



**SAVONIA**

■ OPINNÄYTETYÖ - AMMATTIKORKEAKOULUTUTKINTO  
SOSIAALI-, TERVEYS- JA LIIKUNTA-ALA

# CAR- JA PXR -TUMARESEPTORIEN KLOONAAMINEN ERI LAJEISTA JA NIIDEN TOIMINNAN TUTKIMINEN

TEKIJÄ: Anni-Maaria Pakanen

|   |           |
|---|-----------|
| Koulutusala<br>Sosiaali-, terveys- ja liikunta-ala  |           |
| Koulutusohjelma<br>Bioanalytiikan koulutusohjelma   |           |
| Työn tekijä<br>Anni-Maaria Pakanen  |           |
| Työn nimi<br>CAR- ja PXR -tumareseptorien kloonaminen eri lajeista ja niiden toiminnan tutkiminen   |           |
| Päiväys   | 17.4.2014 |
| Sivumäärä/Liitteet  | 48/7      |
| Ohjaaja<br>Lehtori Marko Björn  |           |
| Toimeksiantaja/Yhteistyökumppani<br>Paavo Honkakoski, Farmasian laitos, Itä-Suomen yliopisto  |           |
| <p>Tiivistelmä</p> <p>Tumareseptorien rakennetta ja toimintaa tutkimalla voidaan saada tietoa reseptorien toiminnan kannalta tärkeitä aminohapoista ja lisätietoa niiden evoluutiosta. Tiedon avulla voitaisiin myös selittää lääkkeiden vaikutusten välisiä yksilö- ja lajieroja, kehittää uusia lääkeaineita sekä vähentää lääkeaineiden välisiä yhteisvaikutuksia. LBD-alueen tutkiminen on erityisen tärkeää, koska tumareseptorin aktivoituminen tapahtuu yleensä ligandin sitouduttua siihen. Näiden tumareseptorien ligandina voi toimia esimerkiksi jokin lääkeaine.</p> <p>Molekyylibiologian ja geenitekniikan osa-alueita sisältävä opinnäytetyö toteutettiin Itä-Suomen yliopiston Farmasian laitoksella. Työ koostui kahdesta erillisestä osiosta: CAR- ja PXR-tumareseptorien ligandia sitovien domeenien (engl. LBD) kloonamisesta eri lajeista sekä naudan promoottorialueiden reportterigeenimittauksesta. Reportterigeenimittaus oli osa professori Paavo Honkakosken sekä Padovan yliopiston yhteistyönä toteutettavaa tutkimusta. Opinnäytetyön tavoitteena oli kloonata eri lajeista CAR:n ja PXR:n LBD-alueita ja selvittää niiden sekvenssit. Kloonauksen epäonnistuttua työtä jatkettiin tutkimalla näiden tumareseptorien promoottorialueita reportterigeenimittauksella. Työssä testattiin CAR:n ja PXR:n vaikutusta seitsemän erilaisen naudan promoottorialueen aktiivisuuteen.</p> <p>LBD-alueiden kloonaminen ei onnistunut optimoinnista huolimatta. Reportterigeenimittauksen tulosten perusteella löydettiin kaksi promoottorialuetta, joiden aktiivisuutta molemmat tumareseptorit lisäsivät sekä yksi alue, jonka aktiivisuutta tumareseptorit vähensivät. Tulokset olivat yhteneväisiä molemmilla mittauskerroilla, mutta ne ovat kuitenkin vasta alustavia ja ne täytyy varmistaa uusintamittauksilla.</p> |           |
| Avainsanat<br>tumareseptorit, kloonaminen, PCR, reportterigeenimittaus  |           |

|   |           |                  |      |
|---|-----------|------------------|------|
| Field of Study<br>Social Services, Health and Sports  |           |                  |      |
| Degree Programme<br>Degree Programme of Biomedical Laboratory Science   |           |                  |      |
| Author<br>Anni-Maaria Pakanen   |           |                  |      |
| Title of Thesis<br>Cloning nuclear receptors CAR and PXR from different species and examining their function  |           |                  |      |
| Date  | 17.4.2014 | Pages/Appendices | 48/7 |
| Supervisor(s)<br>Senior lecturer Marko Björn  |           |                  |      |
| Client Organisation/Partner<br>Paavo Honkakoski, School of Pharmacy, University of Eastern Finland  |           |                  |      |
| <p>Abstract</p> <p>By studying the structure and function of nuclear receptors it's possible to gain more knowledge about functionally important amino acids and their evolution. The information could also be used for explaining the differences of drug side-effects between individuals and species, developing new drugs and decreasing drug-to-drug interactions. Researching the ligand binding domain (LBD) is particularly important because the receptor is activated as a consequence of ligand binding to the LBD. For example different drugs can act as a ligand for these nuclear receptors.</p> <p>The practical part of the bachelor's thesis includes several sub-fields of molecular biology and gene technology and it was executed in the School of Pharmacy at the University of Eastern Finland. The thesis consists of two parts: cloning the ligand binding domains of nuclear receptors CAR and PXR from different species and doing the reporter gene assay with bovine promoter regions. The reporter gene assay was a part a Paavo Honkakoski's collaboration project with the University of Padova. The purpose of the thesis was to clone CAR and PXR LBDs from different species and sequence them. Due to the unsuccessful cloning the work was proceeded by studying these nuclear receptor's promoter regions with a reporter gene assay. With the assay the effect of CAR and PXR on the activity of seven bovine promoter regions was tested.</p> <p>Cloning the LBDs failed regardless of optimization. According to the results of the reporter gene assay it was found that both nuclear receptors increased the activity of two of the regions and decreased one region's activity. The results were equivalent on both measurements but they are though only preliminary and the test needs to be repeated to confirm the results.</p> |           |                  |      |
| Keywords<br>nuclear receptors, molecular cloning, PCR, reporter gene assay  |           |                  |      |
|   |           |                  |      |

## SISÄLTÖ

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 1     | JOHDANTO .....   | 8  |
| 2     | TUMARESEPTORIT .....   | 9  |
| 2.1   | Tumareseptorit lääkeainemetaboliassa.....                            | 10 |
| 2.2   | Konstitutiivinen androstaanireseptori ja pregnaani X-reseptori ..... | 11 |
| 3     | TUMARESEPTORIEN GEENISÄÄTELY .....                                   | 13 |
| 4     | CAR:N JA PXR:N LBD-ALUEIDEN HOMOLOGISUUS ERI LAJIEN VÄLILLÄ.....     | 15 |
| 5     | KÄYTETYT TYÖMENETELMÄT .....   | 16 |
| 5.1   | Subkloonaus.....   | 16 |
| 5.2   | Alukkeiden suunnittelu ja polymeraasiketjureaktion optimointi.....   | 17 |
| 5.3   | Polymeraasiketjureaktio .....  | 18 |
| 5.4   | Käänteistransfektio.....   | 20 |
| 5.5   | Reportterigeenimittaus.....  | 21 |
| 6     | TYÖN TARKOITUS JA TAVOITTEET .....                                   | 22 |
| 7     | KOKEELLISEN OSION TOTEUTUS.....                                      | 23 |
| 7.1   | Kvantitatiivinen ja kvalitatiivinen tutkimusote.....                 | 23 |
| 7.2   | Subkloonaus.....   | 23 |
| 7.2.1 | Alukkeiden suunnittelu .....   | 25 |
| 7.2.2 | RNA:n eristäminen ja puhdistaminen.....                              | 26 |
| 7.2.3 | RT-PCR.....  | 27 |
| 7.2.4 | PCR.....   | 28 |
| 7.2.5 | PCR-tuotteiden erottelu agarosigeelielektroforeesilla.....           | 30 |
| 7.3   | Käänteistransfektiolevyjien valmistus.....                           | 30 |
| 7.4   | Reportterigeenimittaus.....  | 30 |
| 8     | TULOKSET .....   | 32 |
| 8.1   | Kloonaaminen.....  | 32 |
| 8.2   | Reportterigeenimittaus.....  | 34 |
| 9     | POHDINTA.....  | 38 |
| 9.1   | Tulosten luotettavuus ja jatkotutkimuksen tarve .....                | 38 |
| 9.2   | Työn luotettavuus ja eettisyys .....                                 | 39 |

