

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Biotekniikka

2011

Hanna Laine

OKTOPAMIINIRESEPTORISOLU- LINJAT

– Solulinjojen kartoitus ja LANCE® cAMP-menetel-
män optimointi



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Hanna Laine

OKTOPAMIINIRESEPTORISOLULINJAT – SOLU- LINJOJEN KARTOITUS JA LANCE® CAMP-ME- NETELMÄN OPTIMOINTI

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli oppiaineen laboratoriossa kehitettyjen oktopamiinireseptorisolulinjojen ominaisuuksien kartoitus ja cAMP-määritysmenetelmän optimiolosuhteiden määrittely. Oktopamiinireseptorien geenit oli transfektoitu CHO-soluihin, jotka oli täten saatu ilmentämään viittä eri oktopamiinireseptoria, alatyyppejä R0, R1, R2, R3 ja R4. Reseptorigeenit oli eristetty merirokosta (*Balanus improvisus*), joka on meressä elävä niveljalkainen eläin. Jokaisesta oktopamiinireseptoria ilmentävästä solulinjasta oli valmistettu kolme rinnakkaista linjaa. Lisäksi oli samalla tavalla valmistettu solulinjat, jotka tuottivat fuusioproteiineja, joissa reseptoriin oli liitetty fluoresoiva merkkiaine, GFP-peptidi.

Reseptorien tutkimus suoritettiin reseptorien toimintaa mittaavalla menetelmällä PerkinElmerin LANCE® cAMP-kittiä käyttäen, koska oktopamiinireseptoreille ei ole sopivaa radioligandia, jolla reseptorien määrää ja farmakologisia ominaisuuksia voitaisiin kätevästi tutkia. LANCE-menetelmä perustuu cAMP:n pitoisuuden mittaamiseen aikaerotteisella fluoresenssilla. cAMP-menetelmä optimoitiin solumäärän ja stimulaatioajan suhteen. Määritykset tehtiin elävillä soluilla. Tärkeänä osana työtä oli huolehtia solujen elinvoimaisuudesta hoitamalla soluja aktiivisesti koko tutkimuksen ajan.

cAMP-metelmällä pystyttiin hyvin karakterisoimaan oktopamiinireseptorisolulinjat ja löytämään niistä parhaimman vasteen tuottavat alapopulaatiot. cAMP-menetelmä osoittautui luotettavaksi, toistettavaksi ja käyttökelpoiseksi niille reseptoreille, joiden kytketyminen adenylaattisyklaasin aktiivisuuden säätelyyn oli tehokas CHO-soluissa.

Tämä opinnäytetyö on tehty Turun yliopiston lääketieteellisessä tiedekunnassa Biolääketieteen laitoksen farmakologian, lääkekehityksen ja lääkehoidon oppiaineessa Mika Scheininin tutkimusryhmässä.

ASIASANAT:

LANCE cAMP, CHO-solu, oktopamiinireseptori, saturaatio, [³H]RS79948-197

Hanna Laine

OCTOPAMINE RECEPTOR CELL LINES - CHARACTERIZING CELL LINES AND OPTIMIZING THE LANCE cAMP-METHOD

The purpose of this work was to characterize cell lines expressing recombinant octopamine receptors and to determine the optimal assay conditions for the employed Lance cAMP kit. Octopamine receptor genes had been transfected into CHO cells for production of five different octopamine receptor subtypes, R0, R1, R2, R3 and R4. The receptor genes had been isolated from a marine arthropod, the barnacle *Balanus improvisus*. Three parallel cell lines had been made for each receptor. In addition, another set of cell lines expressed receptors tagged with a fluorescent marker, GFP.

The work was performed using a functional receptor activation assay based on PerkinElmer's LANCE® cAMP kit, because no suitable radioligand exists for the characterization of octopamine receptors. The cAMP assay is based on measurement of time-resolved fluorescence resonance energy transfer. The cAMP assay was optimized for cell number and stimulation time. The assays were performed with living cells. An important part of this work was to take care of the cells by actively culturing them during the project.

With the cAMP assay, it was possible to characterize octopamine receptor cell lines and to find which of the cell lines produced the best responses. The cAMP assay emerged as reliable and reproducible for those cell lines where the receptors are efficiently coupled to regulation of adenylyl cyclase activity.

This thesis project has been carried out at the University of Turku, Faculty of Medicine, Institute of Biomedicine, in its Department of Pharmacology, Drug Development and Therapeutics, in the research group of Professor Mika Scheinin.

KEYWORDS:

LANCE cAMP, CHO-cell, octopamine receptors, saturation, [³H]RS79948-197

SISÄLTÖ

SANASTOA JA LYHENTEITÄ	7
1 JOHDANTO	8
2 TAUSTAA	9
3 KIRJALLINEN OSIO	11
3.1 G-proteiinikytkentäinen signaalinvälitys	11
3.1.1 G-proteiinikytkentäiset reseptorit	12
3.1.2 G-proteiinit	13
3.1.3 Adenylaattisyklaasi ja cAMP	15
3.2 Soluviljely	16
3.3 Proteiinimääritys	17
3.4 Sitoutumisominaisuuksien määrittäminen	18
3.4.1 Saturaatiokoe	18
3.4.2 Tuikelaskenta	20
3.5 cAMP:n määrittäminen	21
3.5.1 Lance® cAMP	21
3.5.2 Victor	22
4 KOKEELLINEN OSA	23
4.1 Liuosten valmistaminen	23
4.2 Soluviljely	23
4.2.1 Perussoluviljely	24
4.2.2 Kolmitasopullokasvatus	25
4.2.3 Solujen irrotus cAMP-määrityksiin	26
4.3 Membraanien eristäminen	27
4.4 Proteiinimääritys	28
4.5 Saturaatiokokeet	28
4.6 cAMP määräitys	30
4.6.1 Laimennosten teko	30
4.6.2 Solumäärän laskeminen	33
4.6.3 cAMP-määritys	34
4.6.4 Solumäärä	35
4.6.5 Stimulaatioaika	36

5 TULOKSET	38
5.1 Proteiinimääritys ja saturaatiokokeet	38
5.2 Solumäärän vaikutus cAMP-määritykseen	38
5.3 Solulinjojen seulonta	40
5.4 Stimulaatioajan vaikutus cAMP-määrään	41
5.5 GFP-solulinjojen seulonta	43
6 JOHTOPÄÄTÖKSET	45
LÄHTEET	46

LIITTEET

Liite 1. Reagenssit
Liite 2. Liuosten valmistaminen
Liite 3. cAMP menetelmän perusohje
Liite 4. proteiinimäärityksen tulokset
Liite 5. Saturaatiokokeen tulokset
Liite 6. Solumäärätestauksen esimerkki taulukko
Liite 7. Solulinjan seulonta taulukko

KUVAT

Kuva 1. G-proteiinikytkentäisen reseptorin rakenne.	12
Kuva 2. G-proteiinisyklin ja adenyylaattisyklaasin aktivaatio.	14
Kuva 3. Adenyylaattisyklaasin reaktio.	15
Kuva 4. CHO-solulinja, joka expressoi oktopamiinireseptori R4:ää.	17
Kuva 5. Reseptorin leimaaminen.	18
Kuva 6. Saturaatiokuvaaja.	19
Kuva 7. Tuikelaskenta.	20
Kuva 8. Lance cAMP menetelmän periaate.	21
Kuva 9. Kolmitasopullo	26
Kuva 10. Bürker-kammion laskenta-alue.	33
Kuva 11. Solumäärän vaikutus cAMP:hen.	39
Kuva 12. Solulinjan seulonta	40
Kuva 13. Stimulaatioajan vaikutus CHOR0-2 ja CHOR1-3.	41
Kuva 14. Stimulaatioajan vaikutus CHOR2-2, CHOR3-1 ja CHOR4-2.	42
Kuva 15. GFP-linjojen parhaimman vaihtoehdon valitseminen.	44

TAULUKOT

Taulukko 1. G-proteiinit ja niiden α -alalyksiköt.	13
Taulukko 2. BSA-standardit.	28
Taulukko 3. Radioligandi laimennokset.	29
Taulukko 4. Stimulaatiopuskurin valmistus viidelle eri tilavuudelle.	30

Taulukko 5. Standardien valmistus.	31
Taulukko 6. Forskoliinilaimennoksien valmistus.	31
Taulukko 7. Agonistilaimennoksien valmistus.	32
Taulukko 8. Pipetointikaavio 96-kuoppalevyille.	34
Taulukko 9. Määritysliuoksen valmistus.	35
Taulukko 10. Solumäärän pipetointikaavio 96-kuoppalevyille.	36
Taulukko 11. Stimulaatioajan määrittäminen.	37
Taulukko 12. Määrityspuskurin seisotusajan vaikutus.	43

SANASTOA JA LYHENTEITÄ

AC	Adenylyl cyclase, adenylaattisyklaasi
ATP	Adenosine-5'-triphosphate, adenosiiini-5'-trifosfaatti
Affiniteettivakio	Suure, joka kuvaa lääkeaineen hanakkuutta sitoutua reseptoriin
Agonisti	Kemiallinen yhdiste, joka aktivoi reseptorin
Antagonisti	Aine, joka salpaa reseptorin ja estää agonistin vaikutuksen
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate, syklinen adenosiinimono-fosfaatti
Ekspressio	Ilmentäminen
FCS	Fetal calf serum, naudan sikiön seerumi
Fosforylaatio	Fosfaattitähteen liittäminen kohdeproteiiniin; voi lisätä tai vähentää sen biologista aktiivisuutta
FSK	Forskoliini
GDP	Guanosine diphosphate, guanosiinidifosfaatti
GTP	Guanosine-5'-triphosphate, guanosiini-5'-trifosfaatti
Glykosylaatio	Sokeritähneiden liittäminen kohdeproteiiniin
HBSS	Hanks' buffered salt solution, Hanksin suolaliuos
Hydrolysoituminen	Kemiallinen reaktio, jossa yhdiste hajoaa
In vivo	Elävässä organismissa tehtyä tutkimus
Ligandi	Solun ulkoinen aine, joka sitoutuu reseptoriin rakenteensa perusteella
Membraani	Solukalvo
PBS	Phosphate-buffered saline, fosfaattipuskuroitu keittosuolaliuos
PDE	Phosphodiesterase, fosfodiesteriini
Radioligandi	Ligandi, joka on leimattu radioaktiivisella aineella
Transfektio	Menetelmä, jossa vieras DNA viedään kohdesoluihin ilmentämistä varten

1 JOHDANTO

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli 30 oktopamiinireseptorisolulinjan kartoitus ja työssä käytetyn syklisen adenosiinimonofosfaatin määritysmenetelmän (cAMP) optimiolosuhteiden määrittely. Oktopamiinireseptorisolulinjojen kartoittamisessa mitattiin solunsisäistä cAMP:n pitoisuutta. Työssä käytettiin kaupallista LANCE® cAMP -kittiä (PerkinElmer). Työssä käytetyt CHO-solulinjat ilmentävät viittä eri oktopamiinireseptoria, R0, R1, R2, R3 ja R4. Reseptorigeenit oli eristetty meressä elävästä niveljalkaisesta eläimestä, merirokosta (*Balanus improvisus*). Jokaisesta oktopamiinireseptoria ilmentävästä solulinjasta oli valmistettu kolme rinnakkaista linjaa (1-3).

cAMP-menetelmä optimoitiin solumäärän ja stimulaatioajan suhteen. Määritykset tehtiin elävillä soluilla. Tärkeänä osana työtä oli huolehtia solujen elinvoimaisuudesta hoitamalla soluja aktiivisesti koko tutkimuksen ajan.

Työ on tehty Turun yliopiston lääketieteellisessä tiedekunnassa Biolääketieteen laitoksella farmakologian, lääkekehityksen ja lääkehoidon oppiaineessa. Kiitän professori Mika Scheininiä mahdollisuudesta tehdä opinnäytetyö hänen tutkimusryhmässään. Haluan kiittää myös Katariina Pohjanoksa työn ohjauksesta sekä Ulla Uotia työssä avustamisesta.

2 TAUSTAA

Niveljalkaisiin kuuluvat *Balanus improvisus* ja *Balanus amphitrite* -merirokot ovat alusten pohjaan kiinnittyvistä merieliöistä ongelmallisimpia. *Balanus improvisus* on laji, joka aiheuttaa paljon ongelmia mm. Itämerellä, kun taas *Balanus amphitrite* on trooppisten vesien ongelma. Merirokko on levinnyt Itämereen 1840-luvulla Pohjois-Amerikasta todennäköisesti vesiliikenteen mukana. Merirokko kasvaa kovilla alustoilla ja on aikanaan muuttanut voimakkaasti rannikon pohjien yhteisörakenteita. Merirokko kiinnittyy alustaansa superliimasäikeillä, jotka koostuvat vettä hylkivistä proteiineista. Merirokko tarvitsee menestyäkseen veden suolapitoisuudeksi 2-3 promillea.^{6,14,16}

Nykyisin laji on hyvin yleinen ja aiheuttaa riesaa kiinnittymällä alusten pohjiin. Kiinnittyminen tapahtuu yleensä heinä-elokuussa. Laivaliikenteen kustannukset kasvavat rokkojen kiinnittyessä pohjaan ja virtausvastuksen lisääntyessä, polttoainekulut nousevat jopa 40 prosenttia ja laivojen rungot on puhdistettava, mikä tietää laivan seisomista telakalla. Merirokot myös tukkivat alusten rungon läpivientejä, vaikuttavat ajettavuuteen ja voivat mm. estää potkuriakselin vesivoitelun. Merirokkojen poistaminen saattaa myös vahingoittaa veneen pohjaa.^{14,15}

Markkinoilla olevat kiinnittymisenestomaalit sisältävät myrkyllisiä raskasmetalleja, jotka estävät merirokon toukan kiinnittymisen aluksen pohjaan. Raskasmetalleilla on negatiivisia vaikutuksia meriympäristölle, joten uusille kiinnittymisenestoaineille on tarve. α_2 -adrenoreseptoreja aktivoiva eläinlääke medetomidiini pystyy estämään merirokon (*B. improvisus* ja *B. amphitrite*) kiinnittymisprosessia. Tutkimuksessa, jossa muovipaneeli oli pinnoitettu medetomidiinia sisältävällä akrylaattipolymeerillä, aine esti merirokon kiinnittymistä 96 prosentilla neljän viikon vedessä olon jälkeen. Medetomidiini on α_2 -adrenoseptorien agonisti, jota käytetään rauhoittavana aineena eläinlääketieteessä. Medetomi-

diinin estomekanismia merirokon kiinnittymisessä ei täysin tunneta, mutta sen oletetaan toimivan G- proteiinikytkentäisten oktopamiinireseptorien kautta.^{6,14,15}

Jotta voitaisiin oppia lisää merirokon oktopamiinireseptorien toiminnasta ja niiden merkityksestä medetomidiniin vaikutuksen kohteena, tutkijat Göteborgin ja Turun yliopistoissa ovat kloonanneet viisi oktopamiinireseptoreja koodittavaa geeniä tästä kiinnittyvästä lajista. Neljä näistä reseptoreista kuuluu β -kaltaiseen oktopamiinireseptorien alaperheseen ja yksi kuuluu α -kaltaiseen oktopamiinireseptorien alaperheseen.⁶

3 KIRJALLINEN OSIO

3.1 G-proteiinikytkentäinen signaalinvälitys

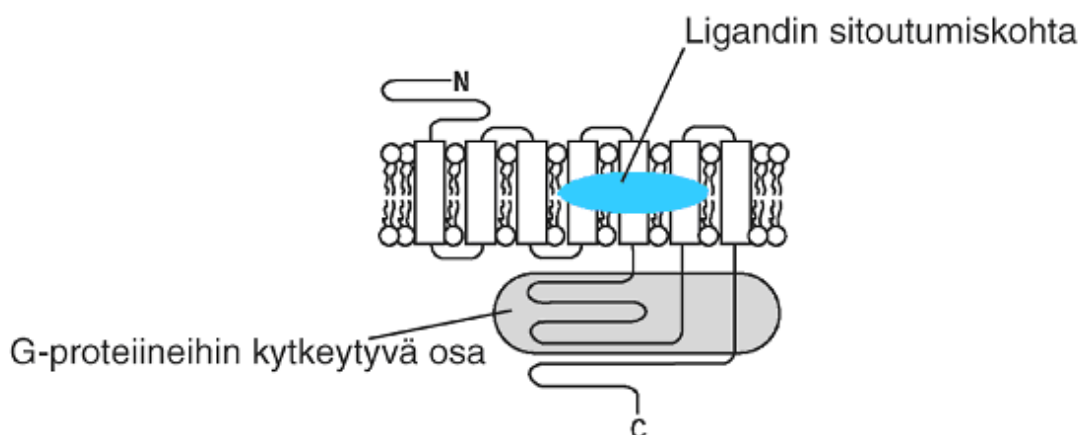
Reseptori on solun erikoistunut proteiinimolekyyli, joka aktivoituessaan käynnistää siihen kytkeytyvän solun fysiologisen signaalinvälitysmekanismiin. Reseptoreita aktivoivat elimistön omat viestimolekyylit kuten hormonit, hermoston välittäjäaineet, kasvutekijät ja sytokiinit. Useimmat lääkeaineet vaikuttavat elimistössä sitoutumalla esimerkiksi viestimolekyylien reseptoreihin joko agonisteina aktivoiden niitä tai antagonistina estäen niiden aktivoitumista. Reseptorit jaetaan neljään erilaiseen rakenteelliseen pääryhmään: ionikanavareseptorit, G-proteiinikytkentäiset reseptorit, entsyymireseptorit ja tumareseptorit.⁴

G-proteiinikytkentäiset reseptorit sijaitsevat solukalvolla ja ne välittävät vasteensa epäsuorasti entsyymin tai ionikanavan toiminnan säätelyn kautta. Stimuloitumisen jälkeen ne aiheuttavat yleensä vasteen muutamassa sekunnissa. G-proteiinikytkentäisten reseptorien geeniperheeseen kuuluu useita satoja reseptorigenejä. Geeniperhe voidaan jakaa useisiin alaperheisiin reseptorien rakenteiden ja ligandien mukaan.⁴

Reseptorit ja G-proteiinit muodostavat solukalvossa sijaitsevan signaalinvälitysketjun alkupään. Solukalvossa sijaitsevat efektorit eli vasteenvälittäjät muuntavat reseptorien välittämän viestin sellaiseen muotoon, että se voi saavuttaa solun kaikki osat. Biokemialliset toisiolähetit kuljettavat viestejä solun sisällä. Mekanismi vahvistaa saapuneen signaalin moninkertaiseksi, sillä yhden ligandimolekyylin reseptorille tuoma viesti etenee nyt tuhansien toisiolähehtimolekyylien kuljettamana.⁴

3.1.1 G-proteiinikytkentäiset reseptorit

Hamsterin β_2 -adrenerginen reseptori oli ensimmäinen G-proteiinikytkentäinen reseptori, jonka aminohappojärjestys selvitettiin kloonamalla sitä koodittava geeni (v. 1986) ja jonka proteiinirakenteesta voitiin ryhtyä esittämään arveluja. Kaikille G-proteiinikytkentäisille reseptoreille yhteisessä rakennemallissa reseptoripolypeptidi muodostaa seitsemän solukalvon läpäisevää jaksoa, jonka alueelle ligandit kiinnittyvät. Solukalvon läpäisevät jaksot ovat kytkeytyneenä toisiinsa kolmella solun ulkopuolella ja kolmella solun sisäpuolella jäävällä silmukalla. Kuvassa 1 on G-proteiinikytkentäisen reseptorin rakenne. Kuvan yläosassa on solun ulkopuolella oleva reseptorin N-terminaalinen pää ja alhaalla solun sisäpuolella oleva reseptorin C-terminaalinen pää. Suorakaiteen muotoiset osat koostuvat noin 20 aminohaposta, jotka muodostavat solukalvon sisään sijoittuvia α -kierteisiä peptidijaksoja.^{4,21}



Kuva 1. G-proteiinikytkentäisen reseptorin rakenne kaavamaisesti esitettynä.⁴

3.1.2 G-proteiinit

Reseptorin solunsisäisten osien aminohappokoostumus ja rakenne määräävät reseptorin vaikutuksen kohdistumisen erilaisiin G-proteiineihin. G-proteiineja tunnetaan parisenkymmentä eri tyyppiä, siis paljon vähemmän kuin reseptoreja. Monet eri reseptorit vaikuttavatkin samojen G-proteiinien kautta, esimerkiksi adenylaattisyklaasia (AC) aktivoiva G_s -proteiini lisää cAMP:n tuotantoa kun taas $G_{i/o}$ -proteiini inhiboi cAMP:n muodostusta ATP:stä. Toisaalta sama reseptori voi myös kytkeytyä useampaan kuin yhteen G-proteiiniin ja aiheuttaa erilaisia biokemiallisia vasteita toimintaympäristönsä mukaan.^{4,17}

G-proteiinit koostuvat kolmesta alayksiköistä, α , β ja γ , joista α -alayksikön rakenne ja toiminta tunnetaan parhaiten. α -alayksikön aminohapporakenteen perusteella G-proteiinit voidaan jakaa neljään pääryhmään, G_s (stimuloiva), $G_{i/o}$ (inhiboiva/other = muu), G_q ja G_{12} (Taulukko 1). Kaikki α -alayksiköt sitovat guaniinukleotideja GDP:ta ja GTP:ta, ja ne kykenevät hydrolysoimaan sitoutuneen GTP:n GDP:ksi.⁴

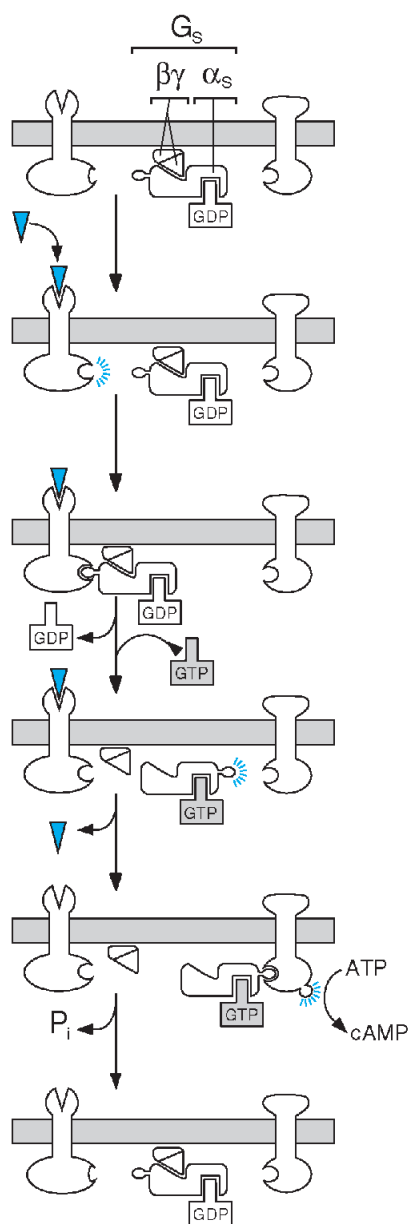
Taulukko 1. G-proteiinit ja niiden α -alayksiköt.

α -Alayksikkö	Vasteenvälittäjä*	Esimerkkejä reseptoreista**
α_s	Adenylaattisyklaasi (↑) Kalsiumkanava (↑)	β -adrenergiset, histamiini H_2 , LH, TSH, glukagoni, dopamiini (D_1 , D_2), 5-HT ₄ , 5HT ₆ , 5-HT ₇ , vasopressiini V_2 , adenosini A_2
α_{off}	Adenylaattisyklaasi (↑)	Hajureseptorit (satoja)
α_i	cGMP-fosfodiesteraasi (↑)	Rodopsiini
α_1	Adenylaattisyklaasi (↓) Kaliumkanava (↑) Kalsiumkanava (↓)	α_2 -adrenergiset, opioidireseptorit, 5HT ₁ , dopamiini (D_{2-4}), asetyylikoliini M_2 ja M_4 , monet neuropeptidit
α_o	Kaliumkanava (↑) Kalsiumkanava (↓)	Kuten α_1
$\alpha_{q/11}$	Fosfolipaasi C (↑)	Asetyylikoliini M_1 ja M_3 , α_1 -adrenergiset, 5-HT ₂ , monet peptidit
α_{12}	Tuntematon	Trombiini

*Nuolet viittaavat G-proteiinien vaikutuksiin, jotka voivat joko lisätä (↑) tai vähentää (↓) vasteenvälittäjien aktiivisuutta.

**Reseptorit voivat kytkeytyä useampaan kuin yhteen G-proteiiniin

Kuvassa 2 esitetään G-proteiinin ja adenyylaattisyklaasin aktivaatio. Aktivoitunut reseptori sitoo G_s -proteiinin, jolloin siinä oleva guaniininukleotidin sitoutumiskohta vapauttaa GDP-molekyylin ja sitoo GTP-molekyylin. G-proteiinin α_s -alayksikkö irta-aa ja α_s -GTP-kompleksi sitoutuu vastevälittäjään, AC:iin, ja aktivoi sen, jolloin cAMP:n muodostuminen lisääntyy. G_s :n GTPaasi-entsyymiaktiivisuus hydrolysoi GTP:n GDP:ksi, jolloin α -GDP irta-aa vastevälittäjästä ja liittyy uudelleen $\beta\gamma$ -dimeeriin, jolloin G-proteiini palautuu ei-aktiiviseen muotoon ja reseptori voi aloittaa uuden syklin.⁴

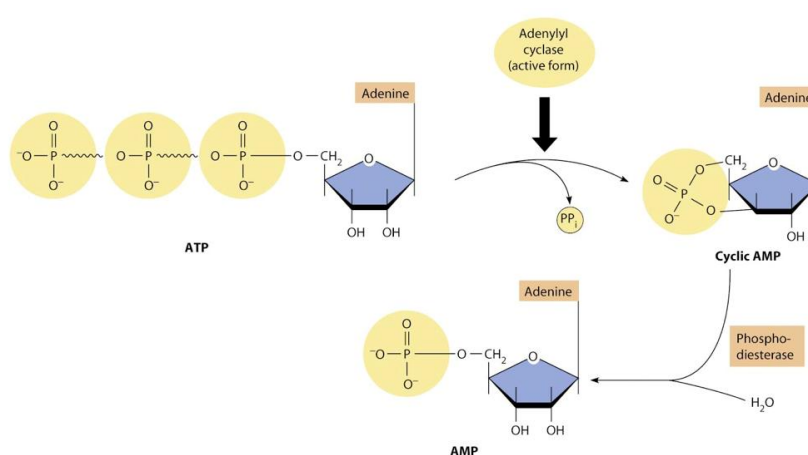


Kuva 2. G-proteiinisyyklin ja adenyylaattisyklaasin aktivaatio.⁴

3.1.3 Adenylaattisyklaasi ja cAMP

AC on klassinen esimerkki reseptoreihin liittyvästä efektorimekanismista. Monet reseptorit aktivoivat kohdesolujen AC-aktiivisuutta G_s -proteiinien kautta ja lisäävät cAMP:n tuotantoa soluissa. G_i -proteiinien kautta välittyvä reseptoriaktivaatio puolestaan vähentää cAMP:n tuotantoa soluissa.⁴

cAMP:n keskeisen merkityksen havaitseminen β -adrenergisten reseptorien biokemiallisena toisilähehtinä antoi 1950-luvun lopussa ratkaisevan sysäyksen biokemiallisen farmakologian kehitykselle. Solukalvojen adenylaattisyklaasit, joita nykyisin tunnetaan yhdeksän isoentsyymiä, katalysoivat elimistön kaikissa soluissa cAMP:n muodostusta ATP:sta. Kuvassa 3 esitetään cAMP muodostuminen ATP:stä AC:n avulla. Fosfodiesterasit (PDE) hydrolysoivat cAMP:n inaktiiviseksi 5'-AMP:ksi. Monet hormonit, välittäjäaineet ja lääkeaineet säätelevät solujen cAMP-pitoisuuksia aktivoimalla tai estämällä AC:n toimintaa tai estämällä PDE:n katalysoimaa cAMP:n pilkkoutumista. PDE-aktiivisuutta saadaan estettyä käyttämällä PDE:n inhibiittoria, esim. 3-isobutyryli-1-metyyliksantiinia (IBMX). cAMP:n monet vaikutukset solujen toimintaan välittyvät proteiinien fosforylaation kautta. Proteiinikinaasi A katalysoi kohdeproteiinien fosforylaatiota. Monien reseptorien fosforylaatio estää niiden kykyä aiheuttaa G-proteiinien aktivaatiota ja toisilähehtivasteen syntyä.⁴



Kuva 3. Adenylaattisyklaasin katalysoimassa reaktiossa ATP:sta syntyy cAMP, jonka fosfodiesterasit hydrolysoivat AMP:ksi.²¹

3.2 Soluviljely

Soluviljelytekniikoiden avulla voidaan tutkia soluja ja niiden toimintoja tarkasti kontrolloiduissa olosuhteissa. Erilaisia eläin-, kasvi- ja bakteerisoluja voidaan kasvattaa *in vitro*-olosuhteissa. Soluja voidaan kasvattaa joko suspensiossa tai kiinteällä alustalla. Suspensiossa voidaan kasvattaa suurempia solumääriä, mutta etenkin monet eläinsolulinjat eivät kykene kasvamaan irti alustasta vaan tarvitsevat kiinteän alustan, jolla kasvaa. Soluviljelyolosuhteissa kasvaakseen solut tarvitsevat tarkasti säädellyn ympäristön ravintoaineiden, lämpötilan, hiilidioksidin sekä pH-arvon suhteen.^{5,7,9}

Eläinsoluja viljeltäessä käytetään alustana lasipintoja tai käsiteltyä muovia, jonka pinnalla on negatiivisesti varautuneita ryhmiä (esim. SO_3^{2-}). Viljelmässä solut erittävät kollageenia ja muita soluväliaineen komponentteja, jotka sitoutuvat viljelyastian pintaan, ja toimivat ikään kuin siltana solujen ja astian välillä. Hyvissä oloissa solukko täyttää nopeasti koko käytettävissä olevan pinnan, ennen kuin normaaleille soluille tyypillinen kasvun tiheys- eli kosketusinhibitio pysäyttää kasvun.^{7,9}

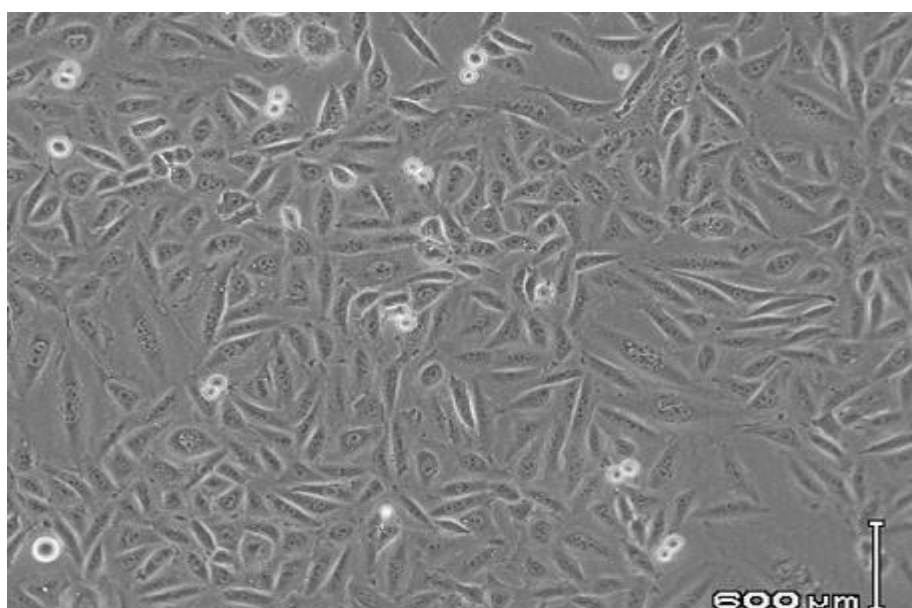
Solulinjalla tarkoitetaan jatkuvasti jakautuvaa solupopulaatiota, jonka elinikä on rajaton. Transfektoituneet solulinjat soveltuvat hyvin tutkimusmateriaaliksi niiden nopean kasvun ja kuolemattomuuden vuoksi.^{7,9}

Kiinalaisen hamsterin munasarjan solut (CHO-solut) ovat yleisin käytetty eläinsolulinja transfektioihin ja rekombinanttiproteiinien tuotantoon. CHO-solut tuottavat vakaata ja virheetöntä glykosylaatiota. CHO-solut pystyvät tuottamaan luontaisella tavalla muokattuja proteiinituotteita ja voivat siten toimia malleina *in vivo*, elävissä eläimissä tuotettujen proteiinien tutkimukselle.¹⁸

Työssäni käytin CHO-soluja, joihin oli valmiiksi transfektoitu viittä erilaista oktopamiinireseptoria koodittavat merirokon geenit (CHOR0, CHOR1, CHOR2, CHOR3, CHOR4). Yksi solulinjoista ilmensi α -kaltaista oktopamiinireseptoria (CHOR0) ja neljä muuta solulinjaa ilmensivät kukin yhtä neljästä β -kaltaisesta oktopamiinireseptorista (CHOR1, CHOR2, CHOR3 ja CHOR4, kuva 4).⁶

Lisäksi kustakin oktopamiinireseptorista oli valmistettu solulinjat, joissa oktopaamiinia koodittavan geenin alkupäähän, N-terminaaliseen päähän, oli liitetty green fluorescent protein (GFP) –merkkiainetta koodaava geenisekvenssi (CHOR0-GFP, CHOR1-GFP, CHOR2-GFP, CHOR3-GFP ja CHOR4-GFP).⁶

Solulinjojen valmistus on kuvattu artikkelissa Lind, U. et al. Octopamine receptors from the barnacle *Balanus improvisus* are activated by the α_2 -adrenoceptor agonist medetomidine. *Molecular Pharmacology* 2010, 78:237-48.



Kuva 4. CHO-solulinja, joka ekspressoii oktopamiinireseptori R4:ää. Faasikont-rastimikroskooppikuva muovialustalla kasvavista soluista.

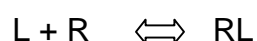
3.3 Proteiininääritys

Bradfordin menetelmä perustuu Coomassie® Brilliant Blue G-250 -värin kiinnittymiseen näytteen proteiineihin. Happamassa liuoksessa vapaan värin absorptiomaksimi on 465 nm:ssä. Kun väri kiinnittyy proteiiniin, siirtyy absorptiomaksimi 595 nm:iin. Värimuodostus on pysyvä ja nopea. Coomassien sininen väri sitoutuu pääasiassa emäksisiin ja aromaattisiin aminohappotähteisiin.¹

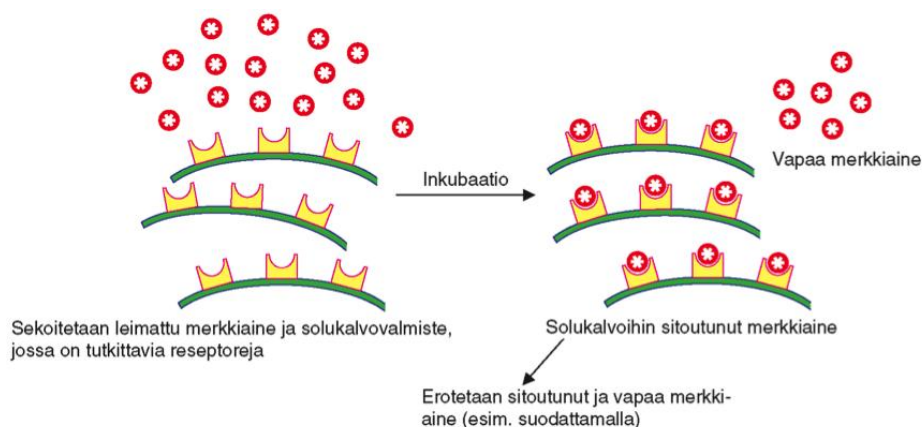
3.4 Sitoutumisominaisuuksien määrittäminen

3.4.1 Saturaatiokoe

Lääkeaineen (L) kiinnittyessä reseptoriin (R) muodostuu lääkeaine-reseptorikompleksi (LR). Radioaktiivisesti leimattujen lääkeaineiden tai muiden reseptoriin sitoutuvien merkkiaineiden avulla saadaan tietoa lääkeaineiden sitoutumisominaisuuksista.^{4,18}



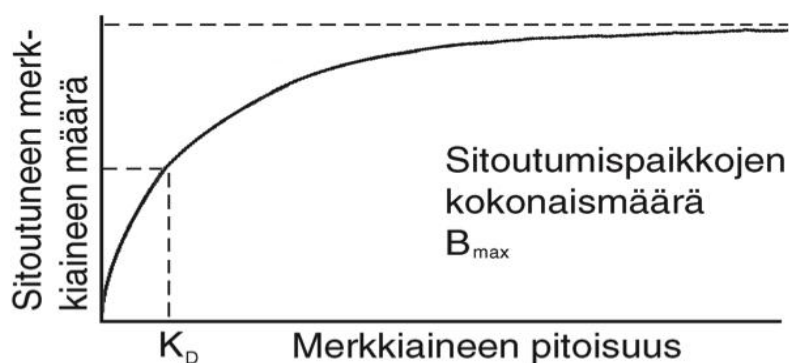
Kuvassa 5 esitetään koe, jossa solukalvovalmisteessa oleviin reseptoreihin sitoutuu saturaiva määrä merkkiainetta. Sitoutumaton merkkiaine erotetaan sitoutuneesta esimerkiksi suodattamalla. Solukalvovalmisteeseen jääneen merkkiaineen määrä ilmoittaa näytteessä olevien reseptorien määrän, koska kukin reseptori on sitonut yhden lääkeainemolekyylin.^{4,18}



Kuva 5. Reseptorien leimaaminen.⁴

Koetta toistettaessa merkkiaineen eri pitoisuuksilla, saadaan tulokseksi kuvan 6 mukainen saturaatiokuvaaja. Reseptoriin sitoutuneen merkkiaineen määrä lisääntyy merkkiaineen pitoisuuden lisääntyessä, kunnes kaikki reseptorit ovat

miehitettyinä. Saturaatiokuvaajasta voidaan määrittää merkkiaineen sitoutumishanakkuutta kuvaava affiniteettivakio (K_D) ja reseptorien kokonaismäärää näytteessä kuvaava suure (B_{max}). Kun vapaan merkkiaineen pitoisuus kokeessa on K_D :n suuruinen, on puolet näytteessä olevista reseptoreista miehitettyinä.^{4,18}



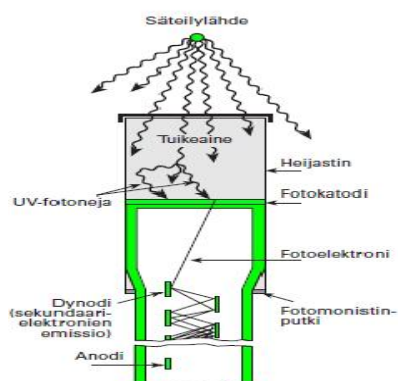
Kuva 6. Saturaatiokuvaaja.⁴

Saturaatiokoea varten tarvitaan näytteet kutakin merkkiaineen pitoisuutta varten, totaalisitoutumis- ja epäspesifiset sitoutumisnäytteet. Osa merkkiaineesta sitoutuu tutkittavaan näytteeseen epäspesifisesti, muualle kuin tutkimuksen kohteena olevaan reseptorijoukkoon (mm. näytteen muihin proteiineihin ja suodatinpaperiin). Epäspesifinen sitoutuminen mitataan lisäämällä näytteeseen merkkiaineen ohella ylimäärä toista lääkeainetta, joka sitoutuu samoihin reseptoreihin ja estää merkkiaineen sitoutumisen niihin. Tällöin todettava sitoutuminen kuvastaa merkkiaineen epäspesifistä sitoutumista. Spesifinen sitoutuminen saadaan kun totaalisitoutumisen määrästä vähennetään epäspesifinen sitoutuminen.^{4,18}

3.4.2 Tuikelaskenta

Tuikelaskenta on radioaktiivisten merkkiaineiden mittaamista. Radioaktiivinen säteily tuottaa radioluminesenssia tuikeaineessa. Tätä mitataan valomonistinputkella. Yleensä tuikelaskennassa käytetään valomonisteputkia koinsidenssi-kytkennässä, joka vähentää kohinaa määrittämisestä. Yleisimmät käytetyt radioisotoopit ovat beeta-hajoavia, useimmiten ^3H , ^{14}C , ^{35}S ja ^{33}P . Lisäksi käytetään gammaisotooppia ^{125}I .¹⁰

Säteilyenergian absorboituminen virittää atomin energiatilaan, joka purkautuu emittoimalla näkyvää valoa tai ultraviolettifotoneja. Toimiakseen skintillaattorina (tuikeaineena) aineella täytyy olla tiettyjä ominaisuuksia, esimerkiksi sopiva tiheys. Nestemäisellä ja kiinteällä aineella tämä on tarpeeksi suuri, jolloin säteilyn absorptiotodennäköisyys on riittävä. Absorptiota tulee seurata tarpeeksi voimakas luminesenssi ja tuikeaineen on oltava läpinäkyvä tälle valolle. Tuikeaineesta fotonit ohjataan heijastavien pintojen avulla valomonisteputken fotokatodille johon tuikeaine on kytketty optisesti. Valomonistinputken fotokatodi on puoliläpäisevää materiaalia, joka emittoi elektroneja kun valo osuu siihen. Elektronit kiihdytetään sarjalla elektrodeja (dynodit), niiden osuessa näihin emittoituu siitä useita uusia elektroneja joten määrä moninkertaistuu jokaisella dynodilla. Katodin ja anodin välillä on 1000-2000 voltin jännite ja katodilta dynodisarjan kautta anodille kulkeutuvien elektronien määrä lisääntyy noin miljoonakertaiseksi (kuva 7). Anodille saapuva elektronipulssi on verrannollinen tuikeaineeseen osuneen fotonin energiaan.^{3,10}



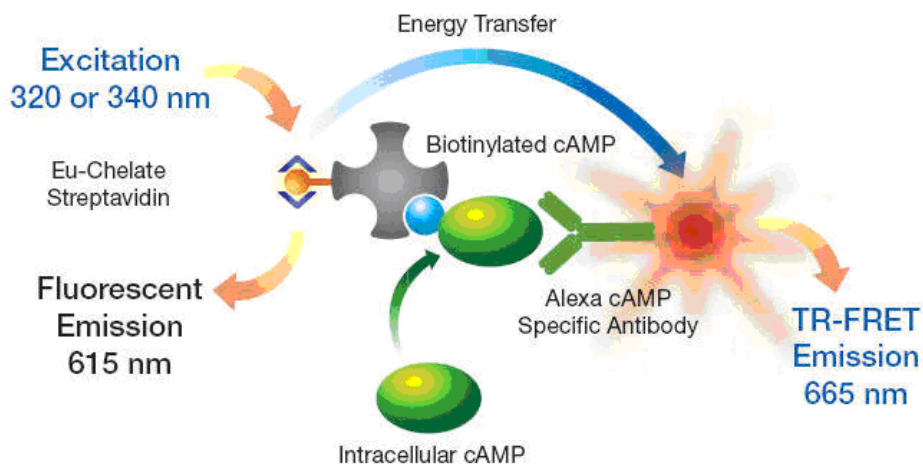
Kuva 7. Tuikelaskenta.¹⁰

3.5 cAMP:n määrittäminen

3.5.1 Lance® cAMP

Lance® cAMP on PerkinElmerin valmistama kittimuotoinen tuote, kvantitatiivinen menetelmä cAMP:n pitoisuuden määrittämiseen soluviljelmästä tai solumembraanivalmisteesta. LANCE cAMP -menetelmä on herkkä ja stabiili. Menetelmässä syntyvät reaktiotuotteet ovat stabiileja vähintään 20 tuntia huoneenlämmössä ja vain vähäistä menetystä herkkyydessä voi ilmetä. Nämä piirteet tekevät tästä määrittämisestä käyttökelpoisen myös suurtehoseulontaan eli HTS-seulontaprojekteihin.⁸

LANCE cAMP -menetelmä on homogeeninen TR-FRET (time-resolved fluorescence resonance energy transfer) immunoanalyysi, joka mittaa cAMP:n määrää solun sisällä. Menetelmä perustuu kilpailuun, jossa europium-merkitty biotinyloitu cAMP ja näytteen cAMP kilpailevat keskenään sitoutumisesta cAMP-spesifiseen vasta-aineeseen. Vasta-aine on merkitty Alexa Fluor® 647-väriaineella Kuva (8).⁸



Kuva 8. Lance cAMP -menetelmän periaate.⁸

Vasta-ainekompleksin ollessa yhteydessä Eu-kelatoituun streptavidiniin ja biotinyloidun cAMP:n välityksellä, 340 nm valopulssi virittää Europium-kelaattimolekyylin. Sen energia emittoituu ja siirtyy vasta-aineessa kiinni oleville Alexa-molekyyleille, jotka puolestaan säteilevät valoa 665 nm aallonpituudella. Fluoresenssin voimakkuutta mitataan aallonpituudella 665 nm. Fluoresenssi vähenee suhteessa näytteessä olevan cAMP:n pitoisuuteen. Saatu signaali on kääntäen verrannollinen näytteen cAMP-konsentraatioon.⁸

G_{as} -proteiinikytkentäisillä reseptoreilla agonistikäsittely lisää solujen tai solukalvonäytteiden cAMP:n määrää, jolloin fluoresenssisignaali vähenee (665 nm:ssa). G_i -proteiinikytkentäisillä reseptoreilla agonistikäsittely vähentää cAMP:n määrää estämällä AC:n aktivaation. Jotta cAMP:n määrän väheneminen pystytään mittaamaan, AC aktivoidaan forskoliinilla tuottamaan cAMP:tä. Agonistin lisäys vähentää cAMP:n määrää, jolloin fluoresenssisignaali lisääntyy 665 nm:ssa.⁸

3.5.2 Victor

Wallac 1420 VICTOR V²™ on monileimalukija, jolla voidaan mitata signaaleja erikokoisista kuoppalevyistä viidellä eri teknologialla, joita ovat luminometria, fotometria, fluorometria, fluoresenssipolarisaatio ja aika-erotteinen fluorometria. Laitteen detektorina on valomonistinputki sekä fotodiodi fotometriaa varten. Viritysvalo saadaan jatkuvatoimisesta halogeenilampusta tai aikaerotteista fluorometriaa varten xenonlampusta. Valomonistinputki on herkkä laite, joka vahvistaa yksittäisen fotonin havaittavaksi sähköpulssiksi. Haluttu aallonpituus voidaan valita interferenssisuotimilla.^{3,25}

4 KOKEELLINEN OSA

Tämän tutkimuksen tavoitteena oli oktopamiinireseptorisolulinjojen kartoitus ja cAMP-menetelmän optimiolosuhteiden määrittely. Koska oktopamiinireseptoreille ei ole sopivaa radioligandia, solulinjoja tutkittiin cAMP-menetelmällä.

Jokaisesta solulinjasta oli valmistettu kolme rinnakkaista linjaa, esimerkiksi CHOR0 1-3. Solulinjat erosivat transfektio-olosuhteiltaan, sillä transfektioissa oli käytetty eri pitoisuuksia plasmidi-DNA:ta. Esimerkiksi CHOR0 1-solulinjassa plasmidi-DNA:ta oli käytetty vähiten, solulinjassa 2 plasmidi-DNA:ta oli transfektiokitin ohjeen suosittelema määrä ja solulinjassa 3 plasmidi-DNA:ta oli käytetty eniten.

Solulinjojen karakterisoinnissa käytettiin kahta oktopamiinireseptorien agonistia, oktopamiinia ja medetomidiinia.

4.1 Liuosten valmistaminen

Ennen työn aloitusta valmistettiin tarvittavat liuokset ja reagenssit. Reagenssien valmistajatiedot löytyvät liitteestä 1 ja liuosten valmistusohjeet löytyvät liitteestä 2. Työssä käytettiin pääasiallisesti kaupallisia reagensseja.

4.2 Soluviljely

Kutakin solulinjaa kasvatettiin 75 cm² pulloissa. Solut kasvoivat kasvatuspullon pohjassa yhden solun paksuisena kerroksena. Kasvatusmediumina käytettiin kaupallista α -MEM -mediumia, joka sisälsi 5 % naudan sikiön seerumia (FCS).^{5,13}

4.2.1 Perussoluviljely

4.2.1.1 Solujen elvytys

Solujen elvytys nestetypessä suoritettiin nopeasti. Soluputki otettiin nestetypessä ja sulatettiin nopeasti 37 °C:ssa. Solut pipetoitiin kylmään Falcon-putkeen, johon oli pipetoitu 1,5 ml kylmää FCS-seerumia. Solut sentrifugoitiin (Centrifuge 5810R, Eppendorf); 1600 rpm, 2 minuuttia, +4 °C. Supernatantti kaadettiin pois ja solut suspensoitiin 2 ml:aan mediumia. Solususpensio pipetoitiin kasvatuspulloon, jossa oli 18 ml α -MEM/5 % FCS ja 160 μ l genetisiiniliuosta (valikointiantibiootti). Soluja kasvatettiin +37 °C/ 5 % CO₂ -olosuhteissa viljelykaapissa (Heracell, Heraeus), kunnes solut olivat noin 90 % konfluentteja.^{5,13}

4.2.1.2 Kasvatus ja jako

Kasvatusmedium poistettiin solujen päältä ja solut pestiin kahdesti 10 ml:lla PBS-liuosta. Solut irrotettiin 2 ml:lla 0,25% trypsiiniä. Trypsinin annettiin vaikuttaa 2-3 minuuttia, +37 °C/ 5 % CO₂ viljelykaapissa. Trypsiini inaktivoitiin pipetoimalla irronneiden solujen päälle 10 ml kasvatusmediumia. Solut siirrettiin sentrifugiputkeen ja sentrifugoitiin 1600 rpm, +4 °C, 3 minuuttia. Supernatantti kaadettiin pois ja solujen päälle pipetoitiin 2 ml α -MEM/5 % FCS. Solususpensio pipetoitiin kasvatuspulloon, jossa oli valmiina 18 ml α -MEM/5 % FCS ja 160 μ l genetisiiniliä. Solut jaettiin yleensä suhteessa 1/8-1/10. Soluja kasvatettiin viljelykaapissa +37 °C:ssa/ 5 % CO₂. Solut kasvoivat 90 % konfluenteiksi noin 3 vuorokaudessa.^{5,13,26}

4.2.1.3 Solujen pakastaminen nestetyypeen

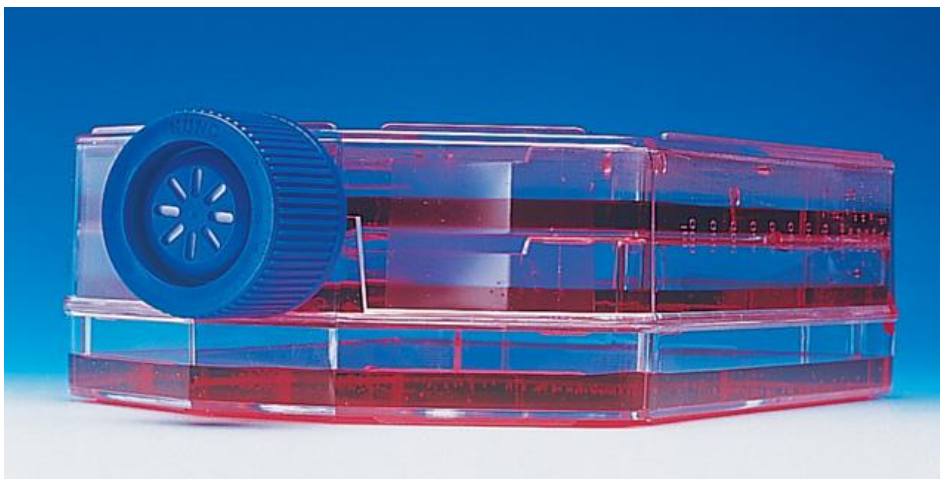
Kasvatuspullo huudeltiin kahdesti 10 ml PBS:llä. Solut irrotettiin 0,25% trypsiinillä kuten kohdassa 5.2.1.2 kuvataan. Sentrifugoinnin jälkeen supernatantti kaadettiin pois ja solut suspensoitiin 3 ml:aan pakastusmediumia (FCS, jossa 7,5 % DMSO). Solususpensio jaettiin kolmeen pakastusputkeen (á 1 ml), joihin oli merkitty solulinja, päivämäärä ja pakastaja. Solut esijäädettiin nestetyyppi-höyryssä yön yli, minkä jälkeen ne siirrettiin pakastustikkuihin nestetyypeen.^{5,13}

4.2.2 Kolmitasopullokasvatus

Membraanien valmistusta varten solut (CHOR0 1 ja 3 sekä CHOR0-GFP 1-3) kasvatettiin kolmitasopulloissa, jotta saatiin riittävästi soluja membraanien valmistukseen. Kolmitasopullon kasvupinta-ala on 500 cm² (kuva 9). Kolmitasopullokasvatuksessa ei enää käytetty genetiisiiniä, koska solujen kasvatusta ei enää jatkettu kolmitasopullon jälkeen.

4.2.2.1 Solujen siirto kolmitasopulloon

Kolmitasopullokasvastusta varten soluja kasvatettiin kolmessa 75 cm² soluviljelypulloissa, josta ne jaettiin kahteen kolmitasopulloon. Sentrifugoinnin jälkeen solut suspensoitiin 4 ml:aan α -MEM/5 % FCS -mediumia. Dekantterilasiin mitattiin 150 ml α -MEM/5 % FCS, johon pipetoitiin 2 ml solususpensiota. Solususpensio sekoitettiin hyvin mediumin joukkoon ja kaadettiin kolmitasopulloon. Kolmitasopulloa kallistettiin venttiilinurkalle, jolloin liuoksen pinta tasapainottui ja joka kerrokseen saatiin sama määrä nestettä. Pullo käännettiin nopeasti vaakatasoon ja siirrettiin viljelykaappiin. Solujen kasvu konfluenteiksi kesti noin 3 vuorokautta.^{5,11,13}



Kuva 9. Kolmitasopullo.²³

4.2.2.2 Solujen irrotus kolmitasopulloista

Solujen irrotus kolmitasopulloista tehtiin epästeriilisti. Kolmitasopullo pestiin huolellisesti 50 ml:llä PBS. Solut irrotettiin 20 ml:lla 0,25 % trypsiini/ 0,02 % EDTA -liuosta (inkubointi 37 °C:ssa 2-3 minuuttia). Solujen irrottua trypsiini inaktivoitiin lisäämällä 30ml α MEM/5 % FCS -mediumia. Soluseos kaadettiin sentrifuugiputkeen ja sentrifugoitiin 1600 rpm, 3 minuuttia, +6 °C. Solupelletti pestiin 10 ml:lla PBS ja kahden kolmitasopullon solut yhdistettiin. Solut sentrifugoitiin (1600 rpm, 3 minuuttia, +6 °C), supernatantti kaadettiin pois ja putket laitettiin hetkeksi alassuun valumaan. Solut pakastettiin ensin -20 °C:ssa, josta ne siirrettiin säilytykseen -70 °C:een (MDF-U50 V, Sanoy, Japan).^{5,11,13}

4.2.3 Solujen irrotus cAMP-määrityksiin

cAMP-määrityksessä käytettiin eläviä soluja, joten niiden irrottaminen tehtiin hellävaroen. Solut kasvatettiin kasvatuspulloissa (75 cm²) ja irrotettiin, kun pullo oli noin 80 % konfluentti. Ensin solut pestiin kahdesti 10 ml:lla PBS-liuosta ja pulloon jäänyt PBS poistettiin pipetillä. Solujen päälle pipetoitiin 8 ml Verseneliuosta ja sen annettiin vaikuttaa +37 °C/ 5 % CO₂ -viljelykaapissa (10-15 mi-

nuuttia). Irrotuksen aikana pulloa ravisteltiin kevyesti solujen irtoamisen nopeuttamiseksi. Solujen irrottua pulloon lisättiin 5 ml PBS ja solususpensio siirrettiin sentrifugiputkeen sentrifugoitavaksi (1600 rpm, +4 °C, 3 minuuttia). Supernatantti poistettiin ja pelletti pestiin PBS:llä ja sentrifugointi toistettiin. Supernatantti kaadettiin pois ja solupelletti liuotettiin 5 ml HBSS-liuokseen (Hanks' Balanced Salt Solution) ja sentrifugointi. Lopuksi solupelletti suspensioitiin 2 ml stimulaatiopuskuriin.^{8,11}

4.3 Membraanien eristäminen

Membraanien eristys tehtiin seuraavista solulinjoista: CHOR0-1 ja 3 sekä CHOR0-GFP 1-3. Kaikki työvaiheet solumembraanien eristämiseksi suoritettiin jäähauteella. Kolmitasopulloissa kasvatetut solut (säilytys -70 °C) siirrettiin jäähauteelle, suspensointiin varovasti pipetillä 10 ml:aan 32 mM sakkaroosi-TE-puskuria vortexoimalla. Solususpensio homogenisoitiin Ultra-Turrax -laitteella (Ultra-Turrax T25, Janke & Kunkel IKA®-Labortechnik) 3 x 10 sekuntia pienimmällä teholla (keltainen alue, 8000 rpm). Homogenisaattorin terä huuhdeltiin hyvin eri solulinjojen välissä milli-Q-vedellä. Homogenisoidut solut sentrifugointiin (108 g (2200 rpm), 15 minuuttia, +4 °C) hajoamattomien solujen ja tumien poistamiseksi ja syntynyt supernatantti otettiin talteen tyhjään sentrifugiputkeen. Solupelletti homogenisoitiin uudelleen (10 ml:aan 32 mM sakkaroosi-TE-puskuria) ja solususpensio sentrifugointiin kuten edellä. Supernatantti yhdistettiin ensimmäisestä sentrifugoinnista saadun supernatantin kanssa. Yhdistetyt supernatantit sentrifugointiin 50 227 g (20 500 rpm), 30 min, +4 °C (Sorvall RC26 plus) Membraanipelletti pestiin 10 ml TE-puskurilla ja sentrifugointi toistettiin. Lopuksi membraanipelletti liuotettiin 2 ml TE-puskuria ja jaettiin pieniin eriin (á 500 µl) ja säilytettiin -70 °C:ssa.¹³

4.4 Proteiinimääritys

Membraaninäytteistä määritettiin proteiinipitoisuudet Bradfordin menetelmällä. Näytteistä tehtiin 1/10 laimennokset pipetoimalla 20 µl näytettä, 180 µl Tris-puskuria ja 100 µl 3 N NaOH:ta. Näytteet sekoitettiin hyvin ja annettiin seistä huoneenlämmössä noin 15 minuuttia. BSA-standardit valmistettiin taulukon 2 mukaisesti. Määritysputkiin pipetoitiin 50 µl näytelaimennosta/standardia, 100 µl Hepes-puskuria ja 3 ml Bradford-reagenssia, sekoitettiin kevyesti ja näytteet kaadettiin kyvetteihin. Muodostunut väri mitattiin spektrofotometrillä (Lambda 20 UV/VIS Spectrometer, PerkinElmer) aallopituudella 595 nm 30 min kuluessa väriaineen lisäyksestä.^{1,13}

Taulukko 2. BSA-standardit proteiinimääritystä varten.

Proteiinin konsentraatio	50 mM Tris (µl)	50 mM Hepes (µl)	3 N NaOH (µl)	0,2 mg/ml BSA (µl)
0	25	100	25	0
0.1	25	75	25	25
0.2	25	50	25	50
0.3	25	25	25	75
0.4	25	0	25	100
0.5	25	25	25	25 (1mg/ml BSA)

4.5 Saturaatiokokeet

Saturaatiokokeet tehtiin CHO-R0 1-3 ja CHO-R0-GFP 1-3 -solulinjoille. Radioli-gandina käytettiin α_2 -adrenoseptorien merkkiainetta [³H]RS79948-197 ja epä-spesifinen sitoutuminen määritettiin α_2 -salpaaja fentolamiinin avulla.

Määrityksessä käytettiin neljää eri pitoisuutta [³H]RS79948-197-merkkiainetta: 6 nM, 3 nM, 1.5 nM ja 0.75 nM. Ne valmistettiin taulukon 3 mukaisesti.¹¹

Taulukko 3. Radioligandin laimennokset.

Laimennos	Pitoisuus reaktiossa (nM)	Välilaimennoksen pitoisuus (nM)	Laimennoksen tilavuus (laim. nro)	KF-puskuria
4	6	30	60 µl ([³ H]RS79948-197)	5 ml
3	3	15	2,5 ml (4)	2,5 ml
2	1,5	7,5	2,5 ml (3)	2,5 ml
1	0,75	3,75	2,5 ml (2)	2,5 ml

Fentolamiinin pitoisuus reaktiossa oli 10 µM (fentolamiinin kantaliuos oli 50 µM). Reaktion kokonaistilavuus oli 250 µl ja puskuriliuoksena käytettiin 50 mM kaliumfosfaattipuskuria pH 7.4 (KF-puskuri). Kullekin radioligandilaimennokselle määritettiin sekä totaali- että epäspesifinen sitoutuminen kolmella rinnakkaisella näytteellä. Membraaniproteiinia reaktiossa oli noin 10 µg. Totaali- ja epäspesifiset putket pipetoitiin seuraavan ohjeen mukaan.^{3,11,12,13}

	<u>Totaali</u>	<u>Epäspesifinen</u>
KF-puskuri	100 µl	50 µl
[³ H]RS79948-197	50 µl	50 µl
Fentolamiini	-	50 µl
Membraani	100 µl	100 µl
Yhteensä	250 µl	250 µl

Kaikkiin määritysputkiin pipetoitiin ensin KF-puskuri ja radioligandi. Epäspesifiin putkiin pipetoitiin vielä 50 µl fentolamiinia. Reaktio aloitettiin lisäämällä membraaniproteiini, putket sekoitettiin ja inkuboitiin 25 °C vesihauteella 30 minuuttia. Reaktio lopetettiin kylmässä suodattamalla näytteet nopeasti lasikuitu-filtterin (Whatman GF/B) läpi. Reseptoriin sitoutunut radioligandi erotettiin sitoutumattomasta radioligandista huuhtelemalla filtterit kolmesti kylmällä Tris-MgCl₂-puskurilla. Filtteripaperit siirrettiin laskentaputkiin ja päälle pipetoitiin 3 ml tukeainetta (OptiPhase 'Hi Safe' III).^{2,11,12,13}

Kustakin käytetystä radioligandilaimennoksesta otettiin 25 µl näyte laskentaputkissa oleville filteripaloille ja päälle pipetoitiin 3 ml tukeainetta. Ennen laskentaa kaikki näytteet seisotettiin yön yli huoneenlämmössä ja seuraavana päivänä näytteiden radioaktiivisuus mitattiin nestetuikelaskimella (Wallac 1410 liquid scintillation counter).^{2,11,13}

4.6 cAMP määrittäminen

Liitteessä 3 on cAMP-menetelmän perusohje.¹¹

4.6.1 Laimennosten teko

Määrittämisessä käytettävä stimulaatiopuskuri valmistettiin taulukon 4 mukaisesti. Esimerkiksi 20 ml:aan puskuria pipetoitiin 100 µl 1 M HEPES:tä pH 7,4, 265 µl 7,5 % BSA, 100 µl 100 mM IBMX ja 19,535 ml HBSS. Liuoksen pH tarkastettiin ja se säädettiin tarvittaessa 7,4:ksi (MP 230 pH meter, Mettler Toledo).^{8,11}

Taulukko 4. Stimulaatiopuskurin valmistus viidelle eri tilavuudelle.

10 ml	15 ml	20 ml	25 ml	30 ml	
50 µl	75 µl	100 µl	125 µl	150 µl	1 M HEPES pH 7,4
130 µl	200 µl	265 µl	330 µl	400 µl	7,5 % BSA stabilizer
50 µl	75 µl	100 µl	125 µl	150 µl	100 mM IBMX
9.77 ml	14.65 ml	19.535 ml	24.420 ml	29.3 ml	(1x) HBSS

Määrittäystä varten valmistettiin cAMP-standardit taulukon 5 mukaan. Suurin cAMP:n pitoisuus oli putkessa nro 1 ja laimein putkessa nro 11, putki nro 12 sisälsi pelkästään stimulaatiopuskuria. Taulukon mukaisesti pipetoitiin cAMP-standardiliuosta (50 µmol/L) 8 µl ensimmäiseen laimennosputkeen. Tästä pipetoitiin 30 µl seuraavaan laimennokseen, nro 2, ja näin jatkettiin aina laimennosnumeroon 11 asti. cAMP-standardien välilaimennoksien pitoisuudet ovat neljä kertaa loppupitoisuutta suuremmat, sillä kuoppalevyllä pitoisuudet laimentuvat neljäsosaan.^{8,11}

Taulukko 5. Standardien valmistus.

Laimennos	Pitoisuus reaktiossa (nM)	Väilaimennoksen pitoisuus (nM)	Standardin tilavuus (laim. nro)	Stimulaatiopuskuria
1	1000	4000	8 µl of 50 µM	92 µl
2	300	1200	30 µl (1)	70 µl
3	100	400	30 µl (2)	60 µl
4	30	120	30 µl (3)	70 µl
5	10	40	30 µl (4)	60 µl
6	3	12	30 µl (5)	70 µl
7	1	4	30 µl (6)	60 µl
8	0,3	1,2	30 µl (7)	70 µl
9	0,1	0,4	30 µl (8)	60 µl
10	0,03	0,12	30 µl (9)	70 µl
11	0,01	0,04	30 µl (10)	60 µl
12	-	-	-	70 µl

Forskoliinilaimennokset (FSK) valmistettiin taulukon 6 mukaisesti. Kuhunkin laimennosputkeen pipetoitiin ensin tarvittava määrä stimulaatiopuskuria. Ensimmäiseen, väkevimpään putkeen pipetoitiin 20 µl 10 mM forskoliinia. Tästä pipetoitiin 90 µl toiseen laimennokseen ja 30 µl kolmanteen laimennokseen. Loput laimennokset pipetoitiin taulukon 6 mukaisesti. Forskoliinin väilaimennoksien pitoisuudet olivat neljä kertaa loppupitoisuutta suuremmat, sillä kuoppalevyllä pitoisuudet laimentuivat neljäsosaan.^{8,11}

Taulukko 6. Forskoliinilaimennoksien valmistus.

Laimennos	Pitoisuus reaktiossa	Väilaimennoksen pitoisuus	Forskoliinin tilavuus (laim. nro)	Stimulaatiopuskuria
1	100 µM	400 µM	20 µl (10 mM)	480 µl
2	30	120 µM	90 µl (1)	210 µl
3	10	40 µM	30 µl (1)	270 µl
4	3	12 µM	30 µl (2)	270 µl
5	1	4 µM	30 µl (3)	270 µl
6	300 nM	1,2 µM	30 µl (4)	270 µl
7	100	400 nM	30 µl (5)	270 µl
8	30	10 nM	30 µl (6)	270 µl
9	10	40 nM	30 µl (7)	270 µl
10	1	4 nM	30 µl (9)	270 µl

Työssä käytettiin agonisteina oktopamiinia ja medetomidiniä pitoisuuksilla 100 µM ja 1 µM. Agonisteista valmistettiin ensin käyttöliuokset, 1 mM ja 100 µM tau-

lukon 7 A mukaisesti. Käyttöliuoksista valmistettiin agonistilaimennokset taulukon 7 B mukaisesti. Lisäksi valmistettiin sellaiset välilaimennospotket, jotka sisälsivät sekä agonistia että forskoliinia taulukon 7 C mukaan. Agonistien ja forskoliinin pitoisuudet olivat näissä liuoksissa neljä kertaa suuremmat kuin näyteinkubaatioissa, sillä kuoppalevyillä pitoisuudet laimentuivat neljäsosaan.^{8,11}

Taulukko 7. Agonistilaimennoksien valmistus.

A

Käyttöliuokset	Agonisti	Stimulaatiopuskuri
1 mM	30 µl (10 mM)	270 µl
100 µM	30 µl (1 mM)	270 µl

B

Agonistilaimennos 100 µM		Reaktiossa	Välilaimennos	Laimennoksen määrä (pitoisuus)	Stimulaatiopuskuri
2 x	Agonisti	100 µM	400 µM	12 µl (10 mM)	288 µl
Agonistilaimennos 1 µM					
		Reaktiossa	Välilaimennos	Laimennoksen määrä (pitoisuus)	Stimulaatiopuskuri
2 x	Agonisti	1 µM	4 µM	12 µl (100 µM)	288 µl

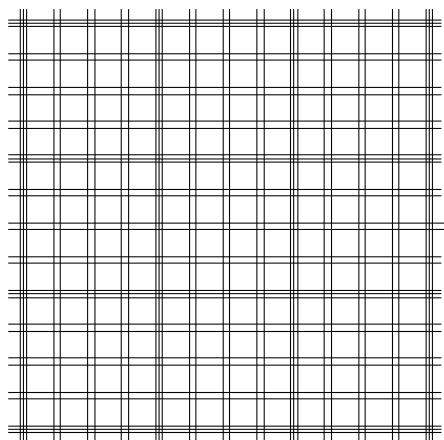
C

FSK 100 nM/agonisti 1 µM		Reaktiossa	Välilaimennos	Laimennoksen määrä (pitoisuus)	Stimulaatiopuskuri
2 x agonisti	FSK	100 nM	400 nM	30 µl (4 µM)	258 µl
	Agonisti	1 µM	4 µM	12 µl (100 µM)	
FSK 100 nM/agonisti 100 µM					
		Reaktiossa	Välilaimennos	Laimennoksen määrä (pitoisuus)	Stimulaatiopuskuri
2x agonisti	FSK	100 nM	400 nM	20 µl (4 µM)	100 µl
	Agonisti	100 µM	400 µM	80 µl (1 mM)	

4.6.2 Solumäärän laskeminen

Solulaskentaa varten otettiin kappaleessa 4.2.3 valmistetusta solususpensiosta 10 µl:n näyte Bürker-kammioon ja solut laskettiin mikroskoopin (CK40, Olympus) avulla. Laskenta-alueen yhdeksästä isosta ruudukosta laskettiin viiden ruudukon solut (kuva 10). Solumäärästä laskettiin keskiarvo, josta laskettiin solujen määrä per millilitra seuraavalla laskukaavalla.^{8,11}

$$\text{solumäärä} \times 9 \times 1000 / 0,9 = X \text{ solua / ml}$$



Kuva 10. Bürker-kammion laskenta-alue.²⁰

Esimerkki CHOR3-1 solujen laskemisesta.

83		ka 95,6	→	95,6 x 9 x 1000/0,9 = 0,96 milj/ml
92				
98				
104				
101				

4.6.3 cAMP-määrittäminen

Määrittäminen aloitettiin pipetoimalla 10 µl cAMP-standardia, forskoliinilaimennoksia ja agonistilaimennoksia 96-kuoppalevyille taulukon 8 mukaisesti. Jokaisesta näytteestä pipetoitiin kaksi rinnakkaista.^{8,11}

Taulukko 8. Pipetointikaavio 96-kuoppalevyille.

Levy	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		st 12		st 4		FSK 7		Agonisti 100				
B		st 11		st 3		FSK 6	FSK 100	Agonisti 1				
C		st 10		st 2		FSK 5	FSK 100	Agonisti 100				
D		st 9		st 1		FSK 4						
E		st 8		FSK 0		FSK 3						
F		st 7		FSK 10		FSK 2						
G		st 6		FSK 9		FSK 1						
H		st 5		FSK 8		Agonisti 1						

Solut irrotettiin ja laskettiin määrittämiseen kappaleen 5.2.3 mukaisesti. Jokaista määrittämistä varten laskettiin tarvittava määrä solususpensiota, kun yhteen kuoppaan tarvittiin 10 µl solususpensiota. Tarvittavaan määrään solususpensiota lisättiin cAMP- Alexa Fluor® 647 vasta-ainetta (cAMP-AB) 1/100 (esimerkiksi poistamalla 500 µl solususpensiosta 5 µl ja lisäämällä siihen 5 µl cAMP-AB). Standardeja varten valmistettiin standardinäyteliuos ottamalla 495 µl stimulatiopuskuria ja lisäämällä siihen 5 µl cAMP-AB:ta. Kuoppalevyille, joihin oli jo valmiiksi pipetoitu tutkittavat aineet, pipetoitiin solususpensio- ja standardinäytteet. Kuoppalevyjä ravisteltiin kevyesti ja levyjä inkuboitiin valolta suojattuna 30 minuuttia huoneenlämmössä.^{8,11}

Inkubaation aikana valmistettiin tarvittava määrä määrittämisliuosta. Taulukossa 9 on kuvattu tarkasti määrittämisliuoksen valmistus. A-liuos valmistettiin pipetoimalla Eu-W8044 merkattua streptavidiiniliuosta (Eu-SA) cAMP-määrittämissuspensioon 1/18. B-liuos valmistettiin pipetoimalla Biotin-cAMP-liuosta (b-cAMP) ja määrittämissuspensioon 1/6. Tämän jälkeen A- ja B-liuos yhdistettiin 1/125 ja liuoksen annettiin seistä huoneenlämmössä vähintään 15 minuuttia.^{8,11}

Taulukko 9. Määritysliuoksen valmistus.

Tarvittavamäärä: 54 x 20 µl = 1080 µl	→	1500 µl
A: 5 µl Eu-SA 85 µl cAMP määrityspuskuria		1/18
B: 12 µl b-cAMP 60 µl cAMP määrityspuskuria		1/6
Määritysliuos	1476 µl cAMP määrityspuskuria + 12 µl A-liuosta	1/125
	kevyt sekoitus	
	+ 12 µl B-liuosta	1/125
	Inkubointi huoneenlämmössä vähintään 15 min	

Kuoppalevyn inkubaation jälkeen pipetoitiin kaikkiin kuoppiin 20 µl määritysliuosta, kuoppalevyä ravisteltiin varovasti ja annettiin inkuboitua 3 tuntia valolta suojattuna. Kolmen tunnin inkubaation jälkeen fluoresenssi mitattiin Victorin Lance High Count 615/665 -ohjelmalla (Victor² V 1420 Multilabel HTS Counter, Wallac).^{8,11}

4.6.4 Solumäärä

Työssä tutkittiin kolmea eri solumäärää, 1000 solua/kuoppa, 3000 solua/kuoppa ja 6000 solua/kuoppa. Työ suoritettiin kohdan 5.6.3 cAMP-määritys ohjeen mukaan, niin että kuoppalevylle pipetoitiin eri solumääriä taulukon 10 pipetointikaavion mukaan. Tarkoituksena oli selvittää optimaalisin solumäärä määrittäisiin.¹¹

Taulukko 10. Solumäärän pipetointikaavio 96-kuoppalevyille.

Plate1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		st 12		st 4		FSK 7		Oct 100		FSK 10		FSK 2
B		st 11		st 3		FSK 6	FSK 100	Oct 1		FSK 9		FSK 1
C		st 10		st 2		FSK 5	FSK 100	Oct 100		FSK 8		Oct 1
D		st 9		st 1		FSK 4		Med 1		FSK 7		Oct 100
E		st 8	1000	FSK 0		FSK 3		Med 100		FSK 6	FSK 100	Oct 1
F		st 7		FSK 10		FSK 2	FSK 100	Med 1		FSK 5	FSK 100	Oct 100
G		st 6		FSK 9		FSK 1	FSK 100	Med 100		FSK 4		Med 1
H		st 5		FSK 8		Oct 1	3000	FSK 0		FSK 3		Med 100

Plate2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	FSK 100	Med 1		FSK 5	FSK 100	Oct 100						
B	FSK 100	Med 100		FSK 4		Med 1						
C	6000	FSK 0		FSK 3		Med 100						
D		FSK 10		FSK 2	FSK 100	Med 1						
E		FSK 9		FSK 1	FSK 100	Med 100						
F		FSK 8		Oct 1								
G		FSK 7		Oct100								
H		FSK 6	FSK 100	Oct 1								

4.6.5 Stimulaatioaika

Tarkoituksena oli testata stimulaatioajan vaikutusta agonistien aiheuttamiin vasteisiin. cAMP-kittiohjeessa stimulaatioajaksi suositeltiin 30-60 minuuttia. Työ tehtiin kuten kohdassa 5.6.3 kuvattiin, paitsi että määrittäksessä ei käytetty cAMP-standardeja eikä forskoliinilaimennossuoraa. Määrittäksessä käytettiin forskoliinipitoisuuksia 100 nM ja 100 µM varmistamaan, että menetelmä toimii. CHO-R0 ja CHO-R1 -solulinjoilla testattiin inkubaatioajat 10, 20, 30, 40, 60 ja 90 minuuttia. CHO-R2, CHO-R3 ja CHO-R4 -solulinjoilla testattiin inkubaatioajat 30, 40, 60 ja 90 minuuttia. Kuoppalevyt pipetoitiin taulukon 11 mukaisesti.¹¹

Koska stimulaatioaikamäärityksissä määrityspuskuri joutui seisomaan huoneenlämmössä eripituisia aikoja ennen kuoppalevyllä pipetointia, testattiin onko tällä vaikutusta mittaustuloksiin. Määritys tehtiin kappaleen 5.6.3 ohjeen mukaan, mutta määrityspuskuria seisotettiin huoneenlämmössä eri aikoja: Normaali seisotusaika oli 25 minuuttia ja muut testattavat ajat olivat 45, 60, 90 ja 120 minuuttia. Solut pipetoitiin kuopille 30 minuuttia ennen määrityspuskurin pipetointia.

Taulukko 11. Stimulaatioajan määrittäminen.

Levy

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	10 min	FSK 0		Med 100	FSK 100	Oct 1		FSK 100µM	FSK 100	Med 100		Med 1
B		FSK 100nM	FSK 100	Med 1	FSK 100	Oct 100		Oct 1	40 min	FSK 0		Med 100
C		FSK 100µM	FSK 100	Med 100		Med 1		Oct 100		FSK 100nM	FSK 100	Med 1
D		Oct 1	20 min	FSK 0		Med 100	FSK 100	Oct 1		FSK 100µM	FSK 100	Med 100
E		Oct 100		FSK 100nM	FSK 100	Med 1	FSK 100	Oct 100		Oct 1	60 min	FSK 0
F	FSK100	Oct 1		FSK 100µM	FSK 100	Med 100		Med 1		Oct 100		FSK 100nM
G	FSK100	Oct 100		Oct 1	30 min	FSK 0		Med100	FSK 100	Oct 1		FSK 100µM
H		Med 1		Oct 100		FSK 100nM	FSK 100	Med 1	FSK 100	Oct 100		Oct 1

levy

2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		Oct 100		FSK 100nM	FSK 100	Med 1						
B	FSK 100	Oct 1		FSK 100µM	FSK 100	Med 100						
C	FSK 100	Oct 100		Oct 1								
D		Med 1		Oct 100								
E		Med 100	FSK 100	Oct 1								
F	FSK 100	Med 1	FSK 100	Oct 100								
G	FSK 100	Med 100		Med 1								
H	90 min	FSK 0		Med 100								

5 TULOKSET

Työn tuloksien laskemiseen käytettiin Microsoft Officen Excel-ohjelmaa ja kuvaajien tekemiseen GraphPad Prism-ohjelmaa. Osa tuloksista on esitetty muodossa keskiarvo \pm keskihajonta.

5.1 Proteiininmääritys ja saturaatiokokeet

CHOR0-CHOR4 2- ja CHOR0-GFP – CHOR4-GFP 2 -solulinjoista oli jo aiemmin tehty saturaatiokokeet. Tällöin oli todettu, että ainoastaan reseptorialatyypin R0 sitoo jonkin verran käytettyä radioligandia [³H]RS79948-197. Tässä työssä saturaatiokokeet tehtiin vielä solulinjoille CHOR0 1-3 ja CHOR0-GFP 1-3.

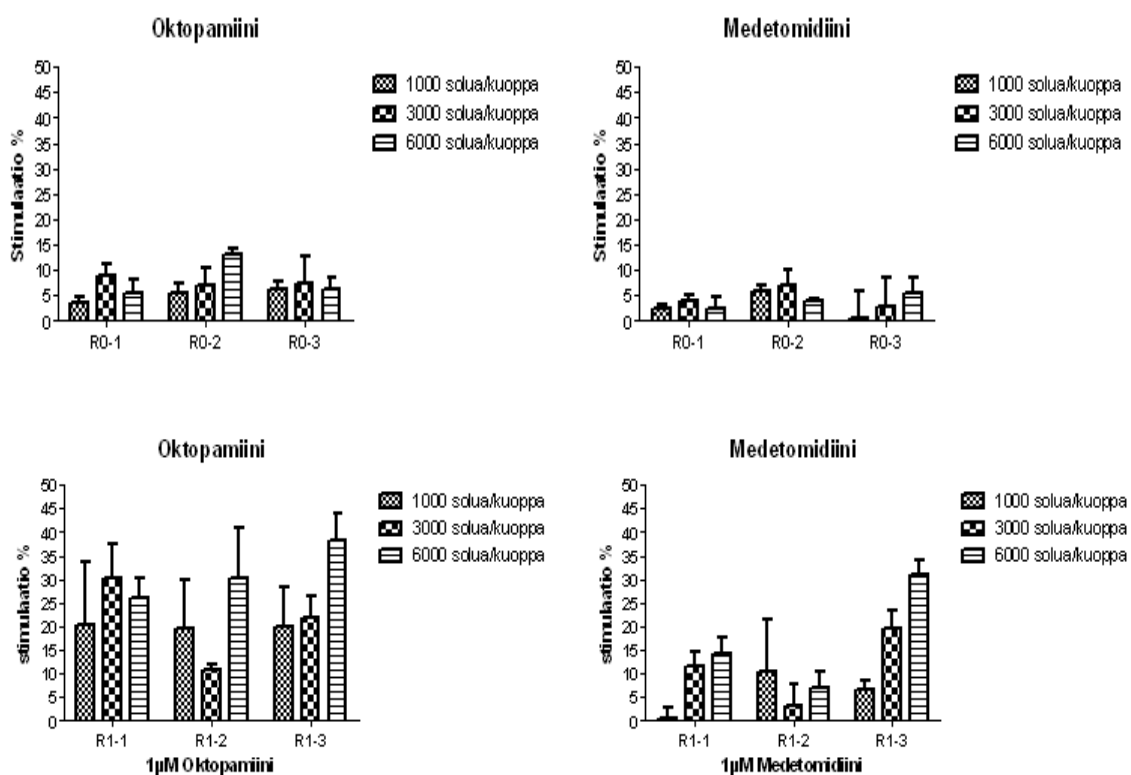
Liitteessä 5 esitettyjen saturaatiotulosten mukaan CHOR0 -solulinjat eivät eronneet suuresti toisistaan niiden kyvyssä sitoa käytettyä radioligandia. CHOR0-2-linja näytti kuitenkin sitovan parhaiten käytettyä radioligandia. CHOR0-GFP solulinjoista linja 1 sitoi selkeästi eniten radioligandia. Näiden tulosten mukaan solulinjat CHOR0-2 ja CHOR0-GFP 1 tuottavat eniten ko. reseptoreita. Proteiininmäärityksen tulokset on esitetty liitteessä 4.

5.2 Solumäärän vaikutus cAMP-määritykseen

cAMP-määrityksessä käytettiin agonisteina oktopamiinia ja medetomidiniä pitoisuuksina 1 μ M ja 100 μ M. 1 μ M pitoisuus kummastakin agonista antoi lähes maksimaalisen vasteen, joten tulokset on esitetty käyttäen tätä pitoisuutta. Tuloksissa verrattiin lääkeaineen antamaa vastetta perustason ilman agonistia. Perustasoksi määritettiin signaali, joka saatiin kun agonistin sijaan reaktiossa oli stimulaatiopuskuria. Kuvaajissa stimulaatioprosentti on laskettu vähentämällä perustasosta testatun aineen antama vaste ja jakamalla tämä perustason sig-

naalilla sekä kertomalla tulos sadalla. Määrittämissä näytteet tehtiin kahdella rinnakkaisella ja toistettiin vähintään kolme kertaa.

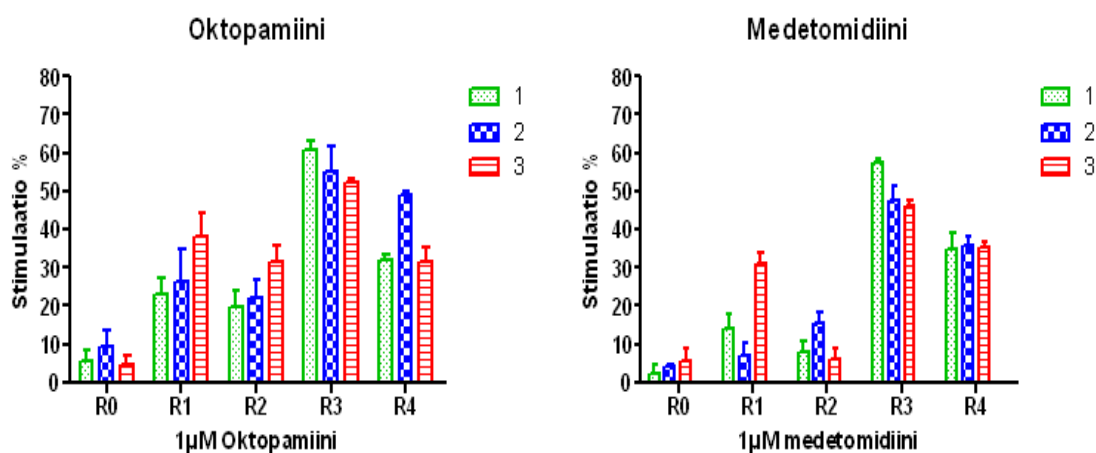
Solumäärätestaukset tehtiin solulinjoille CHOR0 1-3 ja CHOR1 1-3 solumäärillä 1000 solua/kuoppa, 3000 solua/kuoppa ja 6000 solua/kuoppa. Tulokset on esitetty kuvassa 11. Yleisesti oktopamiini antoi paremman vasteen kaikilla eri solumäärillä kuin medetomidiini. Kaikilla eri solumäärillä saatiin agonisteilla vasteet. Heikoimmat vasteet saatiin medetomidiinilla CHOR0-solulinjoilla. CHOR0-solulinjoista linja 2 antoi tiheydellä 6000 solua/kuoppa oktopamiinilla parhaimman vasteen, $13,3 \% \pm 1,6 \%$. CHOR1-solulinjoista linja 3 antoi parhaimman vasteen solumäärällä 6000 solua/kuoppa sekä oktopamiinilla, $38,4 \% \pm 10,0 \%$, että medetomidiinilla, $31,0 \% \pm 5,2 \%$.



Kuva 11. Solumäärän vaikutus cAMP:hen.

5.3 Solulinjojen seulonta

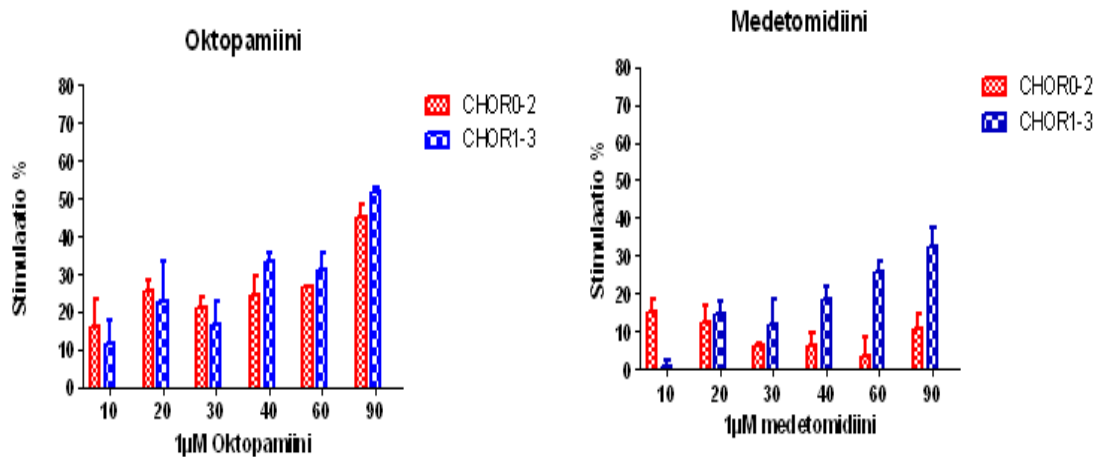
Solulinjat seulottiin 1 μM ja 100 μM oktopamiinilla ja medetomidiinilla solumäärällä 6000 solua/kuoppa. Tulokset on esitetty kuvassa 12. Parhaimmat vasteet saatiin CHOR3-solulinjoille ja heikoimmat vasteet CHOR0-solulinjoille. CHOR0-solulinjojen (1,2,3) vasteilla ei ollut suurta eroa. Vasteet ovat hyvin pieniä, ainoastaan CHOR0-2 oktopamiinilla antoi hieman suuremman vasteen. CHOR1-solulinjoista linja 3 antoi selkeästi parhaimman vasteen medetomidiinilla ja oktopamiinilla. CHOR2-solulinjoista linja 2 antoi hieman paremman vasteen medetomidiinilla kun taas linja 3 antoi hieman paremman vasteen oktopamiinilla. CHOR3-solulinjoista linja 1 ja CHOR4-solulinjoista linja 2 antoivat hieman paremmat vasteet kummallakin agonistilla kuin muut linjat. Aikaisemmassa tutkimuksessa, Lind et al. 2010, oli käytetty näistä solulinjoista linja 2:ta. Tässä tutkimuksessa saatujen tulosten perusteella CHOR1-solulinjoista linja 3 ja CHOR3-solulinjoista linja 1 antoivat paremman vasteen kuin 2-linjat. Jatkotutkimukset suoritettiin CHOR0-2, CHOR1-3, CHOR2-2, CHOR3-1 ja CHOR4-2 -solulinjoilla.



Kuva 12. Solulinjojen seulonta

5.4 Stimulaatioajan vaikutus cAMP-määrään

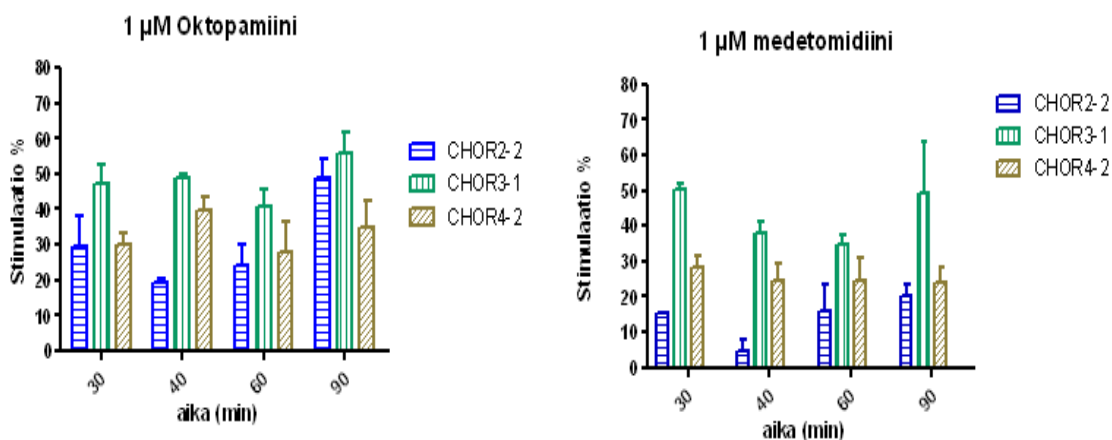
Solulinjoilla CHOR0-2 ja CHOR1-3 testattiin stimulaatioajat 10, 20, 30, 40, 60 ja 90 minuuttia. Kuvassa 13 esitetään kummankin solulinjan vasteet eri stimulaatioajoilla. 1 μM vaste vahvistui kummassakin solulinjassa, kun stimulaatioaikaa pidennettiin yli 30 minuuttiin. 1 μM medetomidiinin antama vaste oli selkeästi heikompi kuin oktopamiinin vaste. Varsinkin CHOR1-3 -solulinjalla stimulaatioajan pidentäminen paransi medetomidiinin vastetta.



Kuva 13. Stimulaatioajan vaikutus CHOR0-2- ja CHOR1-3-solulinjojen vasteesiin.

Solulinjoilla CHOR2-2, CHOR3-1 ja CHOR4-2 testattiin stimulaatioajat 30, 40, 60 ja 90 minuuttia. Tulokset esitetään kuvassa 14. Solulinjoilla CHOR2-2, CHOR3-1, CHOR4-2 stimulaatioajan pidentämisellä ei ollut merkittävää vaikutusta vasteisiin.

Stimulaatioajalla oli merkitystä varsinkin silloin, kun reseptoreita oli vähän ja vaste oli pieni. Liian lyhyt stimulaatioaika (10 ja 20 minuuttia) ei antanut riittävän luotettavia tuloksia. CHOR3-1 -solulinjalle stimulaatioajan nosto ei vaikuttanut merkittävästi vasteseen.



Kuva 14. Stimulaatioajan vaikutus CHOR2-2-, CHOR3-1- ja CHOR4-2-solinjojen vasteisiin.

Määrittämissä seisojen vaikutusta mittaustuloksiin selvitetiin, koska haluttiin olla varmoja siitä, ettei seisoaika vaikuta tuloksiin. PerkinElmerin kitiohjeen mukaan määrittämissä tulee seistä vähintään 15 minuuttia huoneenlämmössä ennen pipetoimista kuopille.

Taulukossa 12 esitetään tulokset määrittämissä seisoajoista CHOR4-2-solinjalle. Seisoajat määrittämissä olivat 25, 45, 60, 90 ja 120 minuuttia. Määrittäminen tehtiin yhden kerran. Tuloksista voidaan päätellä, että määrittämissä seisoajalla ei ole vaikutusta.

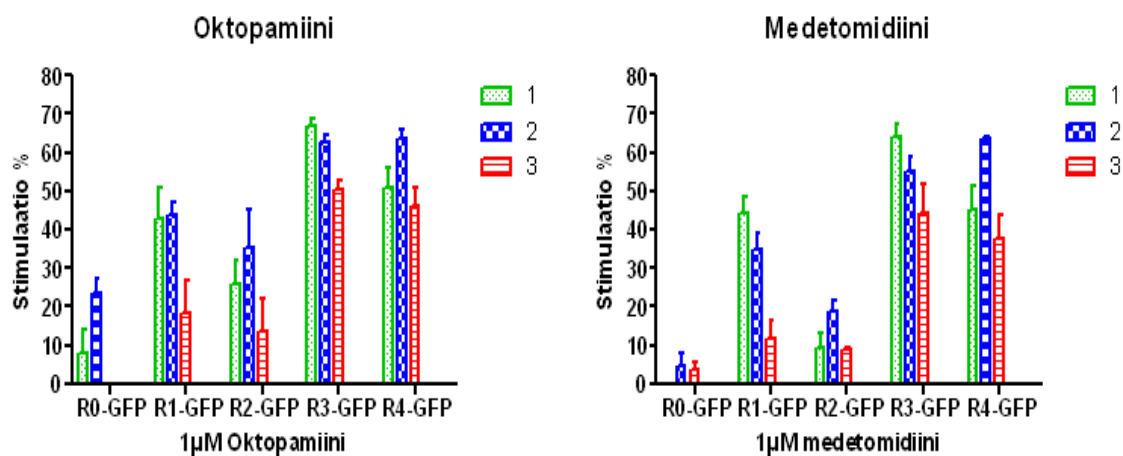
Taulukko 12. Määrityspuskurin seisotusajan vaikutus.

	25 min	45 min	60 min	90 min	120 min
	% yli perustason	% yli perustason	% yli perustason	% yli perustason	% yli perustason
100 μ M FSK	78	70	79	76	72
100 nM FSK	30	43	39	46	38
1 μ M oktopamiini	48	30	55	42	42
100 μ M oktopamiini	46	29	51	46	41
1 μ M medetomidiini	44	24	49	40	44
100 μ M medetomidiini	48	29	51	47	47

5.5 GFP-solulinjojen seulonta

GFP-solulinjojen seulonnassa hyödynnettiin muista solulinjoista saatuja tuloksia. Solumääränä käytettiin 6000 solua/kuoppa ja stimulaatioaikana 60 minuuttia.

Kuvassa 15 on esitetty GFP-solulinjojen seulontatulokset. CHOR0-GFP-solulinjoista ainoastaan linja 2 antoi vasteen sekä oktopamiinilla että medetomidiinilla. CHOR1-GFP-solulinjoista sekä linja 1 ja 2 antoivat hyvän vasteen oktopamiinilla ja medetomidiinilla. CHOR2-GFP-solulinjoista linja 2 antoi parhaimman vasteen sekä oktopamiinilla että medetomidiinilla. CHOR3-GFP solulinjoista kaikki kolme linjaa antoivat hyvän vasteen sekä oktopamiinilla että medetomidiinilla, paras solulinja näistä oli kuitenkin CHOR3-GFP-1. Myöskin CHOR4-GFP-solulinjat antoivat hyvän vasteen sekä oktopamiinilla että medetomidiinilla, paras solulinja näistä oli kuitenkin CHOR4-GFP-2.



Kuva 15. GFP-linjojen parhaimman vaihtoehdon valitseminen.

6 JOHTOPÄÄTÖKSET

Tämän tutkimuksen tavoitteena oli oktopamiinireseptorisolulinjojen kartoitus ja cAMP-menetelmän optimiolosuhteiden määrittely. Koska oktopamiinireseptoreille ei ole sopivaa radioligandia, solulinjat seulottiin cAMP-menetelmällä. cAMP-menetelmällä pystyttiin hyvin karakterisoimaan oktopamiinireseptorisolulinjat ja löytämään niistä parhaimman vasteen antavat solulinjat. cAMP-menetelmä sopii hyvin reseptoreiden kartoitukseen ja menetelmää voidaan hyödyntää, kun esimerkiksi oktopamiinireseptoreille seulotaan uusia lääkkeitä.

CHOR0-solulinjalle cAMP-menetelmä ei ole optimaalinen menetelmä, sillä agonisteilla saatu vaste on pieni ja siksi hankala määrittää ja toistaa. Tämän reseptorin kohdalla signaalinvälitys voi kulkea toisen toisiolähtetin kautta kuin cAMP:n, esimerkiksi Ca^{2+} :n kautta (G_q -kytkentäinen vaste)⁶. CHOR2-, CHOR3- ja CHOR4-solulinjoille agonistien vasteet olivat hyvät ja siksi määrittäminen oli luotettava ja toistettava. Stimulaatioajan pidentäminen paransi tulosten toistettavuutta varsinkin solulinjoille, joilla oli pieni vaste, siis CHOR0 ja CHOR1.

Menetelmän toistettavuuteen vaikutti myöskin elävien solujen käyttö määrittämisessä. Oli hyvin tärkeää ylläpitää solujen hyvinvointia jakamalla soluja säännöllisesti oikeassa jakosuhteessa ennen kuin solut kasvoivat konfluenteiksi. Solususpensiosta piti ottaa mahdollisimman homogeeninen näyte solujen laskentaa varten, jotta oikea ja tasainen solumäärä saatiin määrittämisessä toistettavasti.

LÄHTEET

- ¹ Bradford, M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- ² Halme, M.; Sjöhlom, B.; Savola, J.; Scheinin, M. 1995. Recombinant human α_2 -adrenoceptor subtypes: comparison of [³H]rauwolscine, [³H]atipamezole and [³H]RX821002 as radioligands *Biochimica et Biophysica Acta* 1266:207-14.
- ³ Kivelä, P. Wallac Oy. 4/2003. Analyysi, Suomen laboratorioalan Liitto Ry lehti. Saatavilla www-muodossa: http://www.laborantti.net/analyysit/2003/analyysi_2003_4.pdf
- ⁴ Koulou M.; Tuomisto (toim.) 6. painos. Farmakologia ja toksikologia. Kuopio: Medicina Oy. Saatavilla [www-muodossa: http://www.medicina.fi/index.php?option=com_content&view=article&id=48&Itemid=56](http://www.medicina.fi/index.php?option=com_content&view=article&id=48&Itemid=56)
- ⁵ Lakkakorpi, P.; Härkönen, P. Tutkijalinja Soluviljelykurssin teoriamoniste. Turun yliopisto, Biolääketieteen laitos, Anatomia.
- ⁶ Lind, U.; Alm Rosenblad, M.; Frank, L.; Falkbring, S.; Brive, L.; Laurila, J.; Pohjanoksa, K.; Vuorenpää, A.; Kukkonen, J.; Gunnarsson, L.; Scheinin, M.; Mårtensson Lindblad, L.; Blomberg, A. 2010. Octopamine receptors from the barnacle *Balanus improvisus* are activated by the α_2 -adrenoceptor agonist medetomidine. *Molecular Pharmacology* 78:237-48.
- ⁷ Niemi, M.; Virtanen, I.; Vuorio, E. 1995. Solu- ja molekyylibiologia. 6.painos. Porvoo: Weilin+Göös.
- ⁸ PerkinElmer Life and Analytical Science, Inc. 2007. Lance® cAMP 384 kit. Waltham, MA: USA.
- ⁹ Solunetti / Solubiologia. Suomen virtuaaliyliopiston verkkosivut. www.solunetti.fi
- ¹⁰ Säteilyturvakeskus. Säteily ja sen havaitseminen. Hämeenlinna: Karisto Oy:n kirjapaino, 2002. Saatavilla www-muodossa: http://stuk.fi/julkaisut/maaraykset/kirjasarja/fi_FI/kirjasarja1/
- ¹¹ Pohjanoksa, Katariina. Henkilökohtainen tiedonanto. Farmakologia, Turun yliopisto.
- ¹² Reseptorifarmakologian työohje 2010. Farmakologia, Turun yliopisto.
- ¹³ Uoti, Ulla. Henkilökohtainen tiedonanto. Farmakologia, Turun yliopisto.
- ¹⁴ http://www.itameriportaali.fi/fi/tietoa/sanakirja/fi_FI/merirokko/
- ¹⁵ http://www.veneilyliitto.fi/cms/wce/uploads/MERIROKKOASIAA_2010.pdf
- ¹⁶ Hanson, MA; Stevens, RC. 2008. Discovery of new GPCR biology: one receptor structure at a time. *Structure*. 2009 Jan 14;17(1):8-1 .
- ¹⁷ Jalink, Kees; Moolenaar, Wouter H.; 2010. G-protein-coupled receptors: the inside story. *Bio-Essays*. 32:13-16.
- ¹⁸ K.P. Jayapal *et al.*, 2007. Recombinant protein therapeutics from CHO cells – 20 years and counting, *Chem. Eng. Prog.* **103**
- ¹⁹ Laurila, Jonne M.M.; 2011. α_2 -Adrenoceptors: structure and ligand binding properties at the molecular level. Turun yliopisto. *Annales Universitatis Turkuensis D* 962.
- ²⁰ <http://www.lo-laboroptik.de/deutsch/info/zaehl.html>

²¹ Alberts, Bruce; Johnson, Alexander; Lewis, Julian; Raff, Martin; Roberts, Keith; Walter, Peter. 2002. Molecular Biology of the Cell. 4th edition, New York. Garland Science.

²² <http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/BIOL2060-14/CB14.html>

²³ http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?D7=0&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&N4=F8542|SIGMA&N25=0&QS=ON&F=SPEC

²⁴ <http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/BIOL2060-14/CB14.html>

²⁵ <http://www.perkinelmer.com/Catalog/Product/ID/1420-016>

²⁶ Jakoby, William; Pastan, Ira. 1979. Cell Culture. Academic Press, San Diego, CA, USA.

Reagenssit

NaOH	(Merck 106482, Darmstadt, Germany)
FCS	(PromoCell C-37350, Heidelberg, Germany)
Genetisiini	(G 418 disulfate salt solution, St. Louis, MO, Sigma-Aldrich)
HBSS-liuos	(Hanks' Balanced Salt Solution, Invitrogen, California, USA)

Liuosten valmistaminen

Alpha Medium (α -Mem)

Punnittiin (PB3002, Mettler Toledo, Sveitsi) 50,4 g Alpha Mediumia ja 11.0 g NaHCO_3 (Sigma, S5761, St. Louis, USA) isoon dekantterilasiin ja liuotettiin 4 litraan Milli-Q-vedellä. Tämän jälkeen liuoksen pH säädettiin väkevällä HCl:llä tai 10 M NaOH:lla välille 6.8-7.2 (MP 230 pH meter, Mettler Toledo). Lisättiin liuokseen 25 ml penisilliini-streptomysiini antibioottia (10 000 U/ml pen. + 10 mg/ml strept.; Penicillin-streptomycin solution P0781, Sigma), jolloin antibiootin pitoisuudeksi saatiin 50 U/ml penisilliiniä ja 50 $\mu\text{g/ml}$ streptomysiiniä. Säädettiin Milli-Q-vedellä lopputilavuus 5:ksi litraksi. Medium steriloitiin suodattamalla (Gelman Acrocap filter 0.2 μm) steriileihin 500 ml pulloihin. Mediumia säilytettiin kylmäkaapissa (MC, Porkka). Ennen käyttöönottoa mediumiin lisättiin FSC-seerumia (Fetal Calf Serum, Promocell, Germany) niin että seerumin loppupitoisuus on 5 %.

1X Fosfaattipuskuroitu suolaliuos (PBS)

1x PBS-liuos valmistettiin 10x PBS-liuoksesta (3,12 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 14,24 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 81 g NaCl 1 L:ssa (kaikki kemikaalit olivat J.T. baker, Phillipsburg, USA) mittaamalla 50 ml 10x PBS-liuosta ja lisäämällä siihen 450 ml Milli-Q-vettä. PBS autoklavoitiin ja säilytettiin +4 °C:ssa.

0.25 %Trypsiini- 0.02 % EDTA

Pipetoitiin 5 ml 10x trypsiiniä ja 0.5 ml 2% EDTA-liuosta 50 millilitran Falcon-putkiin (BD, Franklin Lakes, New Jersey, Yhdysvallat). Putkia säilytettiin -20 °C:ssa (Siemens, KG32 E470 nro 865). Ennen käyttöönottoa putkeen lisättiin 1x PBS 44,5 ml. Säilytys +4 °C:ssa.

Epästeriili 0.25 %Trypsiini- 0.02 % EDTA

Mitattiin 100 ml 10X trypsiiniä ja 10 ml 2 % EDTA mittalasiin ja laimennettiin epästeriilillä 1x PBS 1000 millilitraan asti. Valmis liuos jaettiin 200 ml:n eriin. Säilytys +4 °C:ssa.

50 mM Kaliumfosfaattipuskuri pH 7.4 (KF-puskuri)

Kaliumfosfaattipuskuri valmistettiin 0,1 M K_2HPO_4 ja 0,1 M KH_2PO_4 kantaliuoksista. 0,1 M K_2HPO_4 -kantaliuos valmistettiin punnitsemalla 34,8 g ja liuotettiin 2 L:ksi milli-Q-vedellä. 0,1 M KH_2PO_4 -kantaliuos valmistettiin punnitsemalla 6,8 g ja liuotettiin 500 ml:ksi milli-Q-vedellä. Näistä valmistettiin 50 mM KF-puskuri yhdistämällä 400 ml 0,1 M K_2HPO_4 , 100 ml 0,1 M K_2HPO_4 ja 450 ml Milli-Q-vettä ja säädettiin pH 7,4:ksi kyseisten kantaliuosten avulla. Lopuksi tilavuus säädettiin 1 L:ksi. Säilytys +4 °C:ssa.

1M HEPES

Punnittiin (PB3002, Mettler Toledo) 119,15 g HEPES:tä, joka liuotettiin 400ml Milli-Q-vettä. Liuoksen pH säädettiin 7,4:ksi 3 N NaOH:lla ja tilavuus säädettiin 500 ml:ksi Milli-Q-vedellä. Liuos säilytettiin + 4 °C:ssa (Siemens KG32 E470 nro 861).

100 mM IBMX

Punnittiin (AG204, Mettler Toledo, Sveitsi) 27,9 mg IBMX:ää (Sigma I5879, St. Louis, MO, USA), joka liuotettiin 1,215 ml dimetyylisulfoksidiin (Sigma I54938, St. Louis, MO, USA). Liuos jaettiin 75 µl eriin ja säilytettiin -20 °C:ssa (Siemens KG32 E470 nro 863).

10 mM Forskoliini

Punnittiin 1,85 mg forskoliinia (Sigma F6886, St. Louis, Mo, USA), joka liuotettiin 450,5 µl:aan dimetyylisulfoksidia. Liuos jaettiin 30 µl eriin, säilytys -20 °C:ssa (Siemens KG32 E470 nro 863).

10 mM Oktopamiini

Punnittiin 1,9 mg octopamiinia (Lahjoitus Göteborg:n yliopistolta), joka liuotettiin 1000 µl:aan Milli-Q-vettä. Liuos jaettiin 50 µl eriin ja säilytettiin -20 °C:ssa (Siemens KG32 E470 nro 863).

10 mM Medetomidiini

Punnittiin 4,3 mg medetomidiinia (Lahjoitus Göteborg:n yliopistolta), joka liuotettiin 1816 µl:aan Milli-Q-vettä. Liuos jaettiin 50 µl eriin ja säilytettiin -20 °C:ssa (Siemens KG32 E470 nro 861).

1 x Tris-MgCl₂-puskuri

1 x Tris-MgCl₂-puskuri valmistettiin 10 x Tris-MgCl₂-puskurista (121,2 g Tris-HCl (Sigma, T3253, St. Louis, Mo, USA) sekä 40,6 g MgCl₂ + 6 x H₂O (J.T. Baker, 0162, Deventer, Holland) 2 L:ssa Milli-Q-vettä). Mittaamalla 100 ml 10 x Tris-MgCl₂ ja lisäämällä siihen 900 ml milli-Q-vettä ja säilytettiin +4 °C:ssa (Huurre, nro 3058.).

cAMP-menetelmän perusohje

LANCE cAMP kit/ basic protocol for cell-based assay

by Katariina Pohjanoksa 300309

Standard curve protocol		Cell-based protocol	
Stimulation buffer		Stimulation buffer	
		5 mM HEPES 0,1 % BSA 0,5 mM IBMX in (1x) HBSS, pH 7,4	
Detection mix		Detection mix	
		in detection buffer according to kit manual (can be done after first incubation has started)	
St	<i>Prepare st-dilutions in stim buffer</i> (1-12 dilutions), 10 µl/well according to kit manual	Cells	<i>Prepare the cell suspension</i> in stim. buffer according to kit manual
Ab	<i>Prepare cAMP-Ab solution</i> (AlexaFluor 647) 1/100 dilution in stim buffer 10 µl/well (esim. 5 µl cAMP-Ab + 495µl stim. Buffer)	Ab	<i>Prepare cAMP-Ab solution in cell susp</i> 1/100 dilution in cell suspension 10 µl/well (esim. 5 µl cAMP-ab + 495 µl cell suspension)
		Comp.	<i>Prepare compounds dilutions</i> (FSK/agonist/antagonist) Make 4x solutions (10µl/40µl) in stim buffer
Reactions	10 µl cAMP st-dilution (1-12) 10 µl cAMP-Ab solution Incubation 30 min at RT (30-60 min) Add 20 µl detection mix Incubation at least 60 min at RT in dark! Read fluorescence with Victor (after 2-3 h incubation)	Reactions	10 µl Compound dilution or stim buffer 10 µl cAMP-Ab/cell susp. solution Incubation 30 min at RT (30-60 min) Add 20 µl detection mix Incubation at least 60 min at RT in dark! Read fluorescence with Victor (after 2-3 h incubation)

Stimulation buffer

Make fresh and prepare only the amount needed within one day.

5 mM HEPES

0,1 % BSA

0,5 mM IBMX

in (1x) HBSS, pH 7,4

10 ml	15 ml	20 ml	25 ml	30 ml	
50 µl	75 µl	100 µl	125 µl	150 µl	1 M HEPES pH 7,4
130 µl	200 µl	265 µl	330 µl	400 µl	7,5 % BSA stabilizer
50 µl	75 µl	100 µl	125 µl	150 µl	100 mM IBMX (1x)
9.77 ml	14.65 ml	19.535 ml	24.420 ml	29.3 ml	HBSS

Check the pH and adjust to pH 7.4 if needed

Detection mix

Start to do it just after the first incubation (stimulation) has started.

Esim.

A:	5 µl	Eu-W8044 labeled strptavidine (Eu-SA)	(dilution 1/18)
	85 µl	cAMP detection buffer	
B:	5 µl	Biotin-cAMP (b-cAMP)	(dilution 1/6)
	25 µl	cAMP detection buffer	

Detection mix:			
615 µl	cAMP detection buffer		
5 µl	Solution A (Eu-SA dilution)	(dilution 1/125)	
mix gently and add			
5 µl	Solution B (b-cAMP dilution)	(dilution 1/125)	
mix gently			
incubate for at least 15 min at RT (cover the tube with folio)			

cAMP standards

(10 µl/40 µl → 4 X)

Dilution	[Final] (nM)	[Intermediate] (nM)	Vol of dilution	Stimulation buffer
1	1000	4000	8 µl of 50 µM	92 µl
2	300	1200	30 µl of dil 1	70 µl
3	100	400	30 µl of dil 2	60 µl
4	30	120	30 µl of dil 3	70 µl
5	10	40	30 µl of dil 4	60 µl
6	3	12	30 µl of dil 5	70 µl
7	1	4	30 µl of dil 6	60 µl
8	0,3	1,2	30 µl of dil 7	70 µl
9	0,1	0,4	30 µl of dil 8	60 µl
10	0,03	0,12	30 µl of dil 9	70 µl
11	0,01	0,04	30 µl of dil 10	60 µl
12	-	-	-	70 µl

Cell suspension

- wash cells two times with 10 ml (1X) PBS
- harvest cells with 6 ml Versene
- wash the cell bottle with 5 ml (1X) PBS and combine with Versene
- centrifuge cells 1600 rpm, 3 - 5 min
- wash cell pellet with 5 -10 ml HBSS
- centrifuge cells 1600 rpm, 3 - 5 min
- resuspend cells in 5 ml (or more or less) stimulation buffer

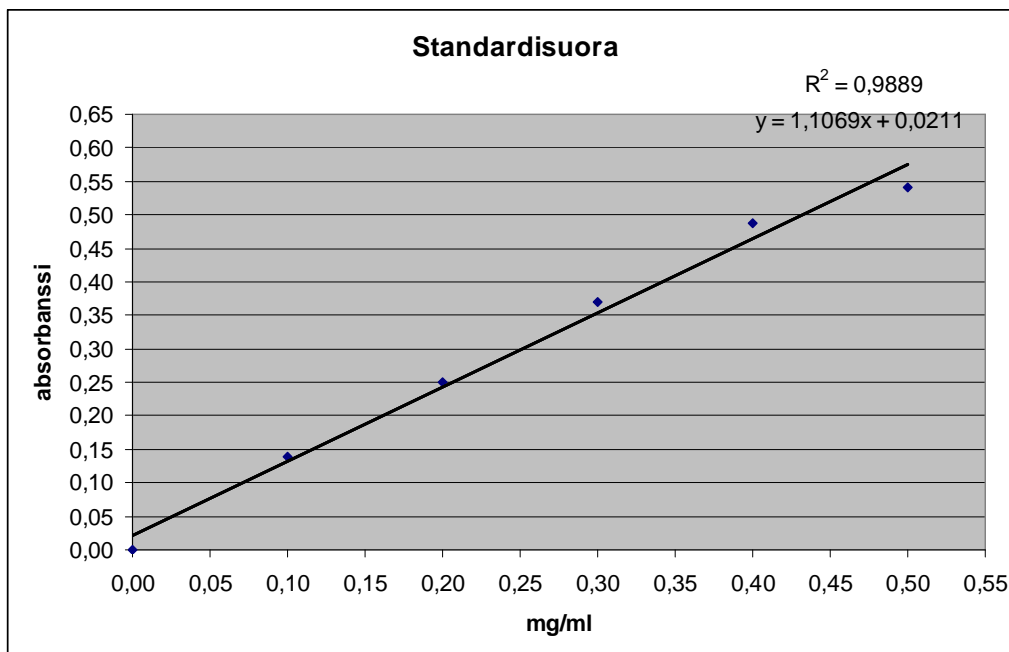
count the cells and dilute to proper cell concentration (cells/ml) with stimulation buffer

Cell count in Bürger:

- take 2 x 10 µl sample to Bürger
- count at least three counting area on both side and calculate the average

cell amount x 9 x 1000/0,9 = X cell/ml

Proteiinimäärityksen tulokset



Solulinja	Proteiini pitoisuudet (mg/ml)
R0 1	1,8
R0 2	2,7
R0 3	1,2
R0-GFP 1	1,9
R0-GFP 2	2,7
R0-GFP 3	1,7

Saturaatiokokeen tulokset

Solulinja	Radioligandin pitoisuus (nM)	Totaalisitoutuminen (DPM)	Epäspesifinen sitoutuminen (DPM)	Spesifinen sitoutuminen (DPM)
CHORO-1	0,75	202,17	32,2	169,97
	1,5	446,65	69,2	377,45
	3	899,43	164,13	735,3
	6	1397,4	322,8	1074,6
CHORO-2	0,75	245,33	47,53	197,8
	1,5	553,37	112,33	441,03
	3	1062,6	227,87	834,73
	6	1858,67	503,07	1355,6
CHORO-3	0,75	209,03	28,97	180,07
	1,5	402,75	71,13	331,62
	3	684	154,3	529,7
	6	1131,5	306,9	824,6
CHORO-GFP 1	0,75	216,53	30,47	186,07
	1,5	422,33	88,97	333,37
	3	834,73	181,03	653,7
	6	1738,67	439,23	1299,43
CHORO-GFP 2	0,75	69,27	39,53	29,73
	1,5	152,55	104,27	48,28
	3	325,83	271,23	54,6
	6	614,37	455,17	159,2
CHORO-GFP 3	0,75	64,97	44,37	20,6
	1,5	150,8	98,63	52,17
	3	283,23	210,8	72,43
	6	639,87	433,3	206,57

cAMP määrittämisen esimerkki tulos

CHOR0-2		[FSK]	1000 solua/kuopassa			3000 solua/kuopassa			6000 solua/kuopassa		
			Signaali (665nm)		KA	Signaali (665nm)		KA	Signaali (665nm)		KA
perustaso		-	3294	2954	3124	3186	2976	3081	2935	2901	2918
10		1	3088	3021	3055	2933	3003	2968	3000	3015	3008
9		10	2924	3036	2980	3075	2866	2971	3039	2631	2835
8		30	3001	2864	2933	3155	3042	3099	2877	2750	2814
7		100	2643	3154	2899	2785	2647	2716	2592	2858	2725
6		300 nM	2991	2998	2995	2802	2760	2781	2197	2421	2309
5		1	2840	2755	2798	2394	2453	2424	1913	1958	1936
4		3	2367	2539	2453	1932	1842	1887	1752	1850	1801
3		10	2137	2101	2119	1490	1433	1462	1449	1376	1413
2		30	1892	1908	1900	1265	1255	1260	1165	1120	1143
1		100µM	1539	1648	1594	1126	1146	1136	1115	1007	1061

oktopamiini		-	3102	2903	3003	2774	2955	2865	2604	2568	2586
1µM		-	2850	3108	2979	2986	2799	2893	2815	2851	2833
oktopamiini		-	2850	3108	2979	2986	2799	2893	2815	2851	2833
100µM		-	2850	3108	2979	2986	2799	2893	2815	2851	2833
oktopamiini		100nM	2884	3170	3027	2866	2750	2808	2539	2458	2499
1µM		100nM	3057	2944	3001	2701	2638	2670	2612	2590	2601
oktopamiini		100nM	3057	2944	3001	2701	2638	2670	2612	2590	2601
100µM		100nM	3057	2944	3001	2701	2638	2670	2612	2590	2601
medetomidiini		-	3103	2850	2977	2960	2910	2935	2789	2791	2790
1µM		-	3196	3118	3157	2964	2622	2793	2925	3071	2998
medetomidiini		-	3196	3118	3157	2964	2622	2793	2925	3071	2998
100µM		-	3196	3118	3157	2964	2622	2793	2925	3071	2998
medetomidiini		100nM	2898	2998	2948	2475	3008	2742	2580	2569	2575
1µM		100nM	2898	2998	2948	2475	3008	2742	2580	2569	2575
medetomidiini		100nM	2880	2849	2865	2607	2556	2582	2584	2585	2585
100µM		100nM	2880	2849	2865	2607	2556	2582	2584	2585	2585

	% yli perustason		% yli perustason		% yli perustason
100µM FSK	48,99		63,13		63,64
100nM FSK	7,22		11,85		6,61
1µM					
oktopamiini	3,89		7,03		11,38
100 µM					
oktopamiini	4,64		6,12		2,91
1µM oktopamiini 100nM FSK	3,10		8,86		14,38
100 µM oktopamiini 100nM FSK	3,95		13,36		10,86
1µM					
medetomidiini	4,72		4,74		4,39
100µM					
medetomidiini	-1,06		9,35		-2,74
1µM medetomidiini 100nM FSK	5,63		11,02		11,77
100µM medetomidiini 100nM FSK	8,31		16,21		11,43

Solulinjan seulonta

% yli perustason			
solua/kuoppa määritys päivä	6000		
	25.9.09	29.9.09	1.10.09
CHOR3-1			
100 µM FSK	81,93	78,24	75,48
100 nM FSK	35,87	29,13	19,51
1 µM oktopamiini	65,47	57,03	59,11
100 µM oktopamiini	65,44	52,68	56,27
1 µM okto/100 nM FSK	75,99	67,96	69,19
100 µM okto/100 nM FSK	79,61	69,43	67,94
1 µM medetomidiini	59,59	56,22	57,11
100 µM medetomidiini	65,32	50,99	55,25
1 µM mede/100 nM FSK	75,85	71,00	69,00
100 µM mede/100 nM FSK	76,41	75,47	69,04
CHOR3-2			
100 µM FSK	80,85	80,73	84,91
100 nM FSK	29,23	17,11	29,73
1 µM oktopamiini	50,25	47,72	68,17
100 µM oktopamiini	56,70	48,25	61,96
1 µM okto/100 nM FSK	67,04	62,72	65,59
100 µM okto/100 nM FSK	66,07	65,92	70,75
1 µM medetomidiini	46,32	41,84	54,32
100 µM medetomidiini	47,47	40,66	48,82
1 µM mede/100 nM FSK	66,11	62,28	67,83
100 µM mede/100 nM FSK	68,08	60,97	70,17
CHOR3-3			
100 µM FSK	76,88	79,92	80,52
100 nM FSK	11,53	23,70	27,39
1 µM oktopamiini	51,72	51,50	54,05
100 µM oktopamiini	42,75	46,15	51,02
1 µM okto/100 nM FSK	61,45	62,74	64,19
100 µM okto/100 nM FSK	63,57	65,31	66,08
1 µM medetomidiini	44,41	48,67	45,23
100 µM medetomidiini	46,53	50,32	51,91
1 µM mede/100 nM FSK	61,18	63,27	64,12
100 µM mede/100 nM FSK	61,97	64,04	70,33