

$\alpha 2\beta 1$ -INTEGRIINI SPESIFISTEN ENDOSOMAALISTEN RAKENTEIDEN ERISTYS

Maria Korhonen

Opinnäytetyö
Toukokuu 2011

Laboratorioala
Teknologia





Tekijä(t) KORHONEN, Maria	Julkaisun laji Opinnäytetyö	Päivämäärä 19.05.2011
	Sivumäärä 37	Julkaisun kieli Suomi
	Luottamuksellisuus () saakka	Verkojulkaisulupa myönnetty (X)
Työn nimi $\alpha 2\beta 1$ -INTEGRIINI-SPESIFISTEN ENDOSOMAALISTEN RAKENTEIDEN ERISTYS		
Koulutusohjelma Laboratorioala		
Työn ohjaaja(t) SALO, Esa		
Toimeksiantaja(t) Marjomäki, Varpu, Jyväskylän yliopisto, bio- ja ympäristötieteiden laitos, solubiologia		
Tiivistelmä <p>Opinnäytetyö tehtiin Jyväskylän yliopistossa, echovirus 1:tä tutkivassa tutkimusryhmässä. Opinnäytetyön tarkoituksena oli kehittää menetelmä, jossa $\alpha 2\beta 1$-integriini-spesifisiä endosomaalisia rakenteita saataisiin eristettyä solun muista kalvorakenteista. Menetelmän avulla endosytoosireitin rakenteita pystytään karakterisoimaan paremmin.</p> <p>Solujen fraktiointi sekä soluelinten eristäminen on biokemiassa nykyään paljon esillä. Eristämiseen käytettävät menettelytavat ovat kuitenkin melko uusia ja niitä on kehitetty vasta 60-luvulta lähtien. Tämän vuoksi aikaisempia tutkimuksia aiheesta ei ole paljoakaan saatavilla. Eristäminen on kuitenkin biokemiassa tärkeää, sillä puhtaista ja eristetyistä rakenteista pystytään tutkimaan paremmin niiden sisältämiä proteiineja ja lipidejä, ja tätä kautta löytämään mahdollisesti kokonaan uusia ominaisuuksia niiden rakenteille.</p> <p>Tutkimuksessa $\alpha 2\beta 1$-integriini-spesifisiä endosomaalisia rakenteita eristettiin sakkaroosigradientin avulla. Tutkimusta varten tuotettiin, puhdistettiin ja biotinyloitettiin $\alpha 2$-vasta-ainetta. Kokeet tehtiin SAOS-soluilla. $\alpha 2\beta 1$-integriinin soluun sisäänmeno indusoitiin sitomalla solun pinnan $\alpha 2\beta 1$-integriineihin biotinyloitua hiiren anti-integriini $\alpha 2$ vasta-ainetta. Ja tämän jälkeen soluille sidottiin streptavidiinilla päällystetyt polystyreeni helmet. Gradientista syntynyt fraktio sisälsi puhdistettuja, eristettyjä solunsisäisiä rakenteita.</p> <p>Menetelmä, jolla koe suoritettiin, oli onnistunut. $\alpha 2\beta 1$-integriini-spesifiset endosomaaliset rakenteet saatiin eristettyä melko puhtaasti. Kokeessa syntyneistä tuloksista saatiin arvokasta tietoa jatkotutkimuksia ajatellen, ja niitä voidaan hyödyntää myöhemmissä kokeissa.</p>		
Avainsanat (asiasanat) integriini, endosomaaliset rakenteet, eristäminen, sakkaroosi-gradientti		
Muut tiedot		



Author(s) KORHONEN, Maria	Type of publication Bachelor's Thesis	Date 19.05.2011
	Pages 37	Language Finnish
	Confidential () Until	Permission for web publication (X)
Title $\alpha 2 \beta 1$ INTEGRIN-SPECIFIC ENDOSOMAL STRUCTURES ISOLATION		
Degree Programme Laboratory Sciences		
Tutor(s) SALO, Esa		
Assigned by MARJOMÄKI, Varpu, University of Jyväskylä		
Abstract <p>The bachelor's thesis was done at the University of Jyväskylä in a research group which is doing research with Echovirus 1 (EV1). The aim of the bachelor's thesis was to develop a method to isolate $\alpha 2 \beta 1$ integrin-specific endosomal structures of other membrane structures. By the help of this method the structures of endocytosis route can be characterized better.</p> <p>Nowadays fractionation of cells and isolation of cell bodies is much discussed in biochemistry. Isolation procedures are fairly new and have been developed since the 60s. Because of that there is not that many previous research results available. Lipids and proteins contained in structures are easier to research when they are pure and isolated. That is why isolation is important in biochemistry. By that way it might be possible to find new features in those structures.</p> <p>In the research $\alpha 2 \beta 1$ integrin-specific endosomal structures were isolated by the saccarose gradient. For the study $\alpha 2$-antibody was produced, purified and biotinylated. The tests were made by SAOS-cells. The cell entry of $\alpha 2 \beta 1$-integrin was induced by binding to the cell surface integrins $\alpha 2 \beta 1$-biotinylated mouse anti-integrin $\alpha 2$-antibody. After that streptavidin-coated polystyrene beads were bound to the cells. The fraction formed by the gradient included purified, isolated intracellular structures.</p> <p>The method was successful. The $\alpha 2 \beta 1$-integrin spesific endosomal structures were isolated relatively pure. The method gives valuable information for further investigation and the results can be used in subsequent experiments.</p>		
Keywords integrin, endosomal structures, isolation, saccarosegradient		
Miscellaneous		

SISÄLTÖ

1 JOHDANTO	4
2 SOLUN KALVORAKENTEET	4
2.1 Solukalvo	4
2.2 Reseptorit	5
2.3 Integriini	7
3 ENDOSYTOOSI	8
3.1 Endosytoosin eri muodot	9
3.2 Makropinosytoosi	11
4 SOLUNSISÄISTEN ENDOSOMIEN ERISTYS	14
5 MATERIAALIT JA MENETELMÄT	14
5.1 Solulinjat	15
5.2 Vasta-aineet	15
5.3 Vasta-aineen tuotto	16
5.4 Vasta-aineen puhdistus	17
5.5 Vasta-aineen biotinylointi	17
5.6 Streptavidiinipäällysteisten beadien eri laimennosten vertailu	18
5.7 Sakkaroosigradientti SAOS-soluille	19
5.8 Geelijažo ja blottaus	20
5.9 Eri markkereiden testaukset	21
5.10 Proteiinipitoisuuksien määrittäminen mikrotiiterilevyllä	22
5.11 EM-kuljetus	23
5.12 EM-Hilat	24
6 TULOKSET	24
6.1 Vasta-aineiden tuotto, biotinylointi ja eristys	24

	2
6.2 Streptavidiini-helmien käyttö $\alpha 2\beta 1$ -integriinin kulkeutumisen seuraamiseen	26
6.3 Integriinirakenteiden eristäminen sakkaroosigradientilla	29
6.4 Gradienttirakenteiden puhtauden arviointi elektronimikroskoopilla	31
6.5 Proteiinimittaus	33
7 POHDINTA	34
LÄHTEET	36

KUVIOT

KUVIO 1. Solukalvon rakenne	5
KUVIO 2. Solunsisäisen viestinvälitysjärjestelmän aktivoituminen	6
KUVIO 3. Integriinin rakenne	7
KUVIO 4. Klatriinivälitteinen endosytoosi	10
KUVIO 5. Kaveolivälitteinen endosytoosi	11
KUVIO 6. Kalvon poimuuntuminen aktiinitukirangan avulla	12
KUVIO 7. Makropinosytoosi	13
KUVIO 8. Konfokaalimikroskooppikuvia $\alpha 2\beta 1$ -integriinikasautumista.	26
KUVIO 9. Streptavidiini-helmien testaaminen $\alpha 2\beta 1$ -integriinin kulkeutumisen seuraamiseen eri laimennoksilla	27
KUVIO 10. Streptavidiini-helmien testaaminen $\alpha 2\beta 1$ -integriinin kulkeutumisen seuraamiseen eri laimennoksilla. Toinen koe.	28
KUVIO 11. Sakkaroosigradientti	30
KUVIO 12. Blottivärjäyksen tulos	31
KUVIO 13. Näytteiden puhtauden arviointia elektronimikroskopian avulla	32
KUVIO 14. Elektronimikroskooppikuva	32

KUVIO 15. Elektronimikroskooppikuva.....	33
--	----

TAULUKOT

TAULUKKO 1. Kokeissa käytetyt primaari- ja sekundaarivasta-aineet ja muut vasta-aineiden tapaan käytetyt konjugoidut reagenssit.....	16
TAULUKKO 2. Blottausta varten valmistetut näytteet	20
TAULUKKO 3. Näytteiden proteiinipitoisuudet	34

1 JOHDANTO

Opinnäytetyö tehtiin Jyväskylän yliopiston bio- ja ympäristötieteiden laitoksella solubiologian osastolla toimivalle ryhmälle, jonka tutkimus keskittyy Echovirus 1:n (EV1) tutkimuksiin. Ryhmän johtajana toimii FT, akatemiatutkija, dosentti Varpu Marjomäki. Tutkimusryhmässä työskentelee johtajan lisäksi assistentti sekä kolme tohtorikoulutettavaa. Ryhmä on saanut arvokasta tietoa viruksista tutkimuksen kuluessa.

Opinnäytetyössäni oli tarkoitus kehittää menetelmää, jossa $\alpha 2\beta 1$ -integroini-spesifisiä endosomaalisia rakenteita saataisiin eristettyä solun muista kalvorakenteista.

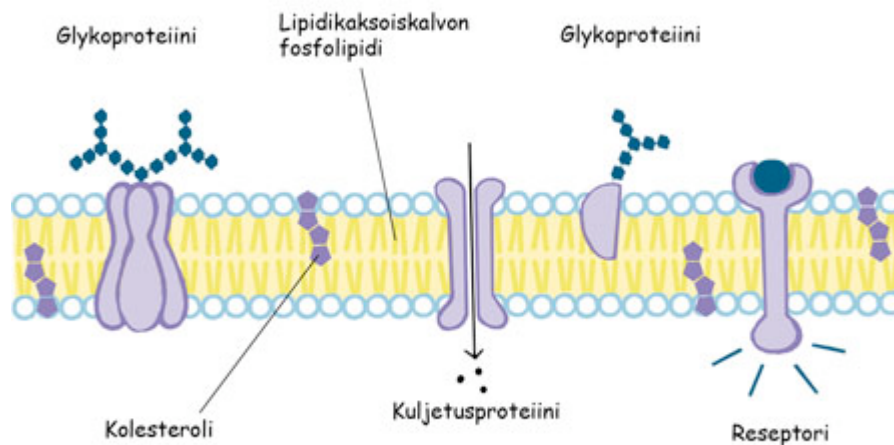
2 SOLUN KALVORAKENTEET

2.1 Solukalvo

Solukalvo on soluja rajaava puoliläpäisevä kalvo, joka muodostuu kaksoiskerroksesta lipidejä. Suurin osa lipideistä kuuluu fosfolipidien ryhmään, mutta solukalvossa on myös kolesterolia. Tämän lisäksi solukalvolla on suuri määrä erilaisia proteiineja, kuten reseptoreja. (ks. KUVIO 1) (Solukalvo 2006)

Solu kiinnittyy toisiin soluihin ja tyvikalvoon sekä solun sisäiseen tukirankaan solukalvolla olevien proteiinien avulla. Monissa solukalvon proteiineissa on myös kiinnittyneenä sokeriketjuja (ks. kuvio 1). Vain jotkut pienmolekyylit

pääsevät kulkemaan solukalvon läpi osmoottisesti. Suurin osa kalvoliikentestä on säädeltyä. Solukalvolla on proteiinien muodostamia säädeltyjä kanavia esimerkiksi erilaisille ioneille ja sokereille. Tämä mahdollistaa sen, että solu voi säilyttää sisällään itselleen optimaaliset olosuhteet, jotka poikkeavat solun ulkopuolella vallitsevista olosuhteista. (Solukalvo 2006)



KUVIO 1. Solukalvon rakenne (Solukalvo 2006)

2.2 Reseptorit

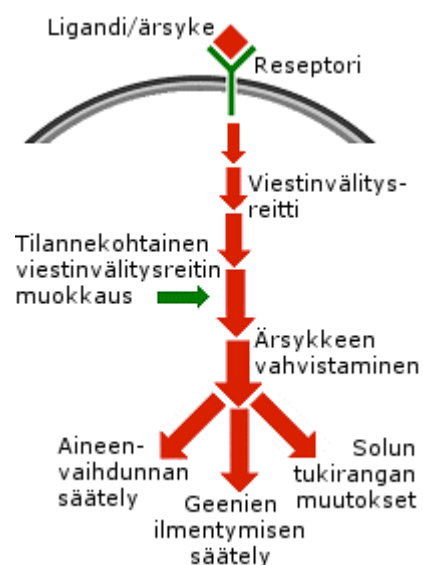
Solujen välinen viestintä perustuu viestin lähettäjäsolun tuottamaan viestimolekyylin ja viestin vastaanottajasolun ilmentämän reseptoriproteiinien kohtaamiseen. Viestimolekyylit vaikuttavat vain niihin soluihin, joissa on viestin vastaanottamiseen erikoistunut reseptori. (Reseptorit ja viestimolekyylit 2006)

Viestimolekyylit voivat olla proteiineja, peptidejä, aminohappoja, steroideja tai kaasumaisia yhdisteitä. Hydrofobiset eli rasvaliukoiset ja kaasumaiset aineet kulkeutuvat solukalvon läpi, mutta vesiliukoiset eivät läpäise kalvoa, joten

niiden reseptorit sijaitsevat solukalvolla. Viesti välittyy soluun toisiolähehtien välityksellä. (Reseptorit ja viestimolekyylit 2006)

Reseptorit voivat vastaanottajasolussa sijaita joko solukalvolla, solun sytoplasmassa tai tumassa. Solukalvoreseptorin viesti välittyy solussa solunsisäisten viestinvälitysketjujen avulla ja vaikutukset voivat kohdistua solun toiminnan säätelyyn joko proteiini- tai geenitasolla. Sytoplasmassa tai tumassa sijaitsevat tumareseptorit sitoutuvat DNA:han ja vaikuttavat solun geenien ilmenemiseen. (Reseptorit ja viestimolekyylit 2006)

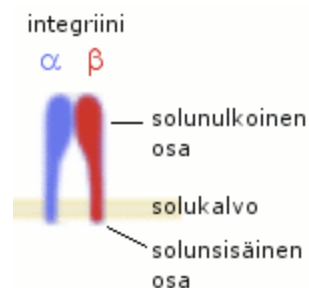
Solukalvoreseptorit sisältävät aina seuraavat kolme rakenteellista osaa: ligandin sitova osa ulkopuolella, yksi tai useampi solukalvon läpäisevä osa sekä toisiolähetettä aktivoiva osa solun sisäpuolella. Solukalvolla sijaitsevat reseptorit jaetaan kolmeen eri ryhmään viestinvälitysmekanisminsa mukaisesti: Ionikanavareseptorit, G-proteiinikytkennäiset reseptorit sekä entsyymejä aktivoivat reseptorit. (Solukalvoreseptorit 2006)



KUVIO 2. Solunsisäisen viestinvälitysjärjestelmän aktivoituminen (Viestinvälitys 2006)

2.3 Integriini

Integriinit ovat rakenteellisesti, toiminnallisesti ja immunokemiallisesti samankaltaisia solun pinnan glykoproteiinireseptoreita, jotka välittävät solu-soluväliaine- sekä solu-soluadheesioita. Sen lisäksi, että ne toimivat mekaanisena linkkinä solutukirangan ja solunulkoisten ligandien välillä, integriinit osallistuvat signaalinsiirtäjinä myös solun jakautumiseen, liikkumiseen ja erilaistumiseen. Integriinien heterodimeerinen rakenne koostuu α - ja β -alaysiköistä, jotka sitoutuvat toisiinsa ei-kovalenttisesti muodostaen 24 erilaista integriinireseptoria. Integriinit voidaan jakaa vielä alaryhmiin β -alaysiköiden, ligandinsitomiskyvyn sekä α -alaysiköiden rakenteellisten samankaltaisuuksien perusteella (Hynes, 1992 ; Plow, Haas, Zhang, Loftus & Smith. 2000). Solunulkoisen tilan proteiinit, kuten kollageenit, laminiinit ja fibronektiinit, sekä myös monet immunoglobuliineihin kuuluvat adheesioproteiinit toimivat integriinien luonnollisina ligandeina. Integriinit tunnistavat usein ligandeistaan kolmen aminohapon pituisen arginiini-glysiini-aspartaattihappojakson, mutta useimpien integriinien tunnistus on silti tästä jaksosta riippumatonta (Pierschbacher & Ruoslahti, 1984).



KUVIO 3. Integriinin rakenne [Soluväliainereseptorit (integriinit) 2006]

Integriinit yhdistävät, solun sisäiseen viestintäjärjestelmään osallistuvat, valkuaisaineet solun ympäristöön. Tämä vuorovaikutus on kaksisuuntaista

viestien kulkiessa ympäristöstä solun sisään ja toisaalta solusta ympäristöön integriinien aktiivisuuden säätelyn muodossa. Integriinit osallistuvat kahteen erilaiseen solun ja soluväliaineen liitokseen, paikallisiin sitoutumiskohtiin sekä hemidesmosomeihin. Paikallisissa sitoutumiskohdissa integriinit sitoutuvat solussa välittäjämolekyylien avulla aktiinisäikeisiin ja soluväliaineessa fibronektiiniin. Hemidesmosomeissa integriinit sitoutuvat solun sisällä välittäjämolekyylien avulla välikokoisiin säikeisiin ja solun ulkopuolella tyvikalvon laminiiniin.

Useimpia integriinejä ilmennetään monissa erilaisissa soluissa ja useimmat solut ilmentävät useita erilaisia integriinejä. Useita erilaisia integriinejä tarvitaan, koska erilaiset integriiniheterodimeerit sitoutuvat eri ligandeihin tai samoihin ligandeihin eri voimakkuuksilla. Integriinit poikkeavat esim. hormonireseptoreista kohtalaisen heikon sitoutumisaffiniteettinsa ja korkean lukumääränsä osalta. Kun solulla on lukuisia tarttumiskohtia väliaineen molekyyliin, solut voivat tunnustella ympäristön tilaa kuitenkin menettämättä täysin otettaan siihen. Liian tiukka sitoutuminen todennäköisesti kiinnittäisi solut paikoilleen palautumattomasti.

3 ENDOSYTOOSI

Nisäkässolut käyttävät useita eri tapoja kuljettaakseen solun ulkopuolista materiaalia solun sisään. Näille eri tavoille käytetään yhteistä nimitystä endosytoosi. Endosytoosi on siis aineiden aktiivista siirtämistä solun ulkopuolelta sisäpuolelle. Endosytoosi voi olla joko pienten nestepisaroiden kuljettamista eli pinosytoosia tai kiinteiden hiukkasten kuljettamista eli fagosytoosia. Fagosytoosissa solun sisään otetaan suuria partikkeleita, kuten bakteereita, ja pinosytoosissa nesteitä ja nesteisiin liuenneita aineita. Pinosytoosi voidaan jakaa neljään eri perusmekanismiin: makropinosytoosi, klatriini-välitteinen endosytoosi, kaveoli-välitteinen endosytoosi sekä

klatriinista ja kaveolista riippumaton endosytoosi. Fagosytoosia tapahtuu tyypillisesti vain nisäkässoluissa kun taas pinosytoosia tapahtuu kaikissa soluissa. (Conner & Schmid 2003)

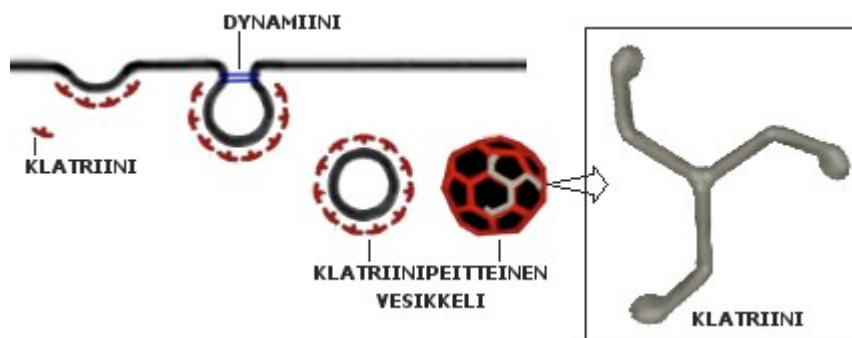
Edellytyksenä endosytoosin toiminnalle on, että siirrettävä aine tarttuu solukalvoon ja reagoi siinä olevien reseptoreiden kanssa. (Biologian sanakirja 2001, 140) Aineiden kuljettaminen tapahtuu solukalvosta muodostuneiden kalvorakkuloiden sisällä. Pieni alue solukalvoa kuroutuu sytoplasmaan päin sulkien sisäänsä pienen nestetilavuuden ja solukalvon ulkopinnalle mahdollisesti sitoutuneet molekyylit. Kuroutuman irrotessa solukalvosta muodostuu endosomiksi kutsuttu rakkula, joka kuljettaa sisään otettuja molekyylejä eteenpäin liikkuaan solun sisäosiin, ja rakkuloiden kalvojen yhtyessä luovuttaa ne toisille rakkuloille, esimerkiksi lysosomeille, joiden sisältämät entsyymit muokkaavat tai hajottavat sisään tulleen aineen solun käyttöön. Endosomi toimii tavallaan solukalvon jatkeena mahdollistaen solun ulkopuolisten molekyylien pääsyn syväälle sytoplasmaan. (Heino 2004, 76)

3.1 Endosytoosin eri muodot

Klatrinivälitteinen endosytoosi

Klatrinivälitteinen endosytoosi on pääreitti solun ulkopuolisten ligandien ja solukalvon komponenttien kierrättämiseen. Sitä tapahtuu kaikissa nisäkässoluissa, ja se vastaa välttämättömien ravintoaineiden jatkuvasta sisäänotosta. Reseptorivälitteisessä, klatrinista riippuvaisessa endosytoosissa molekyylit sitoutuvat soluun spesifisten reseptorimolekyylien avulla. Muodostunut reseptori-ligandikompleksi saa aikaan klatrinipäälysteisen kuopakkeen kuroutumisen irti solukalvolta. Klatrinipäälyste on kolmihaarainen rakenne, joka muodostuu kolmesta klatrinin raskaasta ja kevyestä ketjusta. Ketjut muodostavat häkkimäisen rakenteen, jonka

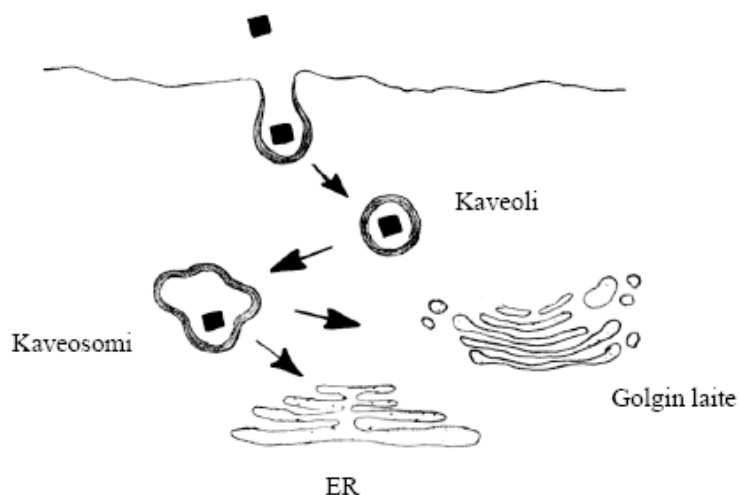
kokoamisessa avustavat kokoajaproteiinit. ks. kuvio 4.) (Conner & Schmid 2003)



KUVIO 4. Klatriinivälitteinen endosytoosi (Klatriinivälitteinen endosytoosi 2006)

Kaveolivälitteinen endosytoosi

Kaveolit ovat solukalvosta muodostuneita pyöreitä kuopakkeita, jotka ovat kooltaan 50 - 80 nm. Niiden koostumus, ilmeneminen ja toiminta ovat solutyypistä riippuvaisia. Kuopakkeita peittää kaveoliini-1-niminen markkeriproteiini (21 kDa), joka sitoo kolesterolia, muodostaa silmukan solukalvon sisäpuolelle ja peittää kuopakkeen juovamaisella rakenteella. Kaveolivälitteistä endosytoosia käyttävät mm. solukomponentit (esim. glykosfingolipidit), solun ulkoiset ligandit (esim. albumiini), bakteerimyrkyt sekä monet vaipattomat virukset (esim. Simian virus 40). (Pelkmans ja Helenius, 2002) Irrottuaan solukalvolta kaveoli vaeltaa ER:ään, josta sen sisältö jatkaa edelleen määränpäähensä. (Ks. Kuvio 5.) (Flint ym. 2000)



KUVIO 5. Kaveolivälitteinen endosytoosi (Kakkonen 2007, 14)

Klatriinista ja kaveolista riippumaton endosytoosi

Klatriinista ja kaveolista riippumaton endosytoosi on vielä huonosti tunnettu. Endosytoosiin liittyvät rakenteet, "lautat" ovat pieniä, halkaisijaltaan 40 - 50 nm ja sijaitsevat hajanaisesti solun pinnalla. Klatriinista riippumatonta endosytoosia tapahtuu mm. neuroneissa ja imusoluissa. (Conner & Schmid 2003)

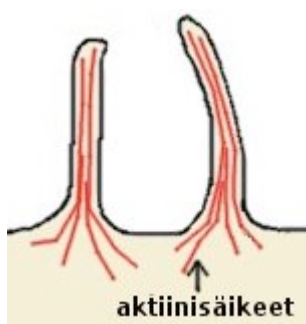
3.2 Makropinosytoosi

Makropinosytoosi eroaa huomattavasti muista endosytoosimekanismeista, ja se voidaan luokitella myös klatriinista ja kaveolista riippumattomiin reitteihin. Makropinosytoosi on aktiinista riippuva mekanismi, joka laukeaa vasteena solun saamalle stimulaatiolle. Tämän seurauksena solukalvo poimuuntuu valejalkojen avulla, ja solun sisään muodostuu vesikkeleitä, makropinosomeja. Makropinosomit ovat muodoltaan epäsäännöllisiä ja suurempia kuin muut endosytoottiset rakkulat. Niiden koko vaihtelee 0,2 ja 5 μm :n välillä. Suuren kokonsa ansiosta makropinosomit tarjoavaktin tehokkaan, ei-spesifisen

menetelmän makromolekyylien kuljettamiseen sytoplasmasta solun sisään.
(Swanson & Watts 1995)

Makropinosytoosi toimii monissa eri toiminnoissa, kuten signaalintimolekyylien aktivaation säännöstelyssä, soluvaelluksessa sekä osana hermosolujen immuunipuolustusta. Lisäksi jotkin bakteerit erittävät myrkkyä, joka aktivoi makropinosytoosia, ja varmistavat näin pääsynsä solun sisälle. (Conner & Schmid 2003)

Makropinosomien muodostuminen tapahtuu kalvoalueilla, joissa kalvo poimuttuu aktiinitukirangan avulla. Solun saama signaali saa aikaan solukalvon rypyttymisen ulospäin ”valejaloiksi”. (Ks. kuvio 6). Valejalat kuroutuvat umpeen ja sulkevat sisäänsä solun sisään otettavan aineen, muodostaen solukalvon pintaan makropinosomin. (Conner & Schmid 2003) Makropinosomi irtoaa solukalvolta solunsisäiseksi vesikkeliksi ja solukalvo fuusioituu takaisin umpeen. Makropinosomin muodostuttua se etenee solussa, ja sen pinnalla oleva aktiini pitää poistaa, jotta fuusioituminen ja interaktio muiden soluelinten kanssa on mahdollista (Swanson & Watts 1995).

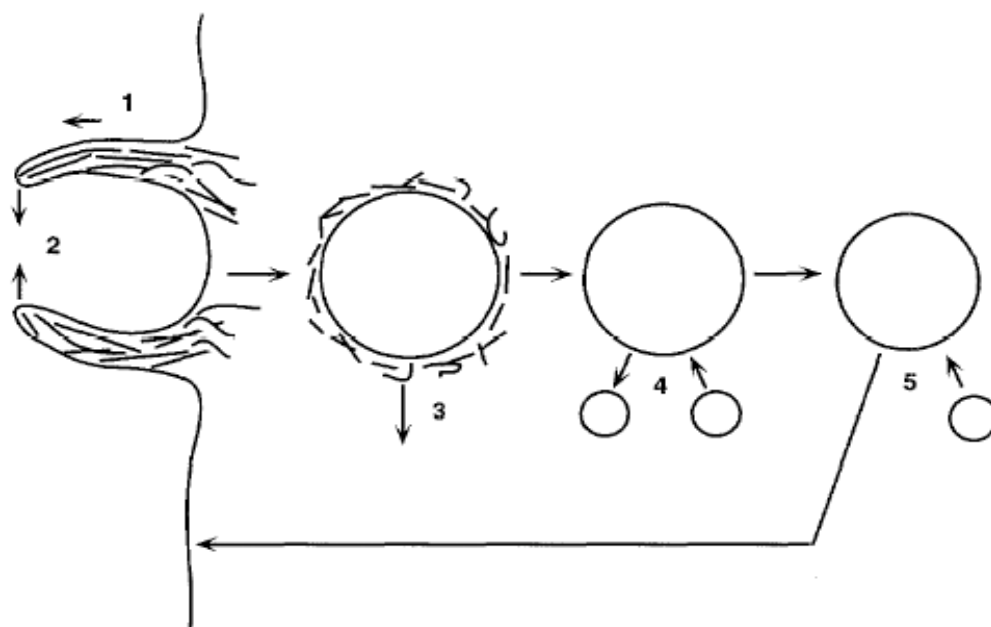


KUVIO 6. Kalvon poimuuntuminen aktiinitukirangan avulla

Joissain solutyypeissä, kuten antigeenejä ilmentävissä soluissa, makropinosytoosia tapahtuu jatkuvasti, kun taas toisissa solutyypeissä makropinosytoosi saa alkunsa kasvutekijöiden tai muiden signaalien

vasteena, jotka laukaisevat aktiini-välitteisen kalvon ulkoneman. (Araki ym. 2007)

Se, mitä muodostuneelle rakkulalle tapahtuu solun sisällä, riippuu solutyypistä ja solun kulloisestakin vaiheesta. Osa makropinosomeista esimerkiksi yhtyy toisiin makropinosomeihin tai toisten endosytoosireittien rakkuloihin (Hewlett ym 1994) Osa taas kulkeutuu lysosomaaliselle verkostolle (Araki ym. 2007) ja osa näyttäisi palautuvan takaisin solukalvolle. Kuviossa 7 on havainnollistettu makropinosytoosin eteneminen.



KUVIO 7. Makropinosytoosi 1. Valejalkojen muodostuminen solukalvolla. 2. Poimujen sulkeutuminen ulommaisten reunusten muodostaessa vesikkeileitä. 3. F-aktiinin poistaminen makropinosomista 4. Interaktio muiden soluelinten kanssa ja 5. Käsittely kierrättämällä solukalvolle tai eri soluelinten kanssa yhdistyminen. (Swanson & Watts 1995)

4 SOLUNSISÄISTEN ENDOSOMIEN ERISTYS

Solujen fraktiointi ja soluelinten eristäminen ovat jatkuvasti esillä biokemiassa. Solunsisäisten organellien puhdistamisessa on tapahtunut huomattavaa kehitystä, ja vasta hiljattain mitokondrioiden ja lysosomien puhdistamisesta kudosisäilytys soluista on tullut rutiinin omaista. Monet solunsisäisten organellien eristämiseksi käytetyt menetelmät on kehitetty vasta kuluneiden 40 vuoden aikana. Yleisimmin käytetään koko- ja tiheyseroihin perustuvia menetelmiä, koska niissä käytetään yleisesti saatavilla olevia välineitä sekä niitä voidaan hyvin soveltaa laboratorioissa. Viime vuosina on kehitetty myös menetelmiä, jotka perustuvat organellien varaukseen tai antigeenisiin ominaisuuksiin, ongelmana näissä menetelmissä on kalliit laitteet tai immunologiset reagenssit, joita on rajoitetusti saatavilla. (Storrie & Maddie 1990)

5 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

Työssä kehitettiin menetelmää, jossa $\alpha 2\beta 1$ -integroonin spesifisiä endosomaalisia rakenteita saataisiin eristettyä solun muista kalvorakenteista. Työssä käytettiin hyväksi tälle integroonille spesifisiä vasta-aineita, joita tuotettiin ja puhdistettiin hybridomasoluista. Nämä vasta-aineet biotinyloitettiin ja lisättiin soluille. Streptavidiinilla päällystettyjä latex-helmiä sidottiin tämän jälkeen solun pinnalle ja tämä vasta-aine-helmi-kompleksi syötettiin solun sisäisiin rakenteisiin inkuboidulla soluilla lämpimässä. Solut hajotettiin ja kalvorakenteita erotettiin sentrifugaatiolla sakkaroosi-flotaatiogradientissa. Fraktiot erotettiin SDS-PAGE-geelissä, blotattiin ja fraktioiden proteiinikoostumusta tarkastettiin blotin vasta-ainevärijäyksillä.

5.1 Solulinjat

Kokeissa käytettävää $\alpha 2$ -vasta-ainetta tuotettiin A211E10 hybridooma-soluissa. Hybridoomasolu on kasvainsolun ja vasta-ainetta tuottavan imusolun somaattinen fuusio. Hybridoomasoluja käytetään monoklonaalisten vasta-aineiden tuottamiseen soluviljelmässä. A211E10 hybridoomat ovat hiiren vasta-ainetta tuottavia soluja. Soluja kasvatettiin RPMI-mediumissa, johon lisättiin 10 % FBS seerumia (Fetal Bovine Serum, Gibco), 1 % penisilliini-streptomycesiä, 1 % l-glutamiinia ja 1 % Non Essential Aminoacidsia. Hybridoma enhancing supplementia lisättiin aluksi 10 % helpottamaan solujen kasvua alhaisessa solujen tiheydessä. Soluja kasvatettiin aluksi 25 cm²:n kasvatuspulloissa, kunnes solujen määrä oli kasvanut, ja tämän jälkeen 56,7 cm²:n kasvatuspulloissa + 37 asteessa inkubaattorissa, jossa hiilidioksidipitoisuus oli 5 %.

Työtä varten tehdyt kokeet suoritettiin ihmisen luusyöpäsolulinjalla eli SAOS-soluilla. Tutkimuksissa käytettiin SAOS- $\alpha 245$ -solukloonina. Soluja kasvatettiin DMEM-kasvatusmediumissa, johon lisättiin 10 % FBS-seerumia (Fetal Bovine Serum, Gibco), 1 % penisilliini-streptomycesiä ja 1 % l-glutamiinia. Selektioreagenssina käytettiin Geneticiniä 0,5 mg/ml. Soluja kasvatettiin 56,7 cm²:n kasvatuspulloissa + 37 asteessa inkubaattorissa, jossa hiilidioksidipitoisuus oli 5 %.

5.2 Vasta-aineet

Kokeissa käytetyt primaari- ja sekundaarivasta-aineet ja muut vasta-aineiden tapaan käytetyt konjugoidut reagenssit on lueteltu taulukossa 1.

Primaarivasta-aineiden pitkäaikainen säilytys tapahtuu -20 °C:ssa ja käyttöönoton jälkeen +4 °C:ssa. Ennen käyttöönottoa kaupallisiin Alexa Fluor-konjugoituihin sekundaarivasta-aineisiin on lisätty 99,5 % glyserolia

suhteessa 1:2. Muut sekundaarivasta-aineet on jaettu pieniin eriin sellaisenaan. Kaikkia sekundaarivasta-aineita säilytetään -20 °C:ssa. Vasta-aineet laimennettiin joko 1 % DMEM:iin tai 3 % BSA:ta sisältävään PBS:ään.

TAULUKKO 1. Kokeissa käytetyt primaari- ja sekundaarivasta-aineet ja muut vasta-aineiden tapaan käytetyt konjugoidut reagenssit

Vasta-aine / reagenssi	Laimennos	Lähde / Valmistaja
Primaarivasta-aineet		
Hiiren anti-humaani integriini $\alpha 2$ IgG (A211E10, mAb)	1:200	Oma tuotto
Biotiinikonjugoitu hiiren anti-humaani integriini $\alpha 2$ IgG (A211E10, mAb)	1:200	Oma tuotto ja konjugointi
CI-MPR(Human) vasta-aine	1:200	
Sekundaarivasta-aineet		
Vuohen anti-hiiri IgG, Alexa Fluor 555	1:200 ; 1:750	Invitrogen Molecular Probes
Vuohen anti-kani IgG, Alexa Fluor 488	1:200	Invitrogen Molecular Probes
Vuohen anti-hiiri IgG, HRP	1:2000	Bio-Rad Laboratories
kanin anti-hiiri	1:750	Sigma
Muut konjugoidut reagenssit		
Streptavidini, Alexa Fluor 488	1:200	Invitrogen Molecular Probes
Aikaisten endosomien vasta-aine 1 (EEA11:100)	1:100	Transduction Laboratories
CD-63 vasta-aine	1:100	Zymed
kultapartikkelit	1:70	Hilkka Reunanen 12/07

5.3 Vasta-aineen tuotto

Vasta-ainetta tuotettiin A211E10-hybridooma-soluissa. Solut kasvatettiin 10 - prosenttisessa RPMI-mediumissa kofluenteiksi. Massaamisen jälkeen solut laitettiin tuottumaan seerumittomaan RPMI-mediumiin. Solujen annettiin kasvaa seerumittomassa mediumissa noin viiden päivän ajan, minkä jälkeen solut ja supernatantti kerättiin Nunceihin, fuugattiin solut pohjaan 1500 rpm 3 minuuttia ja supernatantti kerättiin talteen puhtaisiin Nunceihin ja säilytettiin jatkokäsittelyä varten + 4 °C:ssa.

5.4 Vasta-aineen puhdistus

Vasta-aineen tuotosta saadut supernatantit puhdistettiin kromatografiaa hyväksi käyttäen. 1 ml Fast-Flow -sepharosia pipetoitiin Nunciin, ja pestiin 30 ml:llä natriumfosfaattipuskuria pH 7 fuugamalla sepharosia 5 min 2000 rpm. Sefarosin päälle suodatettiin supernatantti 0,22 µm suodattimen lävitse ja laitettiin sitoutumaan yön yli + 4 °C:seen rotaatiopyörytykseen.

Seuraavana päivänä sitoutumassa ollut sepharosia fuugattiin pohjaan 2000 rpm 5 min ja materiaali siirrettiin pasteuripipetin avulla pylvääseen. Pylväässä sepharosia pestiin 3 kertaa 1 ml Na-fosfaattipuskurilla, ja tämän jälkeen eluointiin 7 ml:llä 0,1 M glysiiniä pH 2.7. Fraktiot kerättiin 1 ml:n eriin 1,5 ml:n eppendorf-putkiin, joissa pohjalla 100 µl 1 M Tris-HCL puskuria pH 9.0.

Eluoinnin päätteeksi sepharosia pestiin vielä pylväässä 2 kertaa 6 ml:llä natrium-fosfaattipuskuria ja laitettiin sepharosia joko vaihtoehtoisesti sitoutumaan uuteen erään puhdistamatonta supernatanttia tai säilytykseen 20 % etanoliin + 4 °C:een. Kaikkiaan tuotettua α2-vasta-ainetta puhdistettiin 9. erää. Fraktioiden pitoisuudet mitattiin NanoDrop -laitteella. Osa puhdistetusta vasta-aineesta säilöttiin -20 °C:een käyttöä varten, ja osa biotinyloitiin.

5.5 Vasta-aineen biotinylointi

Osa puhdistetusta vasta-aineesta biotinyloitiin. Ensimmäisessä erässä dialysoitiin 6 ml 1,01 mg/ml vahvuista vasta-ainetta. Dialysoinnissa vasta-ainetta pipetoitiin dialysointiletkuun, joka laitettiin 0,1 M NaHCO³ puskuriin pH 8.4. Puskuria vaihdettiin kolmesti, ensin muutaman tunnin välein, ja viimeisen annettiin olla yön yli +4 asteessa magneettisekoittajassa.

Seuraavana päivänä puskuri vaihdettiin vielä kerran. 25 mg/ml Biotiini-DMSO:ta lisättiin suhteessa 1:8 vasta-aineen määrästä dialysoidyn vasta-aineen joukkoon, ja inkuboitiin 2 tuntia keikutuksessa. Pysäytys tapahtui 600 µl 0,2 M glysiiniä pH 8.0 30 minuutin ajan huoneenlämmössä. Biotinyloitua vasta-ainetta dialysoitiin vielä 1xPBS:ssä +4 °C:ssa magneettisekoittajassa. Tämän jälkeen letku purettiin ja biotinyloitu vasta-aine otettiin talteen eppendorf-putkiin, ja säilöttiin -20 asteessa.

5.6 Streptavidinipäällysteisten beadien eri laimennosten vertailu

SAOS-soluja siirrostettiin koetta edeltävänä päivänä maljoille. $\alpha 2\beta 1$ -integriinin soluun sisään meno indusoitiin sitomalla solun pinnan $\alpha 2\beta 1$ -integriineihin ensin 1 tunti jäällä keikutuksessa biotinyloitua hiiren anti-integriini- $\alpha 2$ -vasta-aine laimennettuna DMEM:iin (1 % FBS). Kontrolli-soluille lisättiin samassa suhteessa pelkkä DMEM (1 % FBS).

Tämän jälkeen soluille sidottiin streptavidiinilla päällystetyt polystyreeni helmet 1 tunti jäällä keiussa. Kokeessa streptavidini helmistä käytettiin kolmea eri laimennosta 1:2, 1:5 ja 1:20.

Vuohen anti-hiiri sekundaarivasta-aine lisättiin soluille helmien jälkeen laimennettuna 1:750 DMEM:iin (1 % FBS) ja inkuboitiin 30 minuuttia jäällä keiussa. Jokaisen inkubaation jälkeen solut pestiin kolmesti PBS-puskurilla, johon oli lisätty 0,5 % BSA. Integriini-vasta-aine kasauman sisään meno saatiin aikaan lisäämällä täydellistä mediumia (10 % FBS) ja siirtämällä maljat lämpökaappiin +37 °C kahden tunnin ajaksi. Solut fiksattiin 4 % paraformaldehydillä 30 minuuttia huoneen lämmössä.

Lisäksi tehtiin toinen koe, jossa käytettiin streptavidiini helmien laimennoksia 1:5 ja 1:20. Koe suoritettiin samoin kuin edellinen, mutta solut leimattiin sekundaarivasta-aineella vasta permeabilisoinnin jälkeen. Solujen fiksauksen jälkeen solut permeabilisoitiin 5 minuutin ajan PBS:ään laimennetulla 0,2 % Triton-X-100:lla, ja leimattiin vuohen anti-hiiri vasta-aineella laimennettuna 1:200 PBS:ään laimennetulla 3 % BSA:lla.

5.7 Sakkaroosigradientti SAOS-soluille

Gradienttikoeita varten SAOS- α 245-soluja siirrostettiin koetta edeltävänä päivänä 56,7 cm² maljoille. Koe suoritettiin samoin kuin edellä mainittu koe, paitsi 2 tunnin vasta-aineen sisälle menon jälkeen maljat siirrettiin jälle ja skreipattiin Nunciin.

Maljoilta skreipatut solut fuugattiin pohjaan 1000 rpm 5 minuuttia. Imettiin PBS pois ja pakastettiin.

Seuraavana päivänä integriinin syöttö tehtiin toiselle osalle maljoista, ja solut skreipattiin samaan Nunc- putkeen. Solut fuugattiin pohjaan, imettiin PBS pois ja resuspenoitettiin solut 450 μ l homogointipuskuria, johon oli lisätty 1:1000 proteaasi-inhibiittoria. Solut homogoinnitiin 1 ml ruiskulla ja 23 G neulalla 30 kertaa edestakaisin, jotta saatiin solujen rakenne hajoamaan.

Näyte sekoitettiin 2.5 M sakkaroosiin suhteessa 1:1 siten, että 400 μ l homogonaattia lisättiin 400 μ l sakkaroosia. Gradientti kasattiin sentrifuugiputkeen siten, että pohjalle laitettiin 800 μ l näytettä, näytteen päälle 3 ml 25 % sakkaroosia ja päällimmäiseen kerrokseen 1 ml homogointipus-

kuria. Gradientit ajettiin ultrafuugilla SW55Ti roottorilla 1 tunti 325 000 rpm +4 °C:ssa. Gradienttiin 25 % sakkaroosin ja homogointipuskurin välille muodostunut sininen alue otettiin talteen 4x100 µl:n erissä. Lisäksi otettiin 100 µl:n näytteet 2.5 M sakkaroosikerroksesta sekä pohjalle muodostuneesta pellettistä 100 µl:n näyte.

5.8 Geeliajo ja blottaus

Geelin valaminen

TEMED lisättiin juuri ennen valamista. Alageeli pipetoitiin kahden lasin väliin, ja annettiin jähmettyä. Tämän jälkeen pipetoitiin ylägeeli. Geeliin työnnettiin kampa, joka muodosti kaivot.

Näytteiden valmistus

Näytteet valmistettiin taulukon 2 mukaisesti. Tämän jälkeen näytteitä keitettiin 100 °C:n vesihautessa 3 minuutin ajan, vorteksoitiin ja spinnattiin 5 minuuttia.

TAULUKKO 2. Blottausta varten valmistetut näytteet

Kaivo	1. geeli	2.geeli	näyte (µl)	5xLaemmi (µl)
3	α2 homogenaatti	C homogenaatti	30	7,5
4	α2 1. näyte	C 1. näyte	40	10
5	α2 2. näyte	C 2. näyte	40	10
6	α2 3. näyte	C 3. näyte	40	10
7	α2 4. näyte	C 4. näyte	40	10
8	α2 sakkaroosi	C sakkaroosi	40	10
9	α2 pelletti	C pelletti	pelletti	40 (2xLaemmi)

α2 = soluille lisätty α2β1 -integroini
C = Kontrollisolut

SDS-page geelija

Gradienttikokeen onnistumista kontrolloitiin SDS-PAGE-geelielektrofoesilla ja immunoblottauksella. Näytteet eroteltiin 7,5 % SDS-polyakryyliamidigeelillä ja elektroblotattiin polyvinyylidifluoridi-kalvolle. Blotatuista proteiineista epäspesifiset sitoutumiskohdat poistettiin 5 % maitojauhetta sisältävällä TBS-TWEEN-liuoksella ja annettiin inkuboitua yön yli + 4 °C:ssa $\alpha 2\beta 1$ -proteiini immunovärjättiin käyttäen primäärivasta-aineena $\alpha 2$ -vasta-ainetta laimennettuna 1:1500 5 % maitoa sisältävään TBS-TWEEN:iin. Blotteja värjättiin huoneenlämmössä 1 tunnin ajan. Sekundäärivasta-aineena käytettiin anti-hiiri-HRP-konjugaattia laimennettuna 1:2000 5 % maitojauhetta sisältävään TBS-TWEENiin. Signaalin detektoimiseen käytettiin SuperSignal-substraattia. Kemiluminesenssi-signaalin kvantitoimiseen käytettiin valopöytää, jossa on kemiluminesenssisuodatin ja FluorChem-tietokone-ohjelmaa.

5.9 Eri markkereiden testaukset

Solut leimattiin myös eri solurakenteiden markkereilla, jotta nähtäisiin mihin rakenteisiin $\alpha 2\beta 1$ -integriini ja streptavidiini-helmet kulkeutuvat.

Fiksatut vasta-aine-helmi -käsitellyt ja fiksatut solut permeabilisoitiin 0,2 % Triton-X-100:lla 5 minuuttia. Tämän jälkeen soluille lisättiin CI-MPR vasta-aine 1:200 laimennettuna 0,5 % BSA-PBS:ään. Vasta-ainetta pidettiin soluilla 1 tunti huoneenlämmössä. Sekundäärivasta-aineena käytettiin vuohen anti-hiiri ja vuohen anti-kani vasta-aineita laimennettuna 1:200 0,5 % BSA-PBS:ään.

Kontrollisolut, joihin oli lisätty streptavidiinibeadit sekä pelkästään fiksatut kontrollisolut käsiteltiin hiiren anti-humaani $\alpha 2$ vasta-aineella ja CI-MPR vasta-aineella. Sekudäärivasta-aineena käytettiin vuohen anti-hiiri- ja vuohen anti-kani-vasta-aineita laimennettuna suhteessa 1:200.

Kaksi lasia soluja leimattiin EEA1 primaarivasta-aineella laimennettuna 1:100 ja kaksi lasia CD-63 primaarivasta-aineella. Sekundaarivasta-aineena käytettiin molemmissa vuohen anti-hiiri-vasta-ainetta laimennettuna suhteessa 1:200.

5.10 Proteiinipitoisuuksien määrittäminen mikrotiiterilevyllä

Proteiinipitoisuus määritettiin Bradfordin menetelmällä Protein Assay -väriagenssin avulla. Menetelmä perustuu Coomassie sinisen -väriaineen sitoutumiseen proteiineihin: mitä enemmän on proteiinia, sitä enemmän väriainetta sitoutuu. Analyysi on kolorimetrinen, eli kun proteiinikonsentraatio kasvaa, näytteen väri tummenee (Bradford 1976).

Sekä kontrollinäytteestä että $\alpha 2$ -näytteestä valmistettiin kolme eri proteiini-näytettä. Homogenaatista sekä gradienttiin muodostuneesta bändistä kaksi näytettä. Kutakin näytettä pipetoitiin 20 μ l ja lisättiin 380 μ l PBS:ää. Naudan seerumin albumiinista (BSA, bovine serum albumin) valmistettiin standardisuoran laimennokset 0,5, 2,5, 5, 10, 20, 40 μ l/ml, ja nollanäytteenä oli PBS. Näytteisiin ja standardilaimennoksiin lisättiin 100 μ l Bio-RAD Protein Assay väriagenssia. Sekoittamisen jälkeen näytteistä sekä standardilaimennok-sista pipetoitiin 200 μ l mikrotiiterilevyille ja inkuboitiin 5 minuuttia. Värireaktion absorbanssi mitattiin mikrotiiterilevynlukijalla aallonpituudella 595 nm. Näytteiden sisältämä proteiinimäärä saatiin laskettua standardisuoran avulla.

5.11 EM-kuljetus

Solut siirrostettiin edellisenä päivänä 8,8 cm² maljoille. Solujen pinnalle sidottiin ensin hiiren anti-integriini- α 2-vasta-aine laimennettuna suhteessa 1:200 1 tunti jäällä. Tämän jälkeen sidottiin streptavidiinipäällysteisien helmien kanssa yhdessä kanin anti-hiiri sekundäärivasta-aine 1:750 1 tunti jäällä. Ylimäärät pestiin inkubaatioiden välillä 0,5 % BSA-PBS puskurilla. Soluille lisättiin vielä 45 minuutin ajaksi 10 nm kultapartikkelit laimennettuna suhteessa 1:70 DMEM:iin (1 % FBS). Integriini-streptavidiinibead-kultapartikkeli kasauman sisään meno saatiin aikaan lisäämällä soluille 2 ml esilämmitettyä täydellistä mediumia (10 % FBS) ja laittamalla maljat + 37 asteeseen lämpökaappiin. Integriinin annettiin kulkeutua soluun 2 tunnin ajan, jonka jälkeen solut fiksattiin 2,5 % glutaraldehydillä 0,1 M natriumfosfaattipuskurissa 1 tunnin ajan +4 °C:ssa. Soluja pestiin 0,1 M natriumfosfaattipuskurilla kahdesti 10 minuutin ajan, ja jätettiin fosfaattipuskuriin yön yli.

Seuraavana päivänä solut jälkifiksattiin 1 % osmiumtetroksidilla 0,1 M fosfaattipuskurissa. Tällä tavalla soluihin saatiin kontrasti, jonka avulla solut näkyvät elektronimikroskoopilla kolmiulotteisina. Fiksaation jälkeen soluja pestiin 0,1 M fosfaattipuskurilla 3x10 minuutin ajan. Soluista tehtiin vedettömiä dehydraatiolla pesemällä soluja ensin 70 % etanolilla 3x5min ja tämän jälkeen 96 % etanolilla 3x5 minuutin ajan. Soluille tehtiin blokkivärjäys 2 % uranyyliasetaatilla, joka oli laimennettu absoluuttiseen etanoliin. Uranyyliasetatin annettiin olla soluilla 30 minuutin ajan huoneenlämmössä. Soluja pestiin vielä absoluuttisella etanolilla kolmesti viiden minuutin ajan. Tämän jälkeen malja imettiin kuivaksi ja maljalle asetettiin alassuin 4 eponilla täytettyä gelatiinikapselia. Eponia polymerisoitiin uunissa 48 tuntia + 60 °C:ssa. 30 minuuttia ennen uunista poistamista nostettiin lämpötila 100 °C:een, jolloin kapselit saatiin irrotettua maljoilta helposti.

5.12 EM-Hilat

Gradienttinäytteestä, sekä kontrollista että $\alpha 2$ vasta-aineella käsitellyistä soluista, otettiin 7,5 μ l näyte, joka pipetoitiin pisaraksi parafilmin päälle. Pisaroiden päälle asetettiin hilat 30 minuutin ajaksi. Hilat pestiin kahdesti PBS:llä ja laitettiin 2,5 % glutaraldehydi pisaran päälle 5 minuutiksi. Tämän jälkeen hilat pestiin kahdesti steriilillä vedellä ja laitettiin metyyliiselluloosa pisaraan jälle 10 minuutiksi. Lopuksi hilat laitettiin kuivumaan silmukkaan. Hila näytteet kuvattiin elektronimikroskoopilla.

6 TULOKSET

6.1 Vasta-aineiden tuotto, biotinylointi ja eristys

Myöhemmissä kokeissa käytettävän hiiren anti-humaani-integriini- $\alpha 2$ -vasta-aineen toimivuutta tutkittiin konfokaalimikroskopian avulla vertaamalla jo toimiviksi todettujen vasta-aineiden intensiteettiä nyt tuotetun vasta-aineen intensiteettiin.

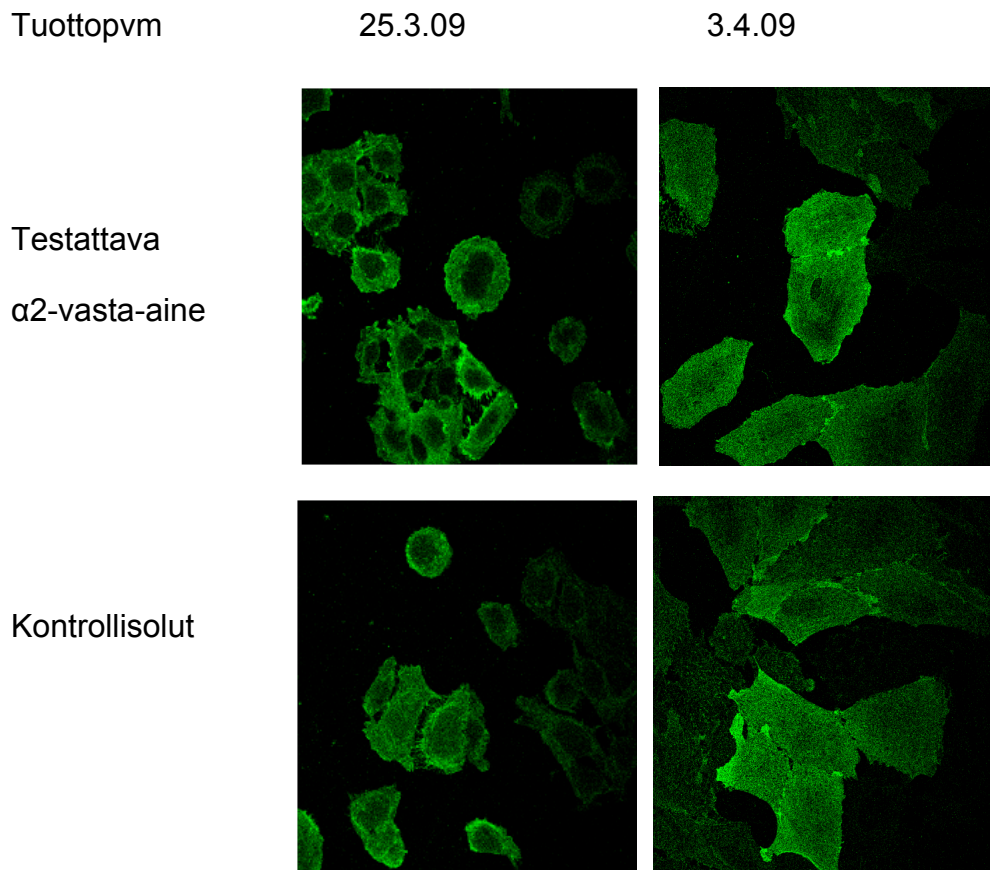
$\alpha 2$ -vasta-ainetta tuotettiin A211E10-hybridoomasoluissa, puhdistettiin kromatografiaa hyödyntäen sekä biotinyloitiin itse. Vasta-ainetuottoja tehtiin yhteensä yhdeksän kertaa. Osa puhdistetusta vasta-aineesta biotinyloitiin ja osa säilytettiin sellaisenaan myöhempää käyttöä varten.

Tuotetun ja puhdistetun vasta-aineen pitoisuus määritettiin Nano-drop-laitteen avulla. Toimivuus määriteltiin vertaamalla sitä jo olemassa oleviin ja

testattuihin vasta-aineisiin. Biotinyloidun vasta-aineen toimivuus määriteltiin vertaamalla sitä jo olemassa oleviin ja testattuihin vasta-aineisiin.

Konfokaalimikroskopian avulla verrattiin eri laimennosten välisiä eroja. Kuviossa 8 voi nähdä, että valmistamani vasta-aineen intensiteetti ei silmin nähden eroa aikaisemmin valmistetuista vasta-aineista. Tuotto- ja biotinylointiprosesseja voidaan pitää onnistuneina ja vasta-ainetta käyttökelpoisena.

Kuviossa 8 vasemmalla puolella on testattava biotinyloitu vasta-aine laimennettuna suhteessa 1:200. Soluina käytettiin SAOS-soluja ja solut leimattiin Alexa Fluor 488 vasta-aineella. Samalla tavalla käsiteltiin kuvissa oikealla olevat solut, jotka toimivat vertailusoluina testattavalle vasta-aineella. Vasta-aineena soluissa käytettiin aikaisemmin biotinyloitua, ja toimivaksi testattua, $\alpha 2$ -vasta-ainetta sekä myöhemmissä kokeissa minun aikaisemmin biotinyloimaani vasta-ainetta.



KUVIO 8. Konfokaalimikroskooppikuvia $\alpha 2\beta 1$ -integroinikasautumista. Kuvissa ovat kahden eri testauskerran solut. $\alpha 2$ -vasta-aineen toimivuus havaitaan vihreänä fluoresenssina. Vasta-aine on laimennettu suhteessa 1:200.

6.2 Streptavidini-helmien käyttö $\alpha 2\beta 1$ -integroinin kulkeutumisen seuraamiseen

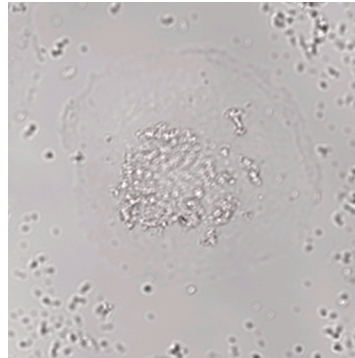
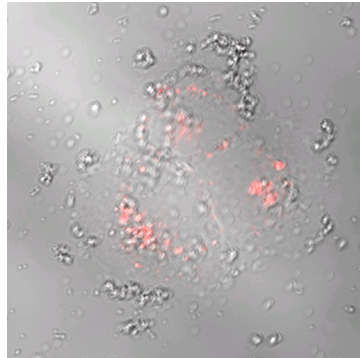
Ennen varsinaista koetta vertailtiin streptavidini-helmien eri pitoisuuksia, jotta saataisiin enemmän tietoa siitä, mikä laimennos antaa parhaan tuloksen. Streptavidini-helmistä käytettiin laimennoksia 1:2, 1:5 ja 1:20. Kokeet tehtiin SAOS-soluilla.

Kuviossa 9 on vertailtu keskenään eri laimennoksia. Juurikaan silmin havaittavaa eroa ei laimennosten välillä ollut. Näin koe päätettiin tekemään

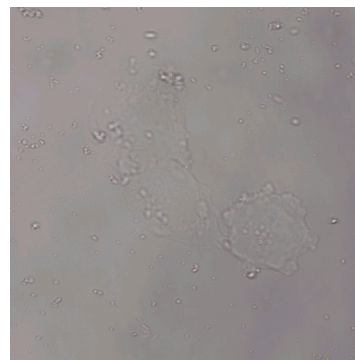
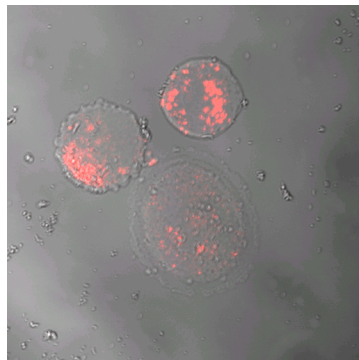
laimennoksilla 1:5 ja 1:20. 1:2 laimennos jätettiin kokonaan pois materiaalien säästämiseksi.

α 2-vasta-aine näyte

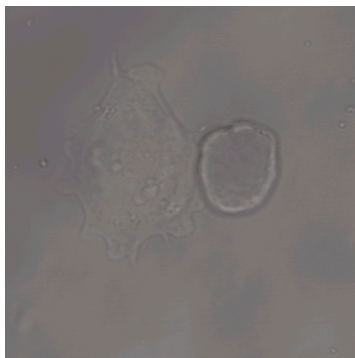
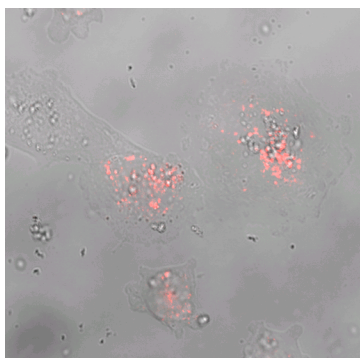
Kontrollinäyte



1:2 laimennos



1:5 laimennos



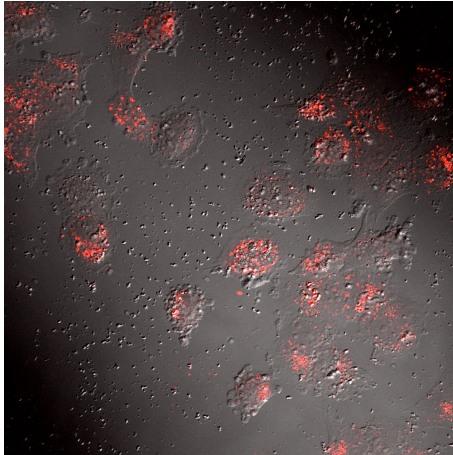
1:20 laimennos

KUVIO 9. Streptavidiini-helmien testaaminen α 2 β 1-integriinin kulkeutumisen seuraamiseen eri laimennoksilla. Vasemmalla puolella näytteet, joissa mukana α 2-integriini, ja oikealla puolella kontrollisolut.

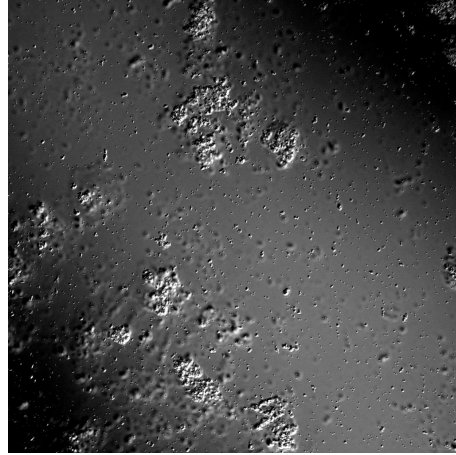
Toinen koe tehtiin laimennoksilla 1:5 ja 1:20. Kokeessa solut leimattiin vasta permeabilisoinnin jälkeen. Kuviossa 10 ovat tulokset toisesta kokeesta.

Laimennoksessa 1:5 $\alpha 2$ -vasta-aine streptavidiini-helmi kasaumia näyttäisi esiintyvän enemmän kuin laimennoksessa 1:20.

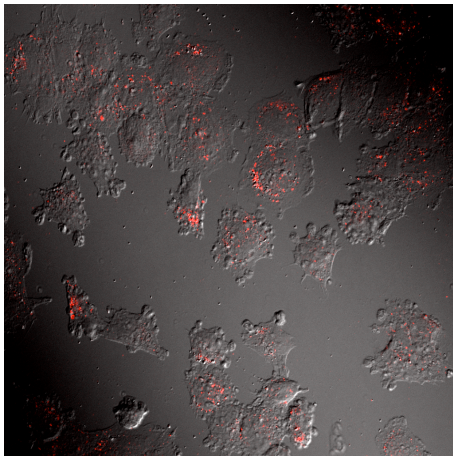
1:5 laimennos



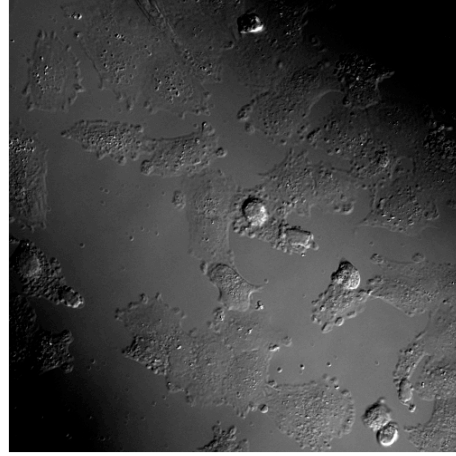
Kontrolli-solut



1:20 laimennos



Kontrolli-solut

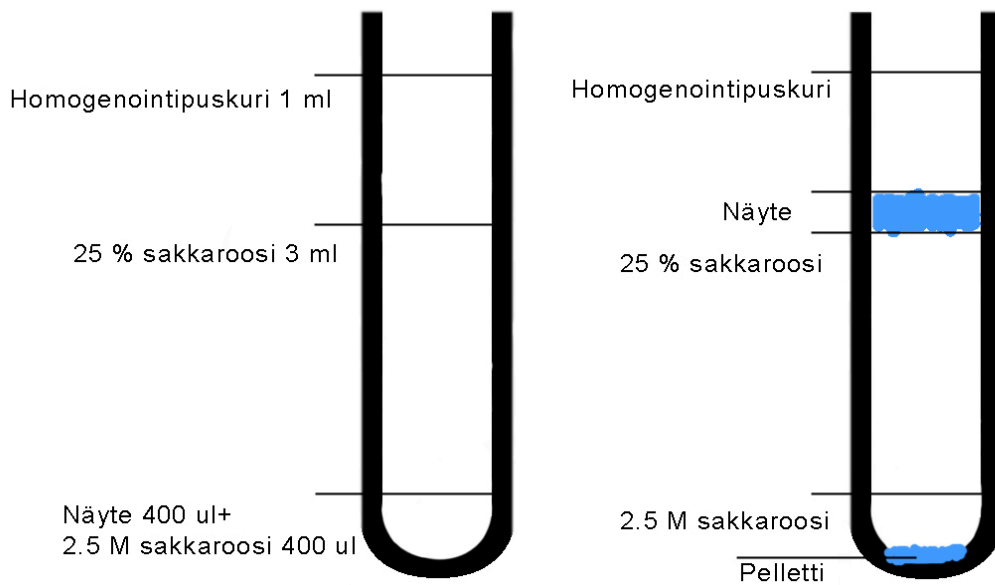


KUVIO 10. Streptavidiini-helmien testaaminen $\alpha 2\beta 1$ -integriinin kulkeutumisen seuraamiseen eri laimennoksilla. Toinen koe.

6.3 Integriinirakenteiden eristäminen sakkaroosigradientilla

Gradienttisentrifugointi erottelee liuoksessa olevat partikkelit niiden tiheyden perusteella. Sentrifuugiputkeen rakennetaan tiheysgradientti sakkaroosista. Gradientin pitoisuus valitaan siten, että sen tiheys tietyssä kohtaa gradienttia tulee yhtä suureksi kuin erotettavan aineen tiheys. Erotettava suspensio pipetoidaan gradientin alle. Sentrifugoinnin aikana suspensiossa olevat partikkelit liikkuvat gradientissa, kunnes saavuttavat kohdan, jossa ympäröivän gradientin tiheys on yhtä suuri kuin niiden oma tiheys. Tällöin erotettava aine pysähtyy ja jää kellumaan kyseiseen kohtaan gradienttia, jolloin putkeen muodostuu sarja tiheydeltään erilaisia vyöhykkeitä. (Ks. Kuvio 11). Sakkaroosin maksimitiheys on noin $1,3 \text{ g/cm}^3$, ja siitä tehtyä gradienttia käytetäänkin tyypillisesti kalvopäälysteisten organellien, kuten Golgin laitteen, endoplasmisen kalvoston, lysosomien ja mitokondrioiden erotteluun.

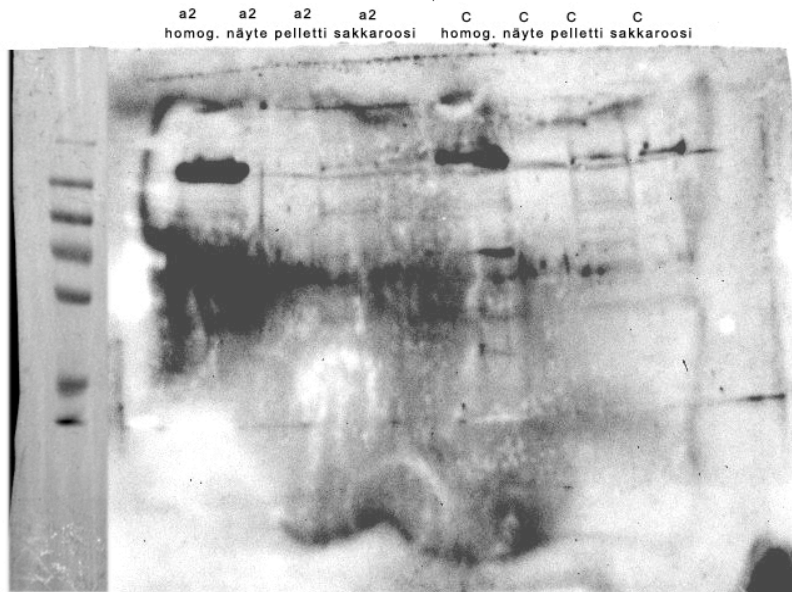
Endosomaalinen eristys tehtiin sakkaroosigradientin avulla. Sakkaroosi-gradienttiin muodostui sentrifuugin jälkeen sininen alue, joka sisälsi integriini-helmikasauman sisältäviä endosomaalisia rakenteita. (Ks. Kuvio 11) Eri streptavidiinihelmi-laimennosten välillä oli havaittavissa silmin nähtävä ero nauhan värin vahvuudessa. Laimennoksessa 1:5 oli selkeämmin havaittava sininen nauha, kun taas laimennoksessa 1:20 nauha oli hailakan sininen.



KUVIO 11. Sakkaroosigradientti

Blottivärjäyksestä selkeä tulos saatiin vasta, kun materiaalia oli käytetty riittävästi. Ensin gradienttia koetettiin tehdä vain yhdellä 10 cm:n maljalla, joka oli täynnä soluja. Tämä ei antanut minkäänlaista tulosta blottivärjäyksellä, vaikka valotusaikaa lisättiin maksimiin. Lisäksi kokeiltiin neljällä maljalla, jolloin saatiin 10 minuutin kohdalla haaleat viivat $\alpha 2$ -integriinin kohtaan. Kunnon tulos saatiin käyttämällä kahdeksaa täyttä maljaa soluja. Tällöin saatiin heti tulokseksi selkeät viivat.

Kuviossa 12 näkyy kuinka proteiininauha saatiin näkyville $\alpha 2$ -integriinin (noin 130 kDa:in) kohdalle. Nauhat ovat voimakkaimmat suoraan homogenaatista otetusta näytteestä. Tummat juovat, jotka näkyvät kalvolla alempana, ovat luultavasti streptavidinihelmiä.

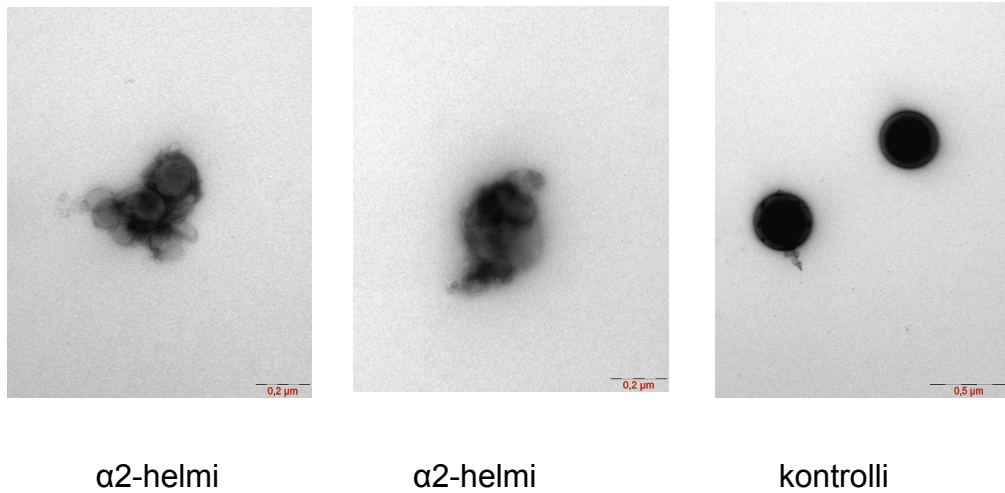


KUVIO 12. Blottiväryksen tulos

Tuloksen perusteella $\alpha 2$ -integriini saatiin eristettyä muista rakenteista ja blottiväryksien perusteella näyttäisi, ettei muita tutkittuja markkereita kovinkaan paljoa ole mukana.

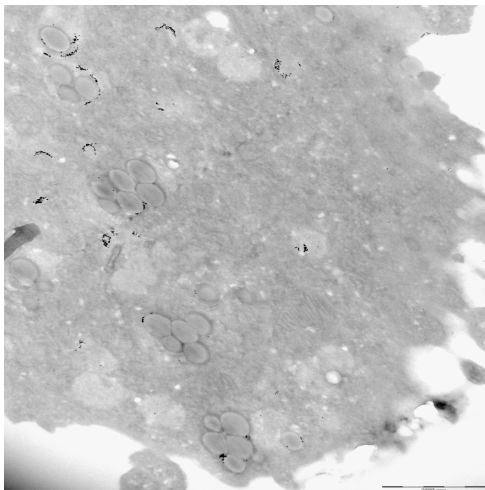
6.4 Gradienttirakenteiden puhtauden arviointi elektronimikroskoopilla

Näytteiden puhtautta arviointiin elektronimikroskoopilla katsottujen hilojen kautta. Tarkoituksena oli nähdä, löytyisivätkö helmet endosomaalisten kalvojen sisältä ja onko kontrollihelmiin takertuneena paljon solun kalvorakenteita. Kuten kuvioista 13 näkyy, näyte, jossa $\alpha 2$ -integriini on mukana näkyy solun kalvorakenteita kiinnittyneinä streptavidinihelmiin. Kontrollinäytteen kuvassa taas streptavidinihelmet ovat puhtaita eikä niissä ole kiinnittyneinä mitään ylimääräistä.

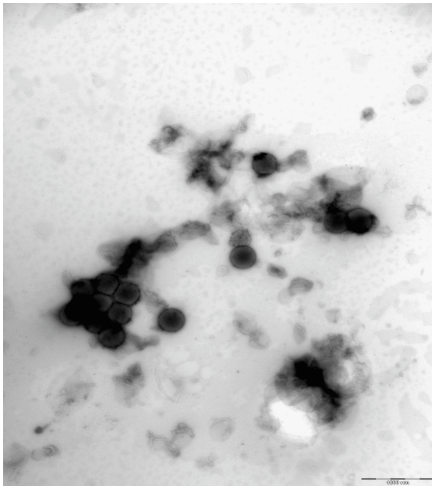


KUVIO 13. Näytteiden puhtauden arviointia elektronimikroskopian avulla

Elektronimikroskopian avulla pystyttiin myös tutkimaan, ovatko helmet menneet solunsisäisiin rakenteisiin ja onko helmiin kiinnittyneenä solunkalvorakenteita. Kuvioista 14 huomaa, että helmet ovat menneet solunsisäisiin rakenteisiin ja kalvorakenteet kiinnittyneet helmiin.



KUVIO 14. Kuvassa näkyy solun sisälle kasaantuneita strepavidiinipäälysteisiä helmiä, joihin on kiinnittyneenä α 2-integriiniä



KUVIO 15. Mustat pallot ovat Streptavidiini-helmiä, ja niiden ympärillä $\alpha 2$ -integrini kiinnittyneenä

6.5 Proteiinimittaus

Proteiinimääritykseen käytettiin BIO-RAD Protein Assay Reagent -pakkausta Bradfordin menetelmää hyväksi käyttäen. Standardisuoran mittaamiseen käytettiin BSA (naudan seerumin albumiini) -standardia. BSA-pitoisuudet standardisuoralla olivat 0 $\mu\text{g/ml}$, 0,5 $\mu\text{g/ml}$, 2,5 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$ ja 40 $\mu\text{g/ml}$. näytteiden absorbanssit mitattiin 595 nm:ssä 5 minuutin seisotuksen jälkeen PBS-puskuria vastaan. Mittaus suoritettiin ELISA-laitteella.

Taulukossa 3 esitetään näytteiden proteiinipitoisuudet.

TAULUKKO 3. Näytteiden proteiinipitoisuudet

PVM	Näyte	Proteiinikonsentraatio (ug/ul)
30.6.2009	Näyte (kontrolli)	0,025
	Homogenaatti (kontrolli)	2,19
	Näyte (α 2-käsittely)	0,019
	Homogenaatti (α 2-käsittely)	2,1
13.7.2009	Näyte (kontrolli)	0,076
	Homogenaatti (kontrolli)	0,74
	Näyte (α 2-käsittely)	0,076
	Homogenaatti (α 2-käsittely)	0,64

7 POHDINTA

Jotta endosytoosireitin rakenteita voitaisiin paremmin karakterisoida, ne olisi hyvä saada eristettyä puhtaana. Tässä työssä siis lähdettiin kehittelemään menetelmää, jolla saataisiin eristettyä α 2-integriinillä indusoidut endosomit muista endosomeista ja solun rakenteista. Työssä saatiin odotetunlaisia tuloksia. Tottakai tutkimuksia on vielä jatkettava ja kehitettävä koko ajan uusia ja parempia menetelmiä endosomaalisten rakenteiden eristämiseen. Tässä työssä onnistuttiin rikastamaan α 2-integriinirakenteita gradientin avulla, ja blottivärjäyksen perusteella näyttäisi, että muita tutkimiamme markkereita ei blottivärjäyksestä löytyisi.

Koska endosomaalisten rakenteiden eristäminen solun muista rakenteista onnistui odotetunlaisesti, on nyt mahdollista saada jatkossa eristettyä puhtaita rakenteita ja tutkia niistä tarkemmin, mitä proteiineja ja lipidejä niissä spesifisesti rikastuu ja mahdollisesti löytää myös uusia ominaisuuksia niiden rakenteille.

Kaikenkaikkiaan työ oli haastava, mutta mielenkiintoinen. Tasoltaan työ oli mielestäni turhankin haastava minulle, joka en aikaisemmin ole ollut solubiologian kanssa tekemisissä.

Toivon, että Jyväskylän yliopisto ja Varpu Marjomäen ryhmä ovat saaneet enemmän tietoa solunsisäisistä rakenteista tekemiäni kokeiden avulla, ja ovat pystyneet hyödyntämään syntyneitä tuloksia jatkotutkimuksia ajatellen.

LÄHTEET

- Araki, N., Egami, Y., Watanabe, Y. & Hatae, T. 2007. Phosphoinositide metabolism during membrane ruffling and macropinosome formation in EGF-stimulated A431 cells. *Exp.Cell Res.* 313:1496-1507.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Conner, S.D. & Schmid S.L. 2003. Regulated portals of entry into the cell. *Nature.* 422:37-44.
- Flint, S.J., Enquist, L.W., Krug, R.M., Racaniello, V.R. & Skalka, A.M. 2000 *Principles of Virology*, American Society of Microbiology. Washington, DC. 133-161.
- Heino, J. 2004. *Solubiologia*. Helsinki: WSOY.
- Hewlett, L.J., Prescott, A.R. & Watts, C. 1994. The coated pit and macropinocytic pathways serve distinct endosome populations. *J.Cell Biol.* 124:689-703.
- Hynes, R.O. 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* 69:11-25.
- Kakkonen, E. 2007. CtBP3/BARS-proteiinin merkitys echovirus 1:n ja $\alpha 2\beta 1$ -integriinin internalisaatiossa. Pro Gradu -tutkielma. Jyväskylän yliopisto, bio- ja ympäristötieteiden laitos.
- Klatriinivälitteinen endosytoosi. 2006. Solunetti. Viitattu 3.5.2011.
http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/klatriinivalitteinen_endosytoosi/2/
- Pelkmans, L., & Helenius, A. 2002. Endocytosis via caveolae. *Traffic.* 3:311-320.

Pierschbacher, M.D. & Ruoslahti, E. 1984. Variants of the cell recognition site of fibronectin that retain attachment-promoting activity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 81:5985-5988.

Plow, E.F. Haas, T.A., Zhang, L., Loftus, J. & Smith, J.W. 2000. Ligand binding to integrins. *J. Biol. Chem.* 275:21785-8.

Reseptorit ja viestimolekyylit. 2006. Solunetti. Viitattu 3.5.2011
http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/yleista_valitysmekanismista/

Solukalvo. 2006. Solunetti. Viitattu 3.5.2011
<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/solukalvo/>

Solukalvoreseptorit. 2006. Solunetti. Viitattu 3.5.2011
<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/solukalvoreseptorit/>

Soluväliainerseptorit (integriinit) 2006. Solunetti. Viitattu 3.5.2011
<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/soluväliainerseptorit/2/>

Storrie, B. & Madden E.A. 1990. Isolation of subcellular organelles. *Methods in enzymology.* 182:203-25.

Swanson, J.A., & Watts, C. 1995. Macropinocytosis. *Trends Cell Biol.* 5:424-428.

Tirri, R. 2001. *Biologian sanakirja.* Helsinki: Otava.

Viestinvälitys. 2006. Solunetti. Viitattu 3.5.2011
<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/viestinvalitys/>