|     |  |    |
|-----|--|----|
| 9.3 | Tiedonhankinta ja aikataulu.....         | 40 |
| 9.4 | Oma oppiminen ja ammatillinen kasvu..... | 41 |

## LÄHTEET

## LIITTEET

LIITE 1: REAGENSIT JA LAITTEET

LIITE 2: ALUKKEIDEN SUUNNITTELUN PERUSTANA OLLEET SEKVENSSIT

LIITE 3: ERISTETYT RNA:T

LIITE 4: AGE-OHJE

LIITE 5: KÄÄNTEISTRANSFEKTIOLEVYJEN VALMISTAMINEN

LIITE 6: LUC- JA ONPG-MITTAUKSEN TEKEMINEN

LIITE 7: TULOSTEN LASKEMINEN

## OPINNÄYTETYÖSSÄ KÄYTETTYJÄ TERMEJÄ

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| agonisti:                     | reseptorien toimintaa aktivoiva (lääke)aine   |
| C3A-solu:                     | Ihmisen maksasolulinja, joka on HepG2-solulinjan johdannainen.  |
| CAR:                          | Konstitutiivinen androstaanireseptori eli CAR on tumareseptori, joka tehostaa elimistölle haitallisten aineiden poistamista kiihdyttämällä niitä pilkkovien entsyymien tuottamista. |
| cDNA-kirjasto:                | kokoelma kloonattuja DNA-jaksoja solujen lähetti-RNA:sta  |
| denaturoituminen:             | Proteiinin rakenteen muuntuminen siten, että se menettää biologisen aktiivisuutensa.  |
| DNA/kantaja-kompleksi:        | DNA:n ja transfektioreagenssin muodostama kompleksi, esim.DNA/PEI.  |
| dNTP:                         | deoksiribonukleosiditriposfaattien (A,T,C,G) yleisnimi  |
| dimeeri:                      | Kahdesta rakenneyksiköstä koostuva rakenne. Homodimeerissä rakenneyksiköt ovat keskenään samanlaiset ja heterodimeerissä erilaiset.   |
| eksogeeninen:                 | ulkosyntyinen, elimistön ulkopuolelta tuleva  |
| eksoni:                       | geenin proteiinia koodaava osa  |
| endogeeninen:                 | sisäsyntyinen, elimistöstä itsestään peräisin oleva   |
| fragmentti:                   | DNA-palanen, insertti   |
| HepG2:                        | yleisesti soluviljelyssä käytetty ihmisen maksasolulinja  |
| homeostaasi:                  | elimistön sisäinen tasapaino  |
| HRE:                          | Hormonivaste-elementti eli DNA-sekvenssi, jonka hormonireseptori tunnistaa ja jonka ilmentämistä reseptori säätelee (engl. hormone response element).                               |
| indusori:                     | Proteiini, joka kiihdyttää vierasainemetaboliaa.  |
| inhibiittori:                 | Proteiini, joka estää tumareseptorin kiinnittymisen DNA:han.  |
| introni:                      | Geenin proteiinia koodaamaton osa, joka silmukoidaan pois ennen translaatiota.  |
| in-vivo:                      | elävässä olennessa tai solussa  |
| isoformi:                     | Samana proteiinin eri muoto, joka on voinut muuttua erilaiseksi esimerkiksi vaihtoehdoisen silmukoinnin seurauksena.  |
| komplementaarinen DNA:        | Lähetti-RNA:sta käänteiskopioijaentsyymillä valmistettu yksijuosteinen kopio, josta puuttuu intronit (engl. cDNA).  |
| konservoitunut sekvenssi:     | DNA-alue, jota evoluutio ei ole muokannut paljon ja alueella on vähän laji- tai yksilökohtaisia eroja. Usein geenin tai proteiinin toiminnan kannalta tärkeä alue.                  |
| konstitutiivinen aktiivisuus: | Tumareseptori on jatkuvasti aktiivinen, eikä aktivoituminen vaadi ligandin kiinnittymistä.  |
| konstrukti:                   | DNA-rakenne   |
| ksenobiottinen:               | Elimistölle vieraita aineita tunnistava.  |
| LBD-alue:                     | Alue tumareseptorissa, johon ligandi kiinnittyy.  |
| ligandi:                      | Molekyyli, joka sitoutuu sille spesifiseen reseptoriin.   |

|                             |  |
|-----------------------------|--|
| metabolia:                  | aineenvaihdunta, kudoksissa tapahtuvien kemiallisten reaktioiden summa   |
| ori-alue:                   | replikaation aloitusalue (engl.origin of replication)  |
| PBREM:                      | Fenobarbitaalin vaste-elementtimoduuli (engl. phenobarbital response element module), johon CAR ja PXR kiinnittyvät. Lisää erityisesti CAR:n aktivaatiota.   |
| primaarihepatosyytti:       | Maksasolu, joka on eristetty suoraan elimestä.   |
| promoottori:                | Transkription aloituskohta DNA:ssa, johon RNA-polymeraasi kiinnittyy. Promoottori muodostaa yhdessä geenin voimistajien ja säätelyelementtien kanssa geenin säätelyalueen.   |
| PXR:                        | Pregnaani x-reseptori eli PXR on tumareseptori, joka tehostaa elimistölle haitallisten aineiden poistamista kiihdyttämällä niitä pilkkovien entsyymien tuottamista.  |
| RT-PCR:                     | Menetelmä, jolla RNA:n informaatio käännetään DNA:ksi (engl. reverse transcription PCR).   |
| selektiogeeni:              | Geeni, jonka avulla voidaan valikoida transformoidun plasmidin sisältämät solut.   |
| sytoplasma:                 | solulima, solukalvon sisäpuolella ja tuman ulkopuolella oleva neste  |
| templaatti:                 | Malli tai ohje, jonka mukaan polymeraasi alkaa kopioida DNA/RNA-juostetta.   |
| transformaatio:             | geneettisen materiaalin siirtäminen bakteerisolun sisälle  |
| transkriptiotekijä:         | DNA:n säätelyjaksoihin sitoutuva proteiini, joka tunnistaa promoottoreita ja tehostajia sekä säätelee DNA:n kopioitumista lähetti-RNA:ksi.   |
| tumareseptori:              | Joko tumassa tai sytoplasmassa sijaitseva reseptori, joka aktivoituu viestimolekyylin (D-vitamiini, testosteroni, kortisoli, eril.lääkeaineet) sitouduttua siihen. Aikaansaa säätelyproteiinien tuoton ja vaikuttaa niiden kautta suoraan solun geeniekspressioon. |
| transfektio:                | Geenitekniikan menetelmä, jonka avulla vierasta DNA:ta viedään eläin-solun sisälle fysikaalisia tai kemiallisia keinoja käyttäen.  |
| translaatio:                | RNA:n informaation kääntäminen sitä vastaavaksi aminohappojärjestykseksi ja proteiiniksi   |
| translokaatio:              | tumareseptorin siirtyminen sytoplasmasta tumaan  |
| transkriptio:               | DNA:n informaation kopioiminen RNA:ksi RNA-polymeraasin avulla   |
| U:                          | entsyymiaktiivisuuden yksikkö mol/min (engl.unit)  |
| vaihtoehtoinen silmukointi: | Esilähetti-RNA:sta poistetaan intronit sekä osa eksoneista eri tavalla, minkä seurauksena geenistä tuotetaan erilaisia lähetti-RNA:n muotoja. Sen seurauksena sama geeni voi tuottaa useita erilaisia proteiineja.   |
| variantti:                  | Muunnelma samasta proteiinista, joka on rakenteeltaan lähes samanlainen.   |
| XREM:                       | Vierasaineille herkkä vaste-elementtimoduuli (engl. xenobiotic-responsive enhancer module), johon CAR ja PXR kiinnittyvät. Lisää erityisesti PXR:n aktivaatiota.   |

## 1 JOHDANTO

Molekyylibiologian ja geenitekniikan osa-alueita sisältävä opinnäytetyö oli osa professori Paavo Honkakosken sekä Padovan yliopiston yhteistyönä toteutettavaa tutkimusta. Työ tehtiin Itä-Suomen yliopistolla Farmasian laitoksen laboratoriotiloissa. Opinnäytetyön tarkoituksena oli kloonata eri lajeista CAR- ja PXR- tumareseptoreiden LBD-alueita ja selvittää niiden sekvenssit. Kloonaustyön epäonnistuttua työtä jatkettiin tutkimalla näiden tumareseptorien vaikutusta erään naudan CYP-geenin promootorialueeseen reportterigeenimittauksella. Työssä testattiin CAR:n ja PXR:n vaikutusta seitsemän erilaisen naudan promootorialueen aktiivisuuteen.

Opinnäytetyön aihe ja tavoitteet nousivat esille toimeksiantajan tarpeista. Työn aiheeksi valittiin tumareseptorien tutkiminen, sillä niillä on tärkeä merkitys monissa biologisissa prosesseissa, ja niiden kautta on mahdollista löytää lääkkeitä vaikeasti hoidettaviin sekä kansantaloudellisesti merkittäviin aineenvaihduntatauteihin, kuten syöpään ja diabetekseen. Tumareseptorien tutkiminen ja lisääntynyt tieto niiden toiminta- ja vaikutusmekanismeista voi mahdollistaa turvallisempien ja vähemmän sivuvaikutuksia aiheuttavien lääkkeiden kehittämisen. CAR- ja PXR-tumareseptorien LBD-alueiden kloonaaminen eri eläinlajeista epäonnistui, eikä haluttua aluetta ei saatu monistettua PCR:llä.

Työn seuraava vaihe oli näiden tumareseptorien tutkiminen reportterigeenimittauksella, jossa testattiin naudan CAR:n ja PXR:n vaikutusta seitsemän erilaisen CYP-geenin promootorialueen aktiivisuuteen. Tutkimuksella pyrittiin löytämään CYP-geenin säätelyalueelta kohtia, joiden aktiivisuus lisääntyisi tai vähentyisi näiden tumareseptorien vaikutuksesta. Naudan promootorialueita haluttiin tutkia, koska se on tärkeä tuotantoeläin ja sitä tarvitsee ajoittain lääkittää esimerkiksi erilaisilla antibiooteilla, joiden vaikutusta ja metaboliaa ei vielä tunneta. (Honkakoski 2014-2-3). Promootorialueiden tutkimisen avulla saadaan lisää tietoa lääkkeiden metaboliasta, mahdollisista yhteisvaikutuksista muiden lääkeaineiden kanssa sekä niiden sopivasta annostelusta naudoilla.

Työn avulla CYP-geenin promootorialueelta löydettiin kaksi aluetta, joiden aktiivisuus lisääntyi näiden kahden tumareseptorin vaikutuksesta. Etenkin PXR:n aktivaatio lisääntyi merkittävästi. Lisäksi löydettiin myös alue, jonka aktiivisuus väheni. Tutkimus täytyy toistaa tulosten varmentamiseksi ja aiheesta tullaan tulevaisuudessa tekemään jatkotutkimuksia.



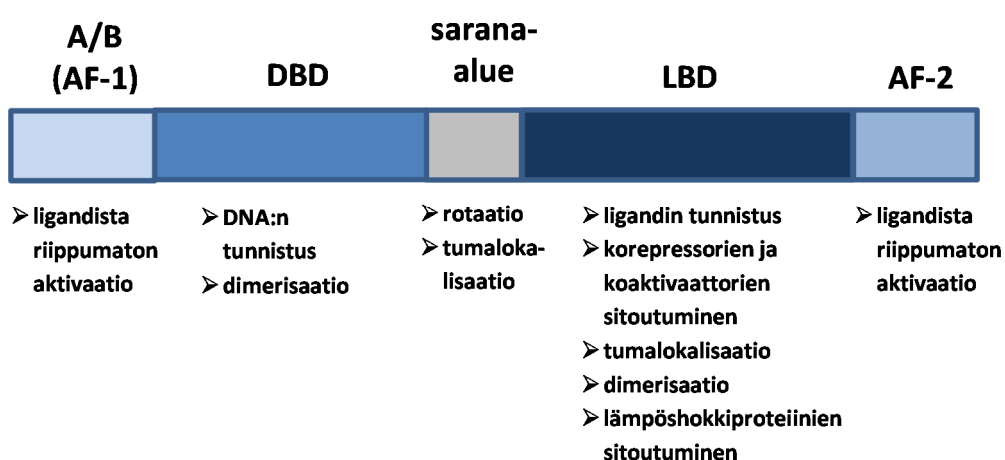
## 2 TUMARESEPTORIT

Tumareseptorit ovat transkriptiotekijöitä, ja ne toimivat solunsisäisten ja -ulkoisten signaalien sensoreina. Ne ohjaavat solujen biologista kehitystä, erilaistumista, metabolisen tasapainon säilymistä ja suojaavat soluja stressiltä. Tumareseptorien avulla organismi voi suoraan säädellä geenien ilmentymistä vasteena stressiin, joka voi olla fysiologista, organismin kehityksen tai ympäristön aiheuttamaa. (Li ja Wang 2010; Giguère 1999, 690.) Nisäkkäiden tumareseptoriperheeseen kuuluu yli 70 jäsentä, jotka on jaettu kahteen eri alaluokkaan niiden ligandin sitomisen edellytysten perusteella. Ensimmäiseen ryhmään kuuluvat ligandista riippuvat tumareseptorit, joita säädellään monenlaisilla eksogeenisillä yhdisteillä sekä endogeenisillä aineilla. Tähän ryhmään kuuluvat esimerkiksi glukokortikoidireseptori (GR), estrogeenireseptori (ER), androgeenireseptori (AR) ja retinoidihapporeseptori (RAR). Toinen ryhmä koostuu niin kutsutuista orporeseptoreista, jotka ovat rakenteeltaan samanlaisia kuin muutkin tumareseptorit, mutta niitä säätelviä ligandeja ei ollut vielä tunnistettu kloonaushetkellä. Noin 60 % kaikista tumareseptoreista on orporeseptoreita. Niihin kuuluvat esimerkiksi peroksisomiproliferaattori-aktivoituvat reseptorit (PPARs), maksan X-reseptorit (LXRs), aryylihiilivetyreseptori (Ah), kostitutiivinen androstaanireseptori (CAR) ja pregnaani X-reseptori (PXR). (Chen ym. 2012, 1114.)

Tumareseptorit ovat nousseet tutkijoiden mielenkiinnon kohteeksi, sillä niillä on tärkeä merkitys monissa biologisissa prosesseissa ja niiden kautta on mahdollista löytää lääkkeitä vaikeasti hoidettaviin ja kansantaloudellisesti merkittäviin aineenvaihduntatauteihin, kuten syöpään ja diabetekseen. Tumareseptorien aktiivisuutta voidaan säädellä luonnollisilla sekä synteettisillä yhdisteillä, mikä tekee niistä hyviä lääkekehittelyn kohteita. (Giguère 1999, 689.) Tumareseptorien tutkiminen ja lisääntynyt tieto niiden toiminta- ja vaikutusmekanismeista voi mahdollistaa turvallisempien ja vähemmän sivuvaikutuksia aiheuttavien lääkkeiden kehittämisen. Eri lajien tumareseptorien tutkimus antaa tietoa tumareseptorien evoluutiosta ja selittää lääkkeiden vaikutusten lajien välisiä eroja. (Ottow ja Weinmann, 2008.) Tumareseptorien aktivoituminen vaatii usein ligandin sitoutumisen, ja siksi erityisesti niiden ligandiin sitoutuvan alueen eli LBD:n tutkiminen on tärkeässä asemassa uusien lääkeaineiden kehittämisessä ja lääkeaineiden haitallisten yhteisvaikutusten välttämässä. (Wu, Li ja Dong 2013, 574).

Tumareseptorit koostuvat neljästä erilaisesta ja itsenäisestä osasta, jotka kuitenkin ovat keskenään vuorovaikutuksessa (Kuvio 1.). Nämä neljä osaa ovat säätelydomeeni, DNA:ta sitova alue (DBD, DNA binding domain), sarana-alue sekä ligandia sitova alue (LBD, ligand binding domain). N-terminaaliosassa päässä olevaa säätelyaluetta kutsutaan myös A/B-domeeniksi, jonka toiminta on solutyypille ja kohdegeenille spesifistä. Sen pituus ja sekvenssi vaihtelevat ja siihen kuuluu yleensä ligandista riippumaton aktivaatioalue AF-1. A/B-alueen vaihtoehdoisen silmukoinnin tai erilaisten promootorialueiden seurauksena tumareseptoreille syntyy useita isoformeja. (Aranda ja Pascual 2001, 1271; Giguère 1999, 690.) DNA:ta sitova alue tunnistaa kohdegeenin hormonivaste-elementistä (HRE) sille spesifisen DNA-sekvenssin, johon tumareseptori sitoutuu. Alue on kaikista tumareseptorin alueista konservoitunein ja se koostuu kahdesta sinkkisormesta. Ensimmäisen sinkkisormen P-box-alue vastaa kohdegeenin tunnistamisesta ja aktivaatiosta ja toinen, D-box-alue, osallistuu reseptorin

dimerisaatioon. (Aranda ja Pascual 2001, 1273; Giguère 1999, 691.) DBD- ja LBD-alueen välissä on sarana-alue, joka on rakenteeltaan taipuisa ja pituudeltaan sekä sekvenssiltään vaihteleva alue. Se myös vaikuttaa koaktivaattoreiden ja korepressorien sitoutumiseen sekä reseptorin tumalokalisatioon. LBD-alue tunnistaa ligandin ja sitoutuu siihen. Lisäksi se vastaa korepressorien ja koaktivaattorien sitoutumisesta, osallistuu dimerisaatioon, tumalokalisatioon ja lämpöhokkiproteiinien sitoutumiseen. Se koostuu kahdesta konservoituneesta osasta: ligandin sitoutumisen kannalta välttämättömästä signature motif:ista ja ligandin sitoutumisesta riippuvaisesta AF-2 aktivaatioalueesta. LBD:ssä on yleensä 12  $\alpha$ -heliksiä, jotka numeroidaan H1–H12. H5 ja H6 välissä on yleensä myös yksi  $\beta$ -laskos. Kiertteet ovat muodostuneet kolmikerroksiseen "kerrosvoileipä"-rakenteeseen, jossa sijaitsee ligandia sitova tasku (engl. ligand binding pocket, LBP). (Aranda ja Pascual 2001, 1273–1274; Giguère 1999, 691–692.)



KUVIO 1. Tumareseptorien perusrakenne (Mukaiillen Giguère 1999, 691; Aranda ja Pascual 2001, 1272.)

Ligandin sitoutuminen reseptoriproteiinin muuttaa sen kolmiulotteista rakennetta eli konformaatiota. Tumareseptoriin sitoutuneet lämpöhokkiproteiinit irtoavat, ja vapaat reseptori-ligandikompleksit muodostavat dimeerin, joka sitoutuu tumassa kohdegeeniensä tunnistuskohtiin. Sekä reseptorin kiinnittyminen kohdegeenin säätelyalueelle että muiden paikalla olevien transkription säätelytekijöiden vaikutus aikaansaa lähetti-RNA:n tuotannon lisääntymisen. Proteiinisynteesin kautta vaikutus johtaa muutokseen solutasolla ja lopulta elimistön biologisten prosessien muutokseen. (Scheinin 2007.)

## 2.1 Tumareseptorit lääkeainemetaboliassa

Lääkeainemetabolia on elimistön suojausmekanismi, jonka tarkoituksena on päästä eroon tarpeettomista ja elimistölle haitallisista aineista. Tämä tapahtuu muokkaamalla lääkeaineita helpommin eritettävään ja usein vähemmän aktiiviseen muotoon. Muokkaaminen voi kuitenkin muuttaa aineita reaktiivisempaan muotoon, ja metaboliilit voivat olla elimistölle haitallisia. Lääkeaineet voivat myös indusoida tai inhiboida toistensa vaikutusta, jolloin voi aiheutua vaarallisia lääkeaineiden yhteisvaikutuksia tai lääkeaineen teho voi heiketä. Lääkeaineiden muokkaaminen tapahtuu pääosin maksassa,

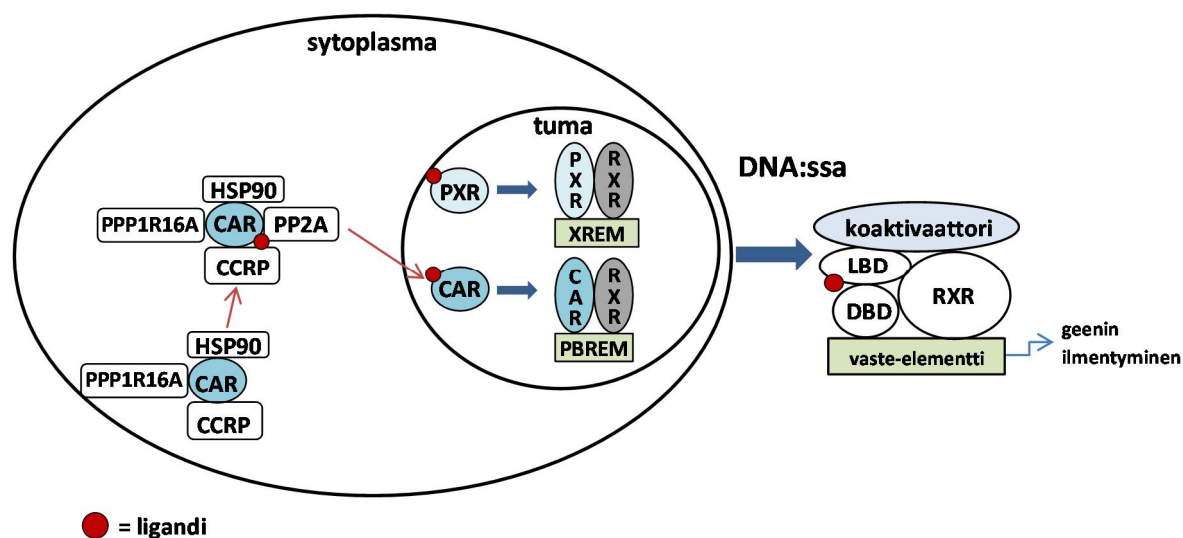
jossa ilmennetään suuria määriä metaboloivia entsyymejä. Metaboliareaktiot jaotellaan yleensä kolmeen eri faasiin. Faasiin I kuuluvat hapetus-, pelkistys- ja hydrolyysireaktiot. Tärkeimpiä faasi I entsyymejä ovat sytokromi P450-entsyymit (CYP), jotka osallistuvat monien lääkeaineiden metaboliaan. Faasin II reaktioihin luetaan erilaiset konjugointireaktiot, joissa usein muokataan faasi I:n reaktiossa syntyneitä tuotteita vielä vesiliukoisempaan muotoon. Faasiin III kuuluu lääkemetaaboliittien kuljetamiseen liittyviä proteiineja sekä reaktioita. CYP-entsyymien arvioidaan metabolisoivan, joko suoraan tai osittain yli 90 %:a kaikista lääkkeistä. (Küblbeck 2012, 2–6.) Virheet CYP-geeneissä voivat aiheuttaa muutoksia steroidien, rasvahappojen, sappihappojen ja kolesterolin muodostumiseen, D-vitamiinin määrän säätelyyn ja retinoidien ohjaamassa yksilön kehityksessä (Nebert, Wikvall ja Miller 2013, 1).

## 2.2 Konstitutiivinen androstaanireseptori ja pregnaani X-reseptori

Endogeenisen altistuksen lisäksi ympäristöstä tulevat ksenobioottiset eli elimistölle vieraat aineet rasisittavat elimistöä, joka pyrkii pääsemään eroon sille haitallisista aineista. Ksenobiootteina voivat toimia erilaiset lääkkeet, ravinnosta saatavat lisäaineet, karsinogeenit, nautintoaineet, ympäristökemikaalit ja saasteet. (Küblbeck 2012, 1; Timsit ja Negishi 2006, 231–232; Huupponen ja Raunio 2007.) Konstitutiivinen androstaanireseptori (engl. constitutive active/androstane receptor, CAR, NR113) ja pregnaani X-reseptori (engl. pregnane X receptor, PXR, NR112) toimivat keholle haitallisten aineiden sensoreina ja tehostavat niiden poistumista elimistöstä. Tämä erityispiirre erottaa ne muista tumareseptoreista, kuten estrogeeni- ja glukokortikoidireseptorista, jotka reagoivat elimistön muuttuneisiin steroidihormonitasoihin ja ylläpitävät kehon homeostaasia. CAR ja PXR pystyvät sitoutumaan lukuisiin eri ligandeihin ja niiden ligandispesifisyys on lajikohtaista. (Timsit ja Negishi 2006, 231, 233.) CAR ja PXR kuuluvat tumareseptorien NR11-alaryhmään. Niitä ilmennetään pääosin maksassa ja ne säätelevät osittain samoja kohdegeenejä. Niillä on myös yhteisiä ligandeja ja ne molemmat muodostavat heterodimeerin RXR:n kanssa sitoutuessaan kohdegeenin säätelyalueelle. CAR ja PXR indusoivat sytokromi P450-geeniperheen lääkeainemetaboliaan vaikuttavia entsyymejä CYP2B6 ja CYP3A4, mutta niillä on myös vaste-elementtejä samoissa geeneissä ja ne pystyvät säätelemään toistensa kohdegeenejä. CYP2B6 ja CYP3A4-entsyymit metaboloivat suurta osaa nykyään käytettävistä lääkeaineista ja ne voivat joko lisätä tai vähentää niiden vaikutusta. (Küblbeck 2012, 20; Vignati, Boggi, Grossi ja Monshouwer 2004, 23–24; Tojijama ym. 2012, 288.)

CAR ilmentyy pääosin maksassa, mutta sitä ilmenee hiukan myös munuaisissa ja aivoissa (Timsit ja Negishi 2006, 232). CAR eroaa konstitutiivisella aktiivisuudellaan muista tumareseptoreista, jotka pysyvät sytoplasmassa ja siirtyvät tumaan vasta ligandin kiinnittymisen aiheuttaman aktivoitumisen jälkeen. Konstitutiivisen aktiivisuutensa vuoksi CAR omaa voimakkaan transkriptioaktiivisuuden ilman ligandin läsnäoloa, mutta se aktivoituu myös ligandin kiinnittymisen seurauksena. Aktivoitumaton CAR pidetään sytoplasmassa, jossa se on kiinnittynyt retentiokompleksiin (Kuvio 2). Kompleksin muodostavat CCRP (sytoplasmic CAR retention protein), hsp90 (90-kDa heat shock protein) ja PPP1R16A (protein phosphatase 1, regulatory subunit 16A). Molemmat aktivaatioon riippuva suora ja itsenäinen epäsuora aktivaatio, saavat aikaan CAR:n irtoamisen kompleksista. Epäsuoraan aktivaatioon liittyy myös CAR:n defosforylaatio PP2A:n (protein phosphatase 2A) välityksel-

lä. Kompleksista irrottuaan CAR siirtyy tumaan, jossa se heterodimerisoituu RXR:n kanssa ja siihen sitoutuu koaktivaattoreita, kuten GRIP1/TIF2, PGC-1 ja SRC-1. Kompleksi sitoutuu CAR:n kohdegeenien vaste-elementteihin käynnistäen geenien ilmentämisen. Yksi tärkeä tapa CAR:n aktivaation säätelyssä on sen translokaatio eli siirtyminen tumaan. Mekanismeja on tutkittu paljon, mutta siitä ei ole vielä saatu yksityiskohtaista ymmärrystä. (Chen ym.2012, 1118; Timsit ja Negishi 2006, 233.) Primäärihepatosyyteissä ja in vivo-olosuhteissa CAR on sytoplasmassa, josta se siirtyy indusorin vaikutuksesta tumaan. Transformoiduissa solulinjoissa CAR:n sytoplasmassa pitävät tekijät puuttuvat tai ne toimivat puutteellisesti, jolloin se pysyy jatkuvasti aktivoituneena tumassa ilman indusorin aiheuttamaa kemiallista aktivaatiota. (Li ja Wang 2010, 411.)

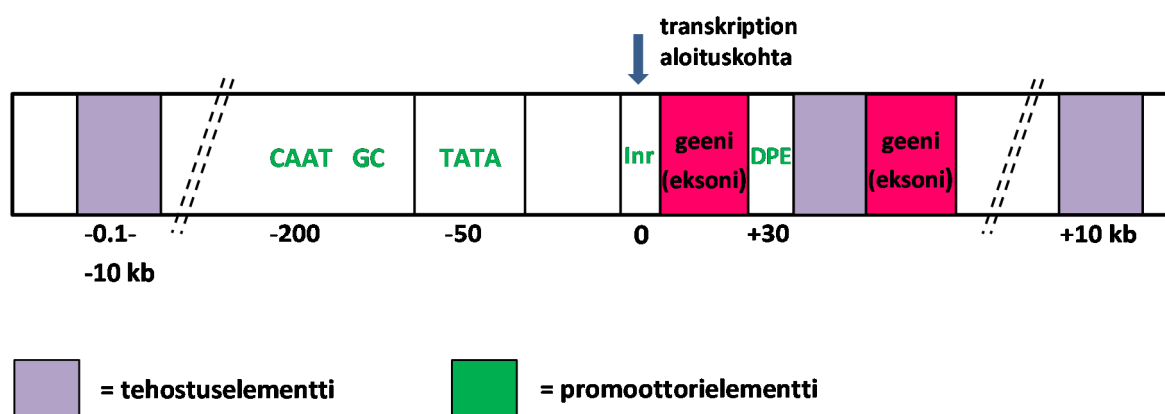


KUVIO 2. CAR- ja PXR-tumareseptorin aktivoituminen ja kohdegeenin ilmentäminen. (Mukaillen Anttila 2013, 17; Timsit ja Negishi 2007, 235.)

PXR kuuluu orpotumareseptoreiden alaperheeseen NR1 ja se muodostaa niiden lailla heterodimeerin retinoidi X-reseptorin kanssa (RXR) ennen kohdegeeniin sitoutumista (Kuvio 2). PXR ilmentyy suurimmaksi osaksi maksassa ja suolistossa, mutta sitä on löydetty pieninä määrinä myös munuaisista ja keuhkoista. (Pelkonen ym. 2008, 684.) PXR on tärkeä lääkekehityksen kohde, sillä se on yksi CYP3A-geenien pääsääteijä, ja se säätelee lääkeainemetabolialle tärkeitä entsyymejä ja transportteereita. CYP3A4-isoformit osallistuvat moniin kliinisesti merkittäviin lääkeaineiden välisiin interaktioihin. Tämä johtuu siitä, että CYP3A4 liittyy useamman lääkkeen metaboliaan kuin mikään muu sytokromi-P450 isoformeista ja monet lääkkeet inhiboivat niiden toimintaa. PXR:n ligandia sitova tasku on joustava ja kooltaan suuri, mikä mahdollistaa useiden kooltaan ja rakenteiltaan erilaisten yhdisteiden sitoutumisen siihen. PXR:n ligandeina toimivia lääkeaineita ovat esimerkiksi rifampisiini, nifepediini ja indinaviiri. (Reschly ja Krasowski 2008, 3; Timsit ja Negishi 2007, 237; Vignati ym. 2004, 29.)

## 3 TUMARESEPTORIEN GEENISÄÄTELY

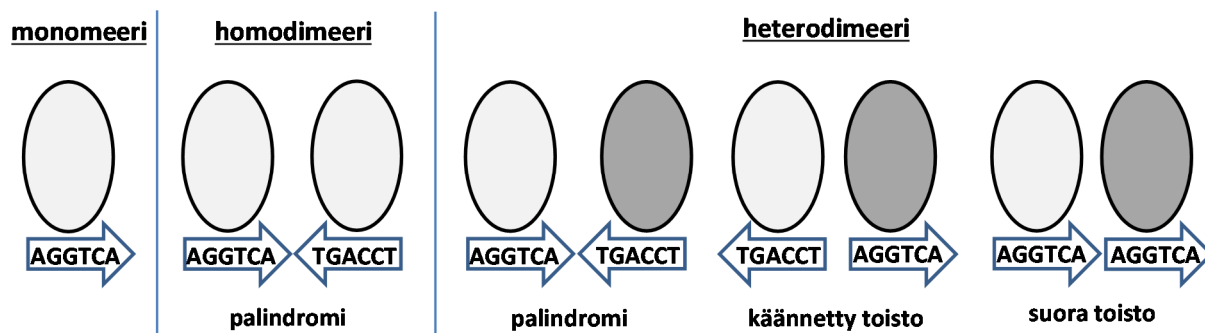
Geenit pitävät sisällään valtavan määrän biologista informaatiota, mutta kaikkea tietoa ei tarvita koko ajan, joten vain osaa geneeistä ilmennetään kaikissa soluissa jatkuvasti. Näitä housekeeping-genejä lukuun ottamatta geenien sisältämää tietoa tarvitaan vain tietyissä olosuhteissa, joten eliöt pystyvät säätelemään geeniensä aktiivisuutta ja sammuttamaan geenit, joiden tuottamia proteiineja ei tarvita sillä hetkellä. Ihmisessä on noin 250 erilaista solutyyppiä, jotka ovat erilaistuneet omaksi tyyppikseen solujen geenisäätelyn ja kudosspesifisten geenien ilmentämisen tuloksena. Myös ympäristö ja eliön kehitysvaihe vaikuttavat geenien ilmentymiseen. Yksinkertaistettuna solussa olevien geenituotteiden määrä riippuu proteiinisynteesin ja proteiinien hajoamisen nopeuden sekä määrän välisestä suhteesta. (Brown 2005, 145–148.)



KUVIO 3. Eukaryoottien transkription säätelyalueet (Mukaillen Suominen, Pärssinen, Haajanen ja Pelkonen 2010, 61.)

Eukaryoottien geenisäätely on monimutkaisempaa kuin bakteereilla ja geenien toimintaa säätelee suuri joukko erilaisia transkriptiotekijöitä. Säätelyalueet ovat DNA-alueita, jotka ohjaavat geenin toimintaa. Niihin kuuluvat varsinainen promoottorialue sekä tehostusalueet, joiden perusrakenne on havainnollistettu kuviossa 3. Eukaryooteilla on kolme RNA-polymeraasia, joista geenitekniikan kannalta tärkein on polymeraasi II, joka osallistuu proteiineja koodaavien geenien transkriptioon. RNA-polymeraasi II:n promoottorit sisältävät yleensä TATA-laatikon (engl. TATA box), joka sijaitsee noin 30–100 nukleotidia ylävirtaan transkription aloituspaikasta. Usein TATA-laatikon lisäksi esiintyy -3-+5 alueella oleva initiaatioelementti (engl. iniator element), joka vahvistaa promoottorin vaikutusta. Jos promoottorialueella ei sijaitse TATA-laatikkoa, niin siellä on DPE (engl. downstream core promoter element) noin +28- +32 nukleotidia alavirtaan transkription aloituskohdasta sekä initiaatioelementti (Inr, engl. iniator element). Lisäksi promoottorialueeseen voi kuulua aktivaatioalueita, kuten CAAT-laatikko ja GC-laatikko. Aktiivisuutta säädellään myös tehostusalueiden (engl. enhancer) ja vaimennusalueiden (engl. silencer) avulla, jotka toimivat yhdessä erilaisten transkriptiotekijöiden kanssa. Ne voivat sijaita hyvinkin kaukana varsinaisesta promoottorista tai olla jopa geenin sisällä olevissa introneissa. Promoottorialueen sekvenssin perusteella voidaan usein päätellä sen voimakkuus eli se kuinka tehokkaasti se toimii transkription aloitusalueena. (Suominen ym. 2010, 59–61.)

Transkription jälkeen eukaryoottien lähetti-RNA käy läpi vielä muokausvaiheita ennen proteiinisyn-  
teesiä. Lähetti-RNA-molekyylin molempia päitä muokataan kemiallisesti: 5' -pään lisätään "hattu"-  
rakenne eli 7-metyyliguanosiini-trifosfaatti sekä 3' -pään lisätään jopa 250 adenosinia eli poly-A  
hantä. Intronit eli ei-koodaavat alueet poistetaan entsymaattisesti silmukoimalla, jolloin jäljelle jää  
vain varsinaista proteiinia koodaava osa. Intronien silmukointi voi tapahtua vaihtoehtoisin tavoin, jol-  
loin samasta geenistä voi syntyä useita erilaisia proteiineja. (Walsh 2007, 43; Brown 2005, 92–95;  
Suominen ym. 2010, 35.)



KUVIO 4. Tumareseptorien kiinnittymistavat vaste-elementtiin (Mukaillen Lee ja Park 2008, 156.)

Tumareseptorit säätelevät geenien ilmentämistä sitoutumalla kohdegeenien HRE-alueille eli vaste-  
elementteihin, jossa reseptorin DNA:ta sitova alue tunnistaa sille ominaisen sekvenssin, joka on  
yleensä AGGTCA. HRE-alueet sijaitsevat yleensä lähellä lähipromoottoria, johon RNA-polymeraasi II  
sitoutuu. Tumareseptorit voivat sitoutua HRE-alueelle sellaisenaan monomeerina, yhdessä toisen  
samanlaisen reseptorin kanssa homodimeerina tai toisen erilaisen reseptorin kanssa heterodimeerina  
(Kuvio 4). Monomeerit kiinnittyvät yksittäisiin AGGTCA-jaksoihin ja homodimeerit palindromeihin  
(käänteistoisto, inverted repeat). Heterodimeereillä on sitoutumismahdollisuuksia kaikista eniten, sil-  
lä ne voivat sitoutua palindromien lisäksi käännettyihin toistoihin (everted repeat) ja suoriin toistoi-  
hin (direct repeat). (Aranda ja Pascual 2001, 1275; Giguère 1999, 691–692; Lee ja Park 2008, 156.)

#### 4 CAR:N JA PXR:N LBD-ALUEIDEN HOMOLOGISUUS ERI LAJIEN VÄLILLÄ

Lähes kaikki lajit bakteereista jyrsijöihin sekä ihmisiin ilmentävät CYP-entsyymejä, ja kaikkien CYP-geenien oletetaan olevan peräsin samalta, noin 3 miljardia vuotta sitten eläneeltä, esi-isältä (Nebert, Wikvall ja Miller 2013, 1). Eläinlajien välillä on kuitenkin eroja CYP-entsyymien ilmentämisessä, ja esimerkiksi rotan tai hiiren metaboliset entsyymit eivät välttämättä käyttäydy samalla tavalla kuin ihmisellä. Jyrsijöiden ja ihmisen CAR:n välillä on yhteneväisyyksiä esimerkiksi sen translokaatioissa fenobarbitaali-altistuksen seurauksena ja sitoutumisessa PBREM:iin. Lajien välisestä erosta kertoo esimerkiksi se, että ihmisille CITCO toimii mahdollisena CAR:n agonistina ja hiirellä taas ei. (Chen ym. 2012, 1118.) PXR:n aktivaattoreiden välillä on myös merkittäviä lajien välisiä eroja. Esimerkiksi ihmisen, koiran, sian ja kanan PXR:ään pystyy sitoutumaan suuri määrä erilaisia ligandeja, kun taas hiiren PXR:lle spesifisten ligandien joukko on suppeampi. Ihmisillä lääkaineina käytetyt rifampisiini ja nifepediini aktivoivat ihmisen PXR:ää, mutta eivät hiiren PXR:ää. (Reschly ja Krasowski 2006, 4)

Eri tumareseptorien LBD-alueet ovat perusrakenteeltaan hyvin samanlaisia, mutta lajien väliset erot CAR ja PXR-välitteisessä CYP-entsyymien ilmentämisessä johtuvat eroista niiden ligandia sitovan taskun rakenteessa (Küblbeck ym. 2011, 2424). Nykyiseen geneettiseen tietoon pohjautuen useampia NR11-ryhmän tumareseptoreita on löydetty vain selkärankaisilta. CAR:a koodaavia geenejä on tähän mennessä löydetty pelkästään nisäkkäiltä ja PXR:ää koodaavia geenejä muilta nisäkkäiltä paitsi leuatomilta selkärankaisilta. (Reschly ja Krasowski 2006, 2–3.)

Suurin osa selkärankaisten lajien välisistä tumareseptorigeeneistä on hyvin konservoituneita, ja esimerkiksi ihmisen ja hiiren DBD-alueiden sekvenssit ovat tyypillisesti yli 95 %: sesti identtisiä ja LBD-alueella yli 85 %: sesti samanlaisia. CAR ja PXR eroavat tässä asiassa muista tumareseptoreista ja niiden LBD-alueissa esiintyy suurempaa eroavuutta eri lajien välillä. Tutkimusten mukaan luonnonvalinta on suosinut lajien välistä CAR:n ja PXR:n LBD-alueiden sekvenssien monimuotoisuutta, ja sen avulla lajit ovat voineet sopeutua paremmin erilaisiin ympäristön tai elimistön sisäisiin haitallisiin aineisiin. Erot ovat erityisen suuria PXR:n kohdalla, jonka ihmisen ja jyrsijöiden LBD-alueet ovat keskenään vain 75 %:sesti identtisiä. (Reschly ja Krasowski 2006, 4–5.) LBD-alueen vähäinen konservoituminen aiheuttaa eroja eri lajien välisiin ligandeihin, ja nämä erot rajoittavat eläimillä saatujen tulosten kykyä ennustaa ligandien sitoutumista ihmisillä (Pelkonen ym. 2008, 684).

Sytokromi P450-entsyymien induktiota voidaan tutkia eläinkokeiden lisäksi käyttämällä ihmisen hepatosyyttejä, jolloin välttyään eri lajien välisten erojen aiheuttamalta epäluotettavuudelta. Ihmisen primäärihepatosyytit tarjoavat varteentettavan tutkimusmallin sytokromi P450-entsyymien induktion tutkimiseen, mutta ongelmaksi voi muodostua maksanäytteiden ylläpito sekä suuret näytteiden väliset erot. Näiden ongelmien välttämiseksi on kehitetty erilaisia aktivaatiokokeita, joilla voidaan tutkia uusia ligandeja ja nopeuttaa lääkaineiden kehitysprosessia. (Vignati ym. 2004, 24.)

## 5 KÄYTETYT TYÖMENETELMÄT

Kloonaustyössä käytettiin erilaisia geenitekniikan perustyömenetelmiä, joista tärkein oli polymeerasiketjureaktio. Subkloonaaminen koostuu monesta eri vaiheesta, ja työn pysähdyttyä PCR-monistukseen, ei sen jälkeen olevia työvaiheita ole selostettu yksityiskohtaisemmin.

### 5.1 Subkloonaus

Geenitekniikassa kloonaamisella (engl. molecular cloning) tarkoitetaan jonkin tietyn geenin monistamista elävässä organismissa ja sen eristämistä. Geeni liitetään osaksi vektoria, jota monistetaan isäntäsolussa. Näin saadaan tuotettua klooneja, joilla kaikilla on siirretty geeni. Bakteerit ovat yleisimmin käytettyjä isäntäsoluja, sillä ne monistuvat nopeasti ja tuottavat suuria määriä kloonattua geeniä. Bakteereilla kloonaatessa vektorina toimii plasmidi, joka on rengasmainen ja autonomisesti kopioituva DNA-molekyylä. Plasmidissa täytyy olla ori-alue, joka säätelee sen kopioitumista. Lisäksi tarvitaan selektiogeeni, jonka avulla kloonattavan DNA:n sisältävät solut voidaan erotella muista soluista. Valintamenetelmänä toimii yleensä resistenssi jollekin antibiootille, kuten ampicillinille. Näiden lisäksi plasmidissa täytyy olla myös restriktiokohta (MCS), joka sisältää katkaisukohtia eri restrikti entsyymeille. (Suominen ym. 2010, 66–70; Ulmanen, Tenhunen, Yläne, Valste ja Viitanen 2001, 61.)

Kloonaaminen alkaa joko genomisen DNA:n pilkkomisella pienemmiksi fragmenteiksi (genominen tai kromosomaalinen kirjasto) tai RNA:n eristämällä (cDNA-kirjasto). Kloonattava DNA ja vektori, eli bakteerisolussa monistettaessa plasmidi, digestoidaan samalla restrikti entsyymillä, joka katkaisee plasmidin vain yhdestä kohtaa ja luo kloonattavan DNA:n päihin vektorin kanssa yhteensopivat päät. Seuraavaksi DNA ja vektori liitetään yhteen ligaasientsyymillä avulla, joka muodostaa DNA-molekyylien välille fosfodiesterisidokset. Näin saadaan rengasmaisen plasmidin, joka sisältää kloonattavan geenin. Plasmidi siirretään eli transformoidaan isäntäorganismiin, joka alkaa monistaa kloonattavaa DNA:ta. (Suominen ym. 2010, 66–69; Pärssinen, Suominen ja Haajanen 2012, 172.)

#### cDNA-kirjaston valmistaminen

Genomisia tai kromosomaalisia kirjastoja käytetään lähinnä organismin koko genomisen sekvenssin analysoinnissa kun taas cDNA-kirjastoja valmistetaan geenien ekspression eli niiden ilmentymisen tutkimiseen (Suominen ym. 2010, 147). Eukaryoottigeenien kloonaaminen tehdään yleensä valmistamalla cDNA-kirjasto, sillä ne sisältävät vain eliön sillä hetkellä ilmentäviä geenejä eikä mukana ole ei-koodaavia intronialueita genomista. Intronialueet sisältävät geenit ovat monesti niin pitkiä, että niiden kloonaaminen ja tutkiminen on vaikeaa. Ne haittaavat myös geenin ilmentämistä bakteereissa, jotka eivät osaa poistaa intronialueita ennen proteiinisynteesiä. (Walsh 2007, 51; Suominen ym. 2010, 69.)

cDNA-kirjasto koostuu kaikesta näytteessä olevasta lähetti-RNA:sta ja se edustaa eliön sillä hetkellä ilmentämiä geenejä. Kaikki geenit eivät ilmenny kaikissa kudoksissa eivätkä ne välttämättä ole aktiivi-



visia koko ajan. cDNA-kirjaston valmistaminen alkaa RNA:n eristämällä näytekudoksesta. Totaali-RNA:sta voidaan puhdistaa pelkkää lähetti-RNA:ta affiniteettiin perustuvalla menetelmällä käyttäen oligo(dT)-pylvästä. Eristetystä lähetti-RNA:sta valmistetaan RT-PCR-menetelmällä komplementaarista DNA:ta. Käänteiskopioijaentsyymi valmistaa cDNA:n toisen juosteen liuoksessa olevista dNTP:eistä käyttäen lähetti-RNA:n emäsjärjestystä templaattina. Lähetti-RNA poistetaan, ja nauhan toinen puoli syntetisoidaan DNA-polymeraasilla. Valmistettu cDNA eli komplementaarinen DNA on vielä tässä vaiheessa typpäpäistä, mutta yleensä päihin valmistetaan alukkeiden avulla restriktioentsyymikohdat. (Suominen ym. 2010, 69–70, 151–152; Walsh 2007, 44–45)

## 5.2 Alukkeiden suunnittelu ja polymeraasiketjureaktion optimointi

Vaikkakin perusprotokollan mukaisesti pystytään monistamaan useimmat kohdesekvenssit, vaativat uudet polymeraasiketjureaktio-sovellukset todennäköisesti optimointia. Yleisimmät ongelmat ovat se, ettei haluttua tuotetta havaita ollenkaan tai sen määrä on pieni. Monistuksessa voi myös muodostua ei-haluttuja tuotetta, esimerkiksi alukkeiden sitoutuessa väärään kohtaan tai niiden sitoutuessa toisiinsa (alukedimeeri) tai niiden muodostaessa hiusneularakenteita. Alukkeiden suunnittelu onkin yksi polymeraasiketjureaktion eli PCR:n (engl. polymerase chain reaction) tärkeimmistä vaiheista eikä haluttua tuotetta saada monistettua vääränlaisilla alukkeilla. (Innis ja Gefland 1990, 3–4; Erlich 1989, 1–6; Suominen ym. 2010, 158–161.)

Monistumisen onnistumisen kannalta on erittäin tärkeää käyttää oikeaa alukkeiden kiinnittymislämpötilaa. Kiinnittymislämpötilaan vaikuttavat alukkeiden pitoisuus, pituus, nukleotidikoostumus, ionivahvuus ja niiden yhteensopivuus templaatin kanssa. Alukkeiden sulamislämpötila  $T_m$  kuvaa alukkeiden sitoutumisen voimakkuutta ja se kertoo lämpötilan, jossa puolet alukkeista on kiinnittynyt templaattiin ja puolet on vapaana reaktioliuoksessa. Lyhyiden alukkeiden sulamislämpötiloja voidaan arvioida erilaisten laskukaavojen avulla, mutta niiden tulokset ovat vain suuntaa antavia. Tarkempia tuloksia varten on kehitetty erilaisia ilmaisia tietokoneohjelmia ja internetistä löytyviä laskureita, jotka huomioivat tuloksessa myös mm. viereisten nukleotidien sekä ionivahvuuden vaikutuksen. