kopsuhaiguse jaoks Atrovent. Kõige suuremaks probleemiks ongi selektiivsete ligandide disainimine, et aktiveeruks vaid teatud alatüüpi muskariinne retseptor. Õnneks on sellel alal toimunud viimaste aastate jooksul mitmeid edusamme. Näiteks M₂ retseptori jaoks arendati multivalentne antagonist THRX-160209, mis seostus nii allosteerilise kui ka ortosteerilise sidumiskohaga tagades nii selektiivsuse alatüübi suhtes ja ka afiinsuse. Lisaks uuritakse allosteerilisi ligande, mis küll iseseisvalt retseptorit ei aktiveeri, aga koos ortosteerilise ligandi sidumisega võiksid olla suutelised tagama retseptori alatüübi suhtes selektiivsust. Tulevikus võivad ravimid, mille sihtmärgiks on muskariinsete retseptorite alatüübid, aidata sümptomeid leevendada või ravida näiteks Alzheimeri tõbe, skisofreeniat, Parkinsoni tõbe, diabeeti ja uimastisõltuvust (Kruse *et al.* 2014; Wess *et al.* 2007).

1.3.1 M₁ retseptor

M₁ retseptorid moodustavad organismis leiduvatest mAChR-ite alatüüpidest suurima osa, umbes 50%. Selle retseptori aktivatsioonil on mitu tagajärge: fosfolipaas C stimulatsioon, cAMPi tootmise inhibeerimine, K⁺ ja Cl⁻ kanalite aktivatsioon. Ligandi seostumine retseptoriga toob kaasa konformatsiooni muutuse tänu millele saab retseptor interakteeruda ja aktiveerida G-valke. Üheks näiteks M₁ retseptori agonistist on xanomeline, mida on pikalt uuritud leevendamaks Alzheimeri tõbe ja skisofreenia sümptomeid (Mirza *et al.* 2003) ning antagonistist on pirenzepine (Enna *et al.* 2008).

Need retseptorid on enim ekspresseeritud eesajus, seal hulgas ka ajukoos, taalamuses ja hipokampuses. Arvatakse, et need vahendavad paljusid protsesse, mis on seotud õppimisvõime ja

mäluga, mis tõttu peetakse neid heaks sihtmärgiks leidmaks ravi neuroloogilistele häiretele, eriti Alzheimeri tõvele ja skisofreeniale. Paljud ravimikatsetused on aga ebaõnnestunud, sest ei ole veel suudetud leida vaid M_1 suhtes selektiivseid ligande. Tagajärjeks on teiste alatüüpide aktiveerimine ja mittesoovitud kõrvalnähud nagu iiveldus, kõhulahtisus ja higistamine (Felder 1995).

1.3.2 M_2 retseptor

M_2 retseptori aktivatsioon põhjustab adenülaadi tsüklaasi aktiivsuse inhibeerimise ja K^+ kanalite aktivatsiooni, mis võib viia hüperpolarisatsioonini. Ühtegi kõrge afiinsusega agonisti pole veel M_2 retseptorile leitud, kuid heaks antagonistiks on näiteks tripatramiin, mis sisaldab struktuuri elemente kahest teisest M_2 selektiivse muskariinse antagonistist (methocrtamiin ja AQ-RA 741) või dibesnoasapiinide klassi kuuluvad antagonistid (Felder *et al.* 2000).

Neid retseptoreid leidub praktiliselt ainsa alatüübina südames, peale selle on neid silelihastes, kopsudes ja vähesel määral ka kesknärvisüsteemis. Aktiveeritud olekus retseptor põhjustab südame löögisageduse vähenemise (Enna *et al.* 2008). Samuti uuritakse M_2 retseptoreid, et leida ravi ka erinevate kasvaja nagu glioblastoom jaoks (Ferretti *et al.* 2013).

1.4 Ligandi sidumiskatsed

Ligandi sidumiskatsed on meetod, mille abil saab kirjeldada retseptori ja ligandi vahelist vastastikmõju. Selle kaudu saab ka iseloomustada ligandide afiinsust vastavale retseptorile, seostumise ja dissotsiatsiooni kiirust ning ekspresseeritud retseptorite tihedust kudedes või rakkudes (Enna *et al.* 2008).

GPCR-de kaudu oma mõju avaldavaid ravimeid on mitmeid, kuid nende toime võib olla erinev. Ravimid võivad jäljendada endogeensete virgatsainete toimet aktiveerides retseptoreid, sellisel juhul kutsutakse neid agonistideks. Samas võivad nad käituda kui antagonistid, seostudes retseptoriga ilma bioloogilist vastust tekitamata. Sidumiskatses on keeruline eristada agoniste ja antagonistide, seega kutsutakse neid ühtselt ligandideks (Davenport and Russell 1996).

Ligandi sidumiskatsed jaotatakse kolmeks alatüübiks (Hulme and Trevethick 2010):

1. Kineetilised eksperimendid – seostumist mõõdetakse erinevatel ajapunktidel, kasutades kindla kontsentratsiooniga radioligandi.

2. Küllastussidumise katsed – seostumist vaadeldakse tasakaalulistes tingimustes erinevatel radioligandi kontsentratsioonidel.
3. Konkureeriva sidumise katsed – seostumist mõõdetakse muutes märgistamata ligandi kontsentratsiooni, hoides radioligandi kontsentratsioon konstantsena. Arvutatakse ka tasakaalulise inhibeerimiskonstandi (K_i) väärtus.

1.4.1 Radioligandi küllastussidumine

Esimesed radioligandi sidumiskatsed tehti 1970-ndatel aastatel, kui määrati radioaktiivselt märgistatud hormooni afiinsust selle retseptorile (Paton and Rang 1965; Lefkowitz *et al.* 1970). Alates sellest on ^3H ja ^{125}I isotoop märgistatud ligande hakatud laialdaselt kasutama, et iseloomustada GPCR-i ja seostuva ühendi vahelist afiinsust. Märgistamata ühendeid saab seevastu iseloomustada läbi nende võime seostunud radioligandi retseptorilt välja tõrjuda või muuta radioligandi afiinsust retseptorile (Zhang and Xie 2012).

Küllastussidumise katses kasutatakse erinevaid radioligandi kontsentratsioone ning tulemusest on võimalik määrata kahte tähtsat parameetrit: dissotsiatsiooni konstanti (K_D) ja sidumiskohtade hulka retseptorpreparaadis (B_{\max}). K_D iseloomustab ka radioligandi afiinsust retseptorile. Sellele vastab ligandi kontsentratsioon, mille juures on ligand seostunud 50%-le retseptoritest. Mida madalam on K_D väärtus, seda kõrgem on retseptori afiinsus ligandile. B_{\max} näitab maksimaalset retseptorite arvu ning seda väljendatakse koe või valgu koguse kohta süvendis (Hein *et al.* 2005).

1.4.2 Radioligandi väljatõrjumine ehk konkureeriv sidumine

Radioligandi väljatõrjumiskatsega saab iseloomustada märgistamata ligandide seostumist retseptoriga. Seda tehakse uurides nende võimet inhibeerida radioligandi sidumist retseptorile.

Katses hoitakse radioligandi kontsentratsioon konstantsena ning muudetakse märgistamata ligandi kontsentratsiooni. Määratakse IC_{50} väärtus, mis näitab märgistamata ligandi kontsentratsiooni, mis inhibeerib radioligandi sidumist 50% ulatuses. Selle väärtuse abil on võimalik arvutada ka inhibeerimiskonstant (K_i), mis iseloomustab märgistamata ligandi afiinsust radioligandi sidumiskohtadele (Hein *et al.* 2005). Arvutamiseks kasutatakse enamasti Cheng-Prusoffi võrrandit, mida saab kasutada vaid konkureeriva sidumise ja tasakaaluliste tingimuste korral (Cheng and Prusoff 1973):

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[L]}{K_D}}$$

K_i – inhibeerimiskonstant

IC_{50} – määrgistamata ligandi kontsentratsioon, mis inhibeerib radioligandi sidumist 50% ulatuses

$[L]$ – katses kasutatud radioligandi kontsentratsioon

K_D – radioligandi dissotsiatsioonikonstant

1.5 Bakuloviirustel ja Sf9 rakkudel põhinev ekspressioonisüsteem

Viise, kuidas uurida G-valguga seotud retseptorite ja ligandide vahelisi interaktsioone on mitmeid. Üks kõige laialdasemalt kasutatav meetod on bakuloviirustel ja putukarakkudel põhinev ekspressioonisüsteem, mille abil saab toota rekombinantseid valke. Sellel on mitmeid eeliseid bakteriaalsete rakkude ja pärmide ekspressioonisüsteemide ees. Tänu putukarakkude võimele teostada eukarüootseid post-translatoorseid modifikatsioone on sellel viisil toodetud rekombinantsed valgud sarnased imetajarakkudes toodetud valkudele. Samuti on valku võimalik sel viisil toota suuremates kogustes ja odavamalt (Schneider and Seifert 2010; Zhang *et al.* 1994), mistõttu Sf9 rakke kasutatakse sageli ka GPCR-de ekspresseerimiseks valgu kristallstruktuuri saamise eesmärgil.

Antud ekspressioonisüsteemis nakatatakse Sf9 rakud geneetiliselt modifitseeritud bakuloviirusega, et toimuks soovitud valgu tootmine. Tavaliselt kasutatakse *Baculoviriade* perekonda kuuluvat *Autographa californica* multikapsiidne nukleopolühedroviirust (AcMNPV). Viirusesse on kodeeritud polühedriini promootori alla huvipakkuv geen ning selle abil hakatakse tootma rekombinantseid valke. Promootorid võimaldavad rekombineeritud valku toota suurtes kogustes, kuid see toimub hilises transkriptsioonifaasis (kuni 72h peale nakatamist). Pungunud bakuloviirused moodustuvad peale esmast nakatumist kui rakupinnalt punguvad nukleokapsiidid. Need bakuloviirused on pulgakujulised ning nende läbimõõt on 30-60 nm ja pikkus 250-300 nm. Need on ümbritsetud lipiidse kaksikkihiga, mis haaratakse peremeesraku pinnalt koos selles paiknevate membraanvalkudega kaasa. Nii saadakse nende pinnale rekombinantsed valgud (Contreras-Gómez *et al.* 2014; Massotte 2003).

Seda ekspressioonisüsteemi kasutades on võimalik Sf9 rakke modifitseerida nii, et need ekspresseeriks rekombinantseid GPCR-id. Kogudes kokku pungunud viirused sellistelt rakkudelt, võib saada bakuloviiruse osakesed, mis kannavad huvipakkuvat retseptorit (Veiksina *et al.* 2014).

2 EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Materjalid ja aparatuur

Rakkude loendamiseks ja elumuse määramiseks kasutati rakuloendurit TC10™ Automated Cell Counter (Bio-Rad Laboratories). Rakkude elumuse määramiseks lisati rakususpensioonile 0,4 % trüpaansinist (Sigma-Aldrich), lõppkontsentratsioon 0,2 %. Tsentrifugimine toimus Sigma Laborzentrifugen mudeliga 3K30. Rakkude homogeniseerimiseks kasutati homogenisaatoreid Parmer LabGen 125 ja Bandelin electronic UW 2070.

Katsed viidi läbi U-kujulise põhjaga 96-süvendilisi plaatides (Greiner). Radioaktiivsetes katsetes kasutati triitiumiga märgistatud antagonistiga [³H]N-metüülskopolamiin ([³H]-NMS, eriaktiivsusega 84,1 Ci/mmol) firmalt Perkin Elmer. Testligandid (FL-MK-342, AF-DX-384, UR-MK-259, UR-SK-II-75, UR-SK-III-59, UR-SK-III-9, UR-SK-III-49 ja UR-SK-III-52) on pärit Dr. Max Kellerilt Regensburgi ülikoolist, Saksamaalt ning NMS firmalt Sigma.

Radioligandi katsetes kasutati inkubeerimiseks loksutit Thermomixer comfort (Eppendorf), filtreerimiseks klaaskiudfiltermatte (GF/B, Perkin Elmer) ja filtreerimissüsteemi FilterMate Harvester (Perkin Elmer). Tahke stantillant MeltiLex™ B/HS (Perkin Elmer) sulatati filtrisse kuumpressi Wallac MeltiLex Heatsealer (Perkin Elmer) abil. Filtrile jäänud radioaktiivsuse loendamiseks kasutati luminesentsi loendurit Wallac MicroBeta TriLux 1450 LSC (Perkin Elmer).

Kõikide tulemuste analüüsiks ja graafiliseks esitamiseks kasutati programmi GraphPad Prism™ 5.00.

2.2 Bakuloviiruste ja rakumembraanide valmistamine

Selleks, et määrata bakuloviiruste tiiter, kasutati suuruse muutusel põhinevat bakuloviiruse tiitrimismeetodit (Laasfeld *et al.* 2017). Selleks kanti rakud 24-kohalisele plaadile nii, et süvendisse jäi 0,2 mln rakku ning seejärel lasti rakkudel kinnituda inkubeeriti 30 – 60 minutit. Samal ajal valmistati viiruse algsuspensioonist 12 seerialahjendust. Kõikidesse tuubidesse lisati 600 µl Excell söödet, v.a esimesse, kuhu lisati 900 µl viiruse algsuspensiooni. Punktidesse 2-11 lisati 300 µl viiruse alglahust ja segati korralikult. Viimasesse tuubi viirust ei lisatud (ainult rakusööde).

Seejärel pipeteeriti katseplaadil olemasolevasse 250 µl söötmesse 250 µl erinevaid viiruse seerialahjendusi duplikaatides. Plaati inkubeeriti 24 h ning seejärel mõõdeti mikroskoobiga varustatud plaadilugejaga Cytation 5-ga rakkude diameeter, mille põhjal arvutati ka viirusetiiter.

Spodoptera frugiperda (Sf9) putukarakke, kasvatati Ex-Cell (Sigma Aldrich) raku söötmes inkubaatoris 27 °C juures. Rakususpensiooni tihedusega 2,0 mln/ml nakatati viirusega (M_1 või M_2 , MOI=5). Oodati ligikaudu 48 h kuni elumus oli ligikaudu 90 %. Seejärel tsentrifugeeriti rakud 3000 rpm juures 10 minutit, eemaldati supernatant ning hoiustati sade -80 °C juures kuni rakumembraanide valmistamiseni. Bakuloviiruse korral oodati peale nakatamist ligikaudu 72 h kuni elumus oli langenud alla 50 %. Seejärel tsentrifugeeriti rakususpensiooni 10 minutit 3000 rpm juures ning supernatant hoiustati +4 °C juures.

Rakumembraanide valmistamisel hoiti kõiki lahuseid jääl ja tsentrifugeerimised viidi läbi 4 °C juures. Kõigepealt sulatati rakud, resuspendeeriti need 20 ml-s jääkülmas pesupuhvril (50 mM Tris-HCl, EDTA-vaba proteaasi inhibiitor (Roche Applied Science), pH = 7,4) ning tsentrifugeeriti 800 × g juures 5 minutit. Saadud sade resuspendeeriti uuesti 20 ml-s pesupuhvril, kanti 30 ml-sse tuubidesse ning homogeniseeriti mehaaniliselt (ligikaudu 30 sekundit). Seejärel tuubid tasakaalustati ning tsentrifugeeriti 30 000 × g juures 20 minutit. Eelmist sammu korrati ning viimane homogeniseerimine viidi läbi katsepuhvril (50 mM Tris-HCl, 120 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM KCl, 1 mM EDTA, pH = 7,4), nii et saavutati rakususpensioon ligikaudse tihedusega 10 miljonit rakku/ml-s. Saadud lahus jagati 1 ml kaupa alikvootidesse ning külmutati -80 °C juures kuni katseni.

Bakuloviiruste kogumine ja tsentrifugeerimine viidi läbi jääl ning tsentrifugeerimised tehti 4 °C juures. Viirus jaotati tsentrifugeerituubidesse, need tasakaalustati ning tsentrifugeeriti 48 000 × g juures 45 minutit. Järgnevalt eemaldati raku sööde ja pesti saadud sadet puhvriga (1x EDTA-vaba proteaasi inhibiitor, 0,10% pluronic, 0,1 mg/ml BSA, 11 mM Na-Hepes, 1 mM MgCl₂, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂ ja 135 mM NaCl, pH = 7.4), et eemaldada kogu raku sööde. Sade resuspendeeriti 1 ml-s puhvril (toimus ligikaudu 27x kontsentreerimine). Seejärel pipeteeriti kõik resuspendeeritud lahused ühete tuubi, jagati see alikvootidesse ning hoiustati -80 °C juures kuni katseni.

2.3 Viirus- ja membraanpreparaatide testimine

Muskariini retseptoreid ekspresseerivate viiruspreparaatide ja Sf9 rakumembraanide testimise eesmärgiks oli välja selgitada sobivad retseptorpreparaatide kogused järgmisteks katseteks.

Katseks oli tarvis katsepuhvrit, millele vahetult enne katset lisati juurde ka 1 mM DTT. Katses hoiti konstantsena radioligandi kontsentratsioon (ligikaudu 1 nM) ning ka mittespetsiifilise seostumise määramiseks kasutatud märgistamata ligandi metüülskoopolamiini (NMS) kontsentratsioon (1 μ M). Varieeriti membraanpreparaatide hulka katses (8x, 16x, 32x ja 64x lahjendus bakuloviirustel ja $3,75 \cdot 10^4 - 3 \cdot 10^5$ rakku/süvendis) rakumembraanide korral. Kõiki lahuseid hoiti katse ajal jääl.

Katse jaoks kasutati 96-süvendiga katseplaati ning lahuse lõppruumala süvendis oli 250 μ l (50 μ l radioligandi, 50 μ l katsepuhvrit või märgistamata ligandi (NMS) ja 150 μ l viiruselahust või rakumembraani preparaati). Katse teostati triplikaatides. Pärast lahuste pipeteerimist süvenditesse inkubeeriti katseplaati loksutil 60 minutit (25°C, 400 rpm). Järgnevalt eraldati vaba radioligand retseptori ja radioligandi kompleksist filtreerimisega. Selleks kasutati klaaskiudkiltreid, mida pesti 5 korda jääkülma pesupuhvriga (20 mM K-fosfaat, 100 mM NaCl, pH = 7,4) ning seejärel kuivatati filtreid mikrolaineahjus 2 minutit 800 W juures. Kuumpressi abil sulatati kuivatatud filtrisse tahte stsintillant ning radioaktiivsusloenduriga mõõdeti filtrile jäänud radioaktiivsus.

2.4 Radioligandi küllastussidumine

Radioligandi sidumise M_1 ja M_2 retseptoreid ekspresseerivatele rakumembraanidele või bakuloviirustele eesmärgiks oli leida radioligandi dissotsiatsioonikonstant (K_D) ja hinnata sidumiskohtade hulka retseptorpreparaadis (B_{max}), et hiljem arvutada välja inhibeerimiskonstandid väljatõrjumiskatsetes.

Katses kasutati katsepuhvrit, millele vahetult enne katset lisati 1 mM DTT. Kontsentratsioon hoiti konstantsena märgistamata ligandi 4-DAMP puhul ning ka viiruslahuste ja membraansuspensioonide hulka katses ei varieeritud. Radioligandi lahusest tehti seerialahjendused katsepuhvris kaheteistkümnelt erineval kontsentratsioonil. Et mõõta totaalset seostumist lisati süvendis radioligandile katsepuhvrit, mittespetsiifilise seostumise jaoks lisati seevastu sama ruumala 50 μ M märgistamata ligandi. Lahuste valmistamine toimus jääl.

Katsed viidi läbi U-kujulise põhjaga 96-süvendilistel katseplaatidel ning lahuse lõppruumala süvendis oli 250 µl (50 µl radioligandi, 50 µl 4-DAMP-i või puhvrit ja 150 µl viiruselahust või membraanpreparaati). Katse sooritati duplikaatides. Peale pipeteerimist inkubeeriti katseplaati loksutil 90 minutit (25°C, 400 rpm). Järgnevalt filtreeriti pesupuhvriga, kuivatati filter, sulatati sellele tahke stsintillaat ning mõõdeti loenduri abil radioaktiivsus.

Katses määrati ka radioligandi iga seerialahjenduse kontsentratsioon. Selleks pipeteeriti kindel kogus (20 µl) radioligandi lahust stsintilleeruvasse ainesse ScintiSafe 3 (Fisher Chemical) ning mõõdeti loenduris, et hinnata radioligandi tegelikku kontsentratsiooni lahuses. Kontsentratsiooni mõõtmine teostati duplikaatides.

2.4.1 Valgu kontsentratsiooni määramine

K_D ja B_{max} -i arvutamiseks oli vaja teada ka valgu kontsentratsiooni preparaatides. Selle määramiseks kasutati Bradfordini meetodit (Bio-Rad Laboratories). Katse jaoks tehti BSA lahuse kontsentratsiooniga 2 mg/ml ning sellest valmistati omakorda 12 standardlahust kontsentratsioonide vahemikus 0 – 1,5 mg/ml. Edasi pipeteeriti 10 µl igat standardlahust ja retseptorpreparaati 96-süvendilisele katseplaadile triplikaatides. Igast retseptorpreparaadist tehti ka kahekordne lahjendus. Igasse süvendisse lisati 200 µl Bradfordini reagenti ning segati pipeteerides üles-alla vähemalt 10 korda. Seejärel inkubeeriti katseplaati toatemperatuuril vähemalt 5 minutit. Mõõtmiseks kasutati plaadilugejat PHERAstar (BMG Labtech), millega mõõdeti neelduvust 590 nm juures. Saadud tulemuste põhjal tehti kalibreerimisgraafik ning selle põhjal arvutati valgu kontsentratsioon retseptorpreparaatides.

2.5 Radioligandi väljatõrjumiskatsed

Väljatõrjumiskatsete eesmärgiks oli hinnata märgistamata ligandi affiinsust (inhibeerimiskonstandi väärtust) vastavale retseptorile.

Katses kasutati katsepuhvrit, millele vahetult enne katse alustamist lisati 1 mM DTT-d. Radioligandi kontsentratsioon (ligikaudu 1 nM) ning viiruselahuste või rakumembraanide hulk katses hoiti konstantsena. Testligandidest tehti 8-kordsed seerjalahjendused katsepuhvris. Kõikide lahuste valmistamine toimus jääl.

Katsed teostati 96-süvendilistel plaatidel, kuhu pipeteeriti 50 µl radioligandi, 50 µl testligandi lahjendusi ja 150 µl viiruslahust või membraansuspensiooni. Katsed teostati triplikaatides. Peale pipeteerimist inkubeeriti katseplaati loksutil 90 minutit (25°C, 400 rpm). Seejärel korrati samu etappe, mida eelpool kirjeldatud katse korral.

Katses määrati ka kasutatud radioligandi kontsentratsioon eelpool toodud meetodiga. Kontsentratsiooni määramine teostati triplikaatides.

3 TULEMUSED JA ARUTELU

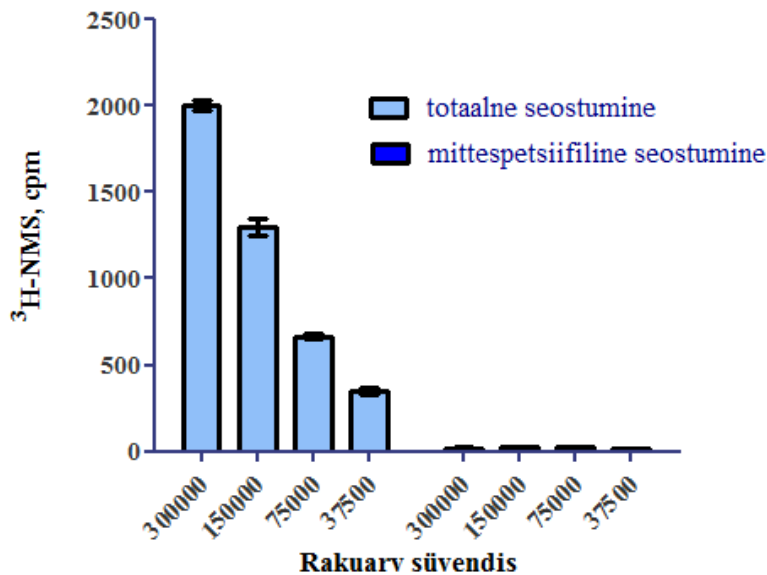
3.1 Viiruspreparaatide valmistamine

Valgu tootmiseks on vajalik teada viiruse tiitrit ehk nakatusvõimeliste viirusosakeste hulka ühes ml-s. Selle kindlaks määramiseks viidi läbi raku suuruse muutusel põhinev bakuloviiruse tiitrimine. Bakuloviirusega nakatatud raku suurus muutub, seega mida rohkem on viirust, seda suurem on rakkude keskmine diameeter. M_2 puhul saadi viiruse tiitriks $1,6 \cdot 10^8$, mis oli sobilik valgu tootmiseks. M_1 korral saadi viiruse tiitriks $1,16 \cdot 10^7$, kuid kuna taheti saavutada $MOI = 3-5$, siis oli viirusosakesi juurde vaja ja viirust tuli amplifitseerida. Teistkordsel tiitrimisel saadi tiitriks $3,47 \cdot 10^7$.

3.2 Viirus- ja membraanpreparaatide testimine

Testiti nelja erinevat preparaati: bakuloviiruseid BV M_1 ja BV M_2 ning rakumembraanide homogenaate Sf9 M_1 ja Sf9 M_2 . Katset viidi läbi selleks, et saada teada retseptorite olemasolu ja sobivat preparaadi kogust edasisteks katseteks. Kuna tegemist oli uute retseptorpreparaatidega oli ühtlasi eesmärgiks välja selgitada, kas radioligandi sidumiskatseid saab läbi viia muskariinsete retseptorite viirusosakestega. Kõige sobilikum retseptorpreparaadi kogus oleks kui totaalne seostumine toimuks signaali vahemikus 800-1200 cpm-i. Katse läbiviimiseks tehti preparaatidest erinevad lahjendused. Viiruslahuste puhul tehti 8-, 16-, 32- ja 64-kordsed lahjendused ning rakumembraanide puhul 5-, 10-, 20- ja 40-kordsed lahjendused.

Alloleval joonisel on toodud membraanpreparaatide testimise tulemus M_2 retseptori jaoks. Katse tulemustest on näha, et totaalne seostumine on tunduvalt suurem kui mittespetsiifiline seostumine. Joonisel 2 on näha, et mittespetsiifiline seostumine moodustab väga väikse osa totaalsest (alla 5%). Lahutades totaalsest seostumisest mittespetsiifilise seostumise on tulemuseks spetsiifiline seostumine, mis antud tingimustes moodustab enamuse mõõdetu signaalist. See omakorda viitab aktiivse retseptori olemasolule preparaadis. Sobiv kogus, mis jääb edasisteks katseteks valitud signaali vahemikku, on punktis, mis vastab ligikaudu 90 000 rakule/süvendis. Seetõttu kasutati järgnevat katsetes 17-kordset lahjendust alglahusest.



Joonis 2. Membraanpreparaadi testimine radioligandi väljatõrjumiskatsetes. Graafikul on välja toodud katsete keskväärtused \pm SD (standardhälve), katse on teostatud triplikaatides.

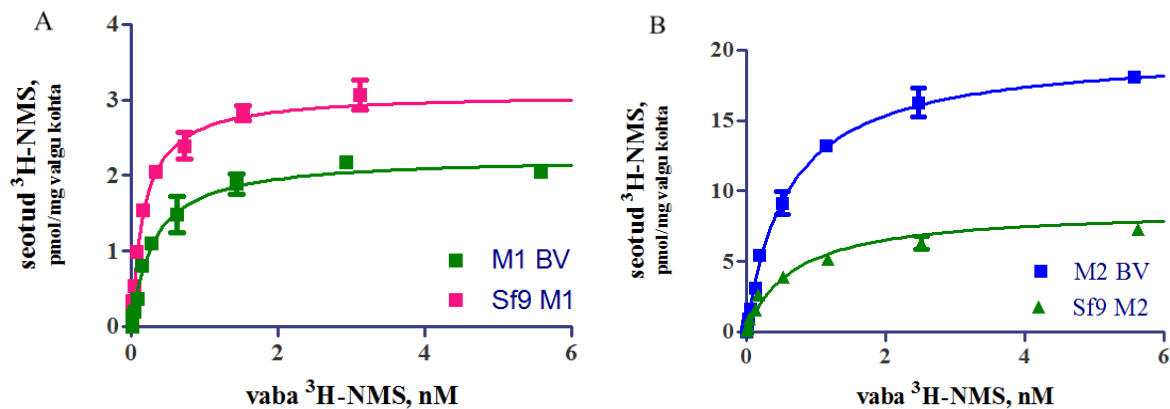
Samasugused katsed viidi läbi ka teiste retseptorpreparaatidega. Sf9 M_1 jaoks oli sobiv membraanpreparaadi hulk ligikaudu 215 000 rakku/süvendis ehk alglahusest tehti 7-kordne lahjendus. Viiruspreparaatide korral oli M_1 retseptori jaoks sobiv 24-kordne lahjendus ning M_2 retseptori jaoks 55-kordne lahjendus. Kõikide preparaaside puhul oli mittespetsiifiline seostumine väga madal, mis näitab, et preparaadid olid kvaliteetsed ning need sobivad järgnevate katsete sooritamiseks.

3.3 Küllastussidumine

Peale viirus- ja membraanpreparaatide testimist viidi läbi küllastussidumise katsed, et hinnata radioligandi afiinsust retseptorile ja määrata ekspresioonitase vastavates preparaatides. Afiinsust iseloomustab K_D väärtus, mida hiljem kasutatakse ka märgistamata ligandide inhibeerimiskonstantide arvutamiseks Cheng-Prusoffi võrrandi abil. Üldiselt võiks radioligandide K_D väärtus jääda alla 1 nM, mis näitab ligandi kõrget afiinsust. $^3\text{H-NMS}$ -i puhul leidub kirjanduses, et M_1 retseptori korral peaks afiinsus jääma vahemikku 0,05 nM – 0,42 nM ((Christopoulos *et al.* 1998; Jakubík *et al.* 1997) ja M_2 retseptori korral 0,14 – 0,52 nM (Lazareno and Birdsall 1995; Khattar *et al.* 2006). Kuid tasub tähele panna, et need väärtused on saadud imetajarakkudes.

Selleks, et neid väärtusi arvutada, määrati valgu kontsentratsioon preparaatides Bradfordini meetodi abil. BV M₁ preparaadis oli valgu kontsentratsioon 0,894 mg/ml, BV M₂ 0,790 mg/ml, Sf9 M₁ 0,430 mg/ml ja Sf9 M₂ korral 0,602 mg/ml.

Joonistel 3 on välja toodud radioligandi spetsiifiline seostumine retseptorpreparaatidele. K_D ja B_{max}-i leidmiseks lahutati määratud totaalsest seostumisest mittespetsiifika, mille tulemusel saadi spetsiifiline seostumine. See on vajalik, kuna lisaks retseptorile seostumisele võib radioligand seostuda mittespetsiifiliselt filtrile või rakumembraanile.



Joonis 3. Radioligandi spetsiifiline seostumine M₁ ja M₂ retseptorpreparaatidele küllastussidumise katses. Joonisel A on M₁ retseptorpreparaatide küllastussidumise tulemused ja joonisel B M₂ retseptorpreparaatide omad. Katse sooritati vastavalt eksperimentaalses osas kirjeldusele. Katsed sooritati duplikaatides.

Tabelis 1 on välja toodud küllastussidumise katsete tulemused. Kõikide preparaate dissotsiatsioonikonstandi väärtused jäid alla 1 nM ehk radioligand ³H-NMS seostub antud preparaatides olevatele retseptoritele kõrge afiinsusega. Sf9- ja BV-preparaatide tulemused on mõlema retseptori korral väga sarnased. Kõige madalam dissotsiatsioonikonstant on membraanpreparaatides ekspresseeritud M₁ retseptoril $0,25 \pm 0,10$ nM. Suurima väärtusega on BV-tes ekspresseeritud M₂ retseptori dissotsiatsioonikonstant $0,83 \pm 0,13$ nM, mis on peaaegu 3 korda suurem kui M₁ retseptori preparaadis. See näitab, et M₁ retseptor puhul on radioligandi afiinsus kõrgem kui M₂ retseptoril. See on kooskõlas ka kirjandusest leitavate väärtustega (Khattar *et al.* 2006; Jakubik *et al.* 1997).

Leiti ka B_{max}, mis iseloomustab preparaadi aktiivsete retseptorite hulka. B_{max} on suurim BV-tes M₂ retseptorite korral, kus retseptorite hulk on $19,57 \pm 3,1$ pmol/mg valgu kohta. See on umbes 2 korda rohkem kui vastavas membraanpreparaadis. M₁ retseptorite korral on väärtused sarnasemad, BV-tes korral $3,22 \pm 0,60$ ja membraanpreparaatides $2,63 \pm 0,42$ pmol/mg valgu kohta. Tulemused

näitavad, et bakuloviirustes leidub rohkem retseptorit kui rakumembraanides. See võib olla põhjustatud retseptorpreparaatide valmistamise erinevusest – BV-te puhul kasvatati rakke 72 h, rakumembraanide puhul aga 48 h. Seega võis bakuloviiruste tegemisel rakkudel olla rohkem aega paljuneda ja uusi retseptoreid toota. Samuti on bakuloviirused homogensemad preparaadid, kuna rakust pungumise puhul võetakse kaasa vaid aktiivsed rakumembraanil olevad valgud. Sf9 rakkudes valmistatud homogenaatide puhul võib proov sisaldada lisaks rakumembraanidele ka muid rakukomponente.

Katse tulemuste põhjal võib öelda, et kõikides retseptorpreparaatides on aktiivsed retseptorid olemas ning radioligand seostub nendega kõrge afiinsusega. Nii BV-te kui ka rakumembraanide preparaadid sobivad radioligandi katsete läbiviimiseks.

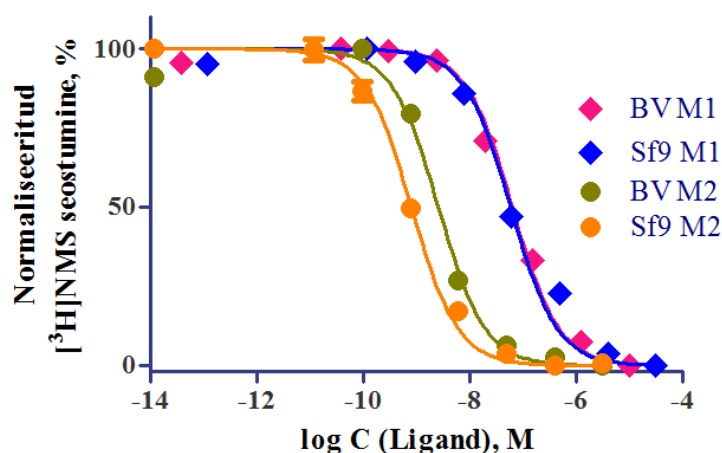
Tabel 1. Leitud K_D ja B_{max} -i väärtused erinevates preparaatides. Mõlemad on väärtused on antud koos keskmise tulemuse ja aritmeetilise keskmise standardhälbega (S.E.M.).

	BV M ₁	Sf9 M ₁	BV M ₂	Sf9 M ₂
K_D [nM]	0,29 ± 0,05	0,25 ± 0,10	0,83 ± 0,13	0,76 ± 0,14
B_{max} [pmol/mg valgu kohta]	3,32 ± 0,60	2,63 ± 0,42	19,57 ± 3,1	8,29 ± 0,43

3.4 Väljatõrjumiskatsed

Muskariinsete retseptorite iseloomustamiseks tehti katsed kaheksa erineva ligandiga. Katsete tulemuste põhjal leiti K_i väärtused, mis iseloomustavad märgistamata ligandi afiinsust radioligandi sidumiskohtadele. Enne inhibeerimiskonstandi arvutamist leiti ka IC_{50} väärtused, mis näitavad märgistamata ligandi kontsentratsiooni, mille juures on radioligandi seostumine 50% ulatuses inhibeeritud.

Joonisel 4 on kujutatud väljatõrjumiskõver, mis näitab, et ka bakuloviiruseid võib kasutada radioligandi väljatõrjumiskatsetes. Ülemine platoo iseloomustab totaalset seostumist. Sellel alal on ligandi kontsentratsioon liiga väike, et radioligandiga sidumiskohale konkureerida. Alumine platoo näitab mittespetsiifilist seostumist ja iseloomustab olukorda, kus märgistamata ligandi kontsentratsioon on suur ning seetõttu seostub retseptoritele eelistatult just märgistamata testligand.



Joonis 4. Radioligandi väljatõrjumiskõver kõikides preparaates ligandi UR-MK259-ga.

K_i väärtused iseloomustavad ligandide võimet inhibeerida radioligandi seostumist retseptorile. Kõik saadud väärtused on väga madalad ja jäävad enam-vähem samasse suurusjärku. Tabelist 2 on näha, et BV M_1 preparaadi puhul on kõrgeim afiinsus ligandi UR-SK-III-49 ($K_i = 0,24 \pm 0,06$) korral, kuid tulemus sarnaneb väga BV M_2 preparaadile. See tähendab, et antud ligand ei ole alatüübi suhtes selektiivne, kuna see seostub mõlemale retseptorile samasuguse afiinsusega. BV M_2 jaoks on parim afiinsus ligandiga UR-SK-II-75, Sf9 M_1 korral NMS-iga ja Sf9 M_2 -l ligandiga UR-SK-III-9. Suurim erinevus afiinsustes on ligandi UR-MK259 korral, M_1 retseptori alatüübi korral on afiinsus üle 10 korra suurem mõlemas retseptorpreparaadis. See näitab, et selle ligandi puhul võime rääkida ka mõningasest selektiivsusest M_2 alatüübi suhtes.

Tabel 2. Katsetes saadud viiruse- ja rakumembraanipreparaatide K_i väärtused koos aritmeetilise keskmise standardhälbega (S.E.M.) erinevate ligandidega.

	$K_i \pm S.E.M$			
	BV M_1	Sf9 M_1	BV M_2	Sf9 M_2
FL-MK342	2,48 ± 0,40	4,31 ± 0,58	0,83 ± 0,21	1,76 ± 0,10
UR-MK259	16,11 ± 0,42	16,22 ± 1,0	1,44 ± 0,12	0,62 ± 0,16
UR-SK-II-75	1,15 ± 0,30	0,54 ± 0,077	0,15 ± 0,0034	1,49 ± 0,91
UR-SK-III-59	1,80 ± 0,042	3,98 ± 0,69	0,54 ± 0,11	0,97 ± 0,22
UR-SK-III-9	1,41 ± 0,043	2,61 ± 0,027	0,28 ± 0,059	0,45 ± 0,075
UR-SK-III-49	0,24 ± 0,062	1,19 ± 0,29	0,27 ± 0,090	1,96 ± 0,31
UR-SK-III-52	0,94 ± 0,36	2,36 ± 1,0	0,70 ± 0,35	2,10 ± 0,50
NMS	0,21 ± 0,018	0,20 ± 0,058	0,77 ± 0,11	0,57 ± 0,14

Ligandide sarnased K_i väärtused võivad ka tuleneda nende sarnasest struktuurist. Kõik ligandid on dibensoasepiini-tüüpi antagonistid, seega nende farmakofoori osa on kõikidel ligandidel samasugune. Kuid on võimalik leida ka mõningaid eripärasid ligandide struktuurides. Ligand UR-MK259, mis on üks väiksemaid ligande antud valikus, seostub M_1 retseptorpreparaatidega kõige halvema afiinsusega. See võib tuleneda sellest, et ligandi struktuuris ei ole aromaatsset tuuma. Kuna kõikidel teistel ligandidel on see olemas, siis sellest võib järeldada, et aromaatses tuumas olemasolu omab tähtsust ligandi seostumisel M_1 retseptoriga. Võrreldes UR-MK-II-75, UR-MK-III-52 ja UR-MK-III-49 struktuure, tuleb välja ka see, et M_2 retseptorile seostudes võib mängida rolli karbonüülrühm. Nende kolme ligandi struktuuris seda funktsionaal rühma ei eksisteeri ja sellisel juhul on ligandi afiinsus halvem.

Üldiselt on näha, et kõik kasutatud ligandid seostuvad antud muskariinsete retseptoritega väga kõrge afiinsusega. Enamus ligandidest seostub mõlema alatüübi korral bakuloviiruste retseptorpreparaatidele paremini, mis annab kinnitust, et neid preparaate võib kasutada radioligandi katsete läbi viimiseks.

KOKKUVÕTE

Käesolevas töös uuriti kahte muskariinse atsetüülkoliini retseptori alatüüpi, M_1 ja M_2 . Selleks sooritati katseid erinevate ligandidega, et uurida nende sidumisomadusi mainitud retseptoritele. Võrdluste tegemiseks kasutati radioaktiivusel põhinevat meetodit, mille käigus leiti erinevaid suurus, mis iseloomustavad ligandi ja retseptori vahelist interaktsiooni kirjeldavaid suurus. Testimiseks kasutati kahte erinevat retseptorpreparaati - bakuloviirusteid ja Sf9 rakumembraanide homogeneaate.

Teoreetilises osas kirjeldati G-valguga seotud retseptoreid ja nende perekonda kuuluvaid muskariinseid atsetüülkoliini retseptoreid. Anti ka ülevaade ligandi sidumiskatsetes, keskendudes radioligandi küllastussidumisele ja väljatõrjumiskatsetele ning mainiti ka Sf9 rakkudel ja bakuloviirustel põhinevat ekspressioonisüsteemi.

Antud töö tulemusena saadi kinnitust, et muskariinsete retseptorite M_1 ja M_2 bakuloviiruseid on võimalik kasutada radioligandi sidumiskatsetes, kuna saadud tulemused olid rakumembraani- ja viiruspreparaatides väga sarnased. Uurides erinevaid uusi ligande, nähti, et need kõik seostuvad muskariinsetele retseptoritele hea afiinsusega ja enamasti ka mitte alatüüp-selektiivselt. Ühe ligandi puhul oli näha mõningast selektiivsust M_2 alatüübi suhtes. Lisaks vaadati ka afiinsuse sõltumist ligandi struktuurist ning leiti, et erinevused ei ole piisavad, et mõjutada seostumist.

SUMMARY

The aim of this study was to describe two muscarinic acetylcholine subtypes, M_1 and M_2 . Experiments were done with different ligands, in order to describe binding to these receptors. A radioactivity-based method was used to define ligand-receptor interactions. Baculoviruses and Sf9 cell line was used as receptor source in the experiments.

An overview of G protein-coupled receptors and muscarinic acetylcholine receptors was given in the literature review. A short insight was also given to ligand binding assays, concentrating on radioligand saturation binding and displacement assays. Expression system based on baculoviruses and Sf9 cells was briefly described as well.

The results on this study confirmed that it is possible to use baculoviruses in radioligand binding assays. The results were very similar in both membrane and baculovirus receptor preparations. All the ligands showed high and non-selective affinity to the muscarinic receptors. However, one ligand showed some type of subtype-based selectivity. The differences of ligand structure were also analysed and it was found that the structures are similar enough that they do not have a strong impact on the affinities.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Cheng Y., Prusoff W. H. (1973) Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* **22**, 3099–3108.
- Christopoulos A., Pierce T. L., Sorman J. L., El-Fakahany E. E. (1998) On the unique binding and activating properties of xanomeline at the M1 muscarinic acetylcholine receptor. *Mol. Pharmacol.* **53**, 1120–1130.
- Contreras-Gómez A., Sánchez-Mirón A., García-Camacho F., Molina-Grima E., Chisti Y. (2014) Protein production using the baculovirus-insect cell expression system. *Biotechnol. Prog.* **30**, 1–18.
- Dale H. H. (1914) The Action of Certain Esters and Ethers of Choline, and Their Relation to Muscarine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **6**, 147–190.
- Davenport A. P., Russell F. D. (1996) *Radioligand Binding Assays: Theory and Practice*.
- Davis C. N., Bradley S. R., Schiffer H. H., Friberg M., Koch K., Tolf B.-R., Bonhaus D. W., Lameh J. (2009) Differential regulation of muscarinic M1 receptors by orthosteric and allosteric ligands. *BMC Pharmacol.* **9**, 14.
- Enna S. J., Bylund D. B., Science (Firm) E. (2008) *XPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*. Elsevier.
- Felder C. C., Bymaster F. P., Ward J., DeLapp N. (2000) Therapeutic Opportunities for Muscarinic Receptors in the Central Nervous System. *J. Med. Chem.* **43**, 4333–4353.
- Ferguson S. S., Caron M. G. (1998) G protein-coupled receptor adaptation mechanisms. *Semin. Cell Dev. Biol.* **9**, 119–127.
- Ferretti M., Fabbiano C., Bari M. D., Conte C., Castigli E., Sciacaluga M., Ponti D., et al. (2013) M2 receptor activation inhibits cell cycle progression and survival in human glioblastoma cells. *J. Cell. Mol. Med.* **17**, 552–566.
- Haga K., Kruse A. C., Asada H., Yurugi-Kobayashi T., Shiroishi M., Zhang C., Weis W. I., et al. (2012) Structure of the human M2 muscarinic acetylcholine receptor bound to an antagonist. *Nature* **482**, 547–551.
- Hein P., Michel M. C., Leineweber K., Wieland T., Wettschureck N., Offermanns S. (2005) Receptor and Binding Studies, in *Pract. Methods Cardiovasc. Res.*, pp. 723–783. Springer, Berlin, Heidelberg.

- Hulme E. C., Trevethick M. A. (2010) Ligand binding assays at equilibrium: validation and interpretation. *Br. J. Pharmacol.* **161**, 1219–1237.
- Jakubík J., Bacáková L., El-Fakahany E. E., Tucek S. (1997) Positive cooperativity of acetylcholine and other agonists with allosteric ligands on muscarinic acetylcholine receptors. *Mol. Pharmacol.* **52**, 172–179.
- Jiang S., Li Y., Zhang C., Zhao Y., Bu G., Xu H., Zhang Y.-W. (2014) M1 muscarinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease. *Neurosci. Bull.* **30**, 295–307.
- Khattar S. K., Bora R. S., Priyadarsiny P., Gupta D., Khanna A., Narayanan K. L., Babu V., Chugh A., Saini K. S. (2006) High Level Stable Expression of Pharmacologically Active Human M1–M5 Muscarinic Receptor Subtypes in Mammalian Cells. *Biotechnol. Lett.* **28**, 121–129.
- Kilk A. (2007) Signaali ülekann eukarüootses rakus. 39.
- Kruse A. C., Hu J., Pan A. C., Arlow D. H., Rosenbaum D. M., Rosemond E., Green H. F., et al. (2012) Structure and dynamics of the M3 muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* **482**, 552–556.
- Kruse A. C., Kobilka B. K., Gautam D., Sexton P. M., Christopoulos A., Wess J. (2014) Muscarinic acetylcholine receptors: novel opportunities for drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.* **13**, 549–560.
- Laasfeld T., Kopanchuk S., Rinken A. (2017) Image-based cell-size estimation for baculovirus quantification. *BioTechniques* **63**, 161–168.
- Lazareno S., Birdsall N. (1995) Detection, Quantitation, and Verification of Allosteric Interactions of Agents with Labeled and Unlabeled Ligands at G-Protein-Coupled Receptors - Interactions of Strychnine and Acetylcholine at Muscarinic Receptors. *Mol. Pharmacol.* **48**, 362–378.
- Lefkowitz R. J., Roth J., Pastan I. (1970) Radioreceptor assay of adrenocorticotrophic hormone: new approach to assay of polypeptide hormones in plasma. *Science* **170**, 633–635.
- Lem J. (1998) Diseases of G-Protein-Coupled Signal Transduction Pathways: The Mammalian Visual System as a Model. *Semin. Neurosci.* **9**, 232–239.
- 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.

- Mirza N. R., Peters D., Sparks R. G. (2003) Xanomeline and the antipsychotic potential of muscarinic receptor subtype selective agonists. *CNS Drug Rev.* **9**, 159–186.
- Neer E. J. (1995) Heterotrimeric G proteins: Organizers of transmembrane signals. *Cell* **80**, 249.
- Nelson D., Cox M. (2005) Lehninger principles of biochemistry (4th ed.): Nelson, D., and Cox, M. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **33**, 74–75.
- Nelson D. L., Lehninger A. L., Cox M. M. (2005) *Lehninger principles of biochemistry*. New York : W.H. Freeman.
- Paton W. D. M., Rang H. P. (1965) The uptake of atropine and related drugs by intestinal smooth muscle of the guinea-pig in relation to acetylcholine receptors. *Proc R Soc Lond B* **163**, 1–44.
- Pedretti A., Vistoli G., Marconi C., Testa B. (2006) Muscarinic receptors: A comparative analysis of structural features and binding modes through homology modelling and molecular docking. *Chem. Biodivers.* **3**, 481–501.
- Schneider E. H., Seifert R. (2010) Sf9 cells: a versatile model system to investigate the pharmacological properties of G protein-coupled receptors. *Pharmacol. Ther.* **128**, 387–418.
- Suga H., Haga T. (2007) Ligand screening system using fusion proteins of G protein-coupled receptors with G protein alpha subunits. *Neurochem. Int.* **51**, 140–164.
- Tautermann C. S. (2014) GPCR structures in drug design, emerging opportunities with new structures. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **24**, 4073–4079.
- Veiksina S., Kopanchuk S., Rinken A. (2014) Budded baculoviruses as a tool for a homogeneous fluorescence anisotropy-based assay of ligand binding to G protein-coupled receptors: The case of melanocortin 4 receptors. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1838**, 372–381.
- Wess J., Eglen R. M., Gautam D. (2007) Muscarinic acetylcholine receptors: Mutant mice provide new insights for drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.* **6**, 721–733.
- Zhang P. F., Klutch M., Muller J., Marcus-Sekura C. J. (1994) Susceptibility of the Sf9 insect cell line to infection with adventitious viruses. *Biol. J. Int. Assoc. Biol. Stand.* **22**, 205–213.
- Zhang R., Xie X. (2012) Tools for GPCR drug discovery. *Acta Pharmacol. Sin.* **33**, 372–384.

TÄNUAVALDUSED

Kõige esimesena soovin ma tänada enda fantastilist lõputöö juhendajat Anni Allikalt, kelle kannatlikkus, abivalmidus ja rõõmsameelsus mind alati innustavad. Anni on olnud alati olemas, kui ma milleski aru ei saa või midagi teha ei oska. Suured tänud toetava suhtumise ja ettepanekute eest!

Mainimata ei saa jätta ka professor Ago Rinke, kes mind üle üldse oli nõus bioorgaanilise keemia õppetooli vastu võtma. Ma olen väga õnnelik, et ma just teie töörühmaga liituda sain ja et mul oli võimalus teie tegemistega lähedalt tutvuda. Lisaks tahaks tänada kõiki teisi töörühmas olevaid inimesi, kes oma nõu ja jõuga vajadusel alati abiks olid.

Siirad tänusõnad kuuluvad ka mu perele ja lähedastele sõpradele, kes mind alati inspireerinud on. Aitäh, et minusse usute ja alati toeks olete! Soovin tänada ka oma koeri, kes rasketel hetkedel alati lohutust pakuvad. Samuti soovin tänada enda saatusekaaslast, kes mind motiveerisid ja kogu õppeprotsessi toredamaks ja meeldejäavamaks tegid. Eriline tänu ka Piretile, kes mulle lahkelt keelelist nõu andis.

Aitäh Teile kõigile!

INFOLEHT

Muskariinsete atsetüülkoliini retseptorite M₁ ja M₂ iseloomustamine radioligandi sidumiskatsetes

Radioligandi ³H-NMS sidumiskatsetes võrreldi ja iseloomustati muskariinsete retseptorite alatüpe M₁ ja M₂. Küllastussidumiskatsed näitasid, et nii rakumembraan- kui ka viiruspreparaadid sobivad antud katseteks ning et mõlemad alatüübid seostuvad tugevalt radioligandiga. Väljatõrjumiskatsetes määrati erinevate uute ligandide afiinsused radioligandi sidumiskohtadele ning uuriti, kas leidub ka selektiivsust mõne alatüübi suhtes.

Märksõnad: muskariinsete atsetüülkoliini retseptorid, M₁, M₂, mAChR, radioligandi sidumiskatse, ligand

Characterisation of two muscarinic acetylcholine receptor subtypes M₁ and M₂ in radioligand binding assay

Two subtypes of muscarinic receptors were compared and described using radioligand ³H-NMS binding assay. Saturation binding assay showed that both baculovirus and Sf9 cell based receptor preparations are reliable in these experiments and that both subtypes interact strongly with the radioligand. Different ligands were tested in displacement assay to see the affinity to binding sites and if any type of subtype selectivity was found.

Keywords: muscarinic acetylcholine receptor, M₁, M₂, mAChR, radioligand binding assay, ligand

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina,

Mari-Liis Tsernant,

(autori nimi)

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

**MUSKARIINSETE ATSETÜÜLKOLIINI RETSEPTORITE M_1 JA M_2
ISELOOMUSTAMINE RADIOLIGANDI SIDUMISKATSETES,**

(lõputöö pealkiri)

mille juhendaja on

Anni Allikalt,

(juhendaja nimi)

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **06.06.2021** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus **30.05.2018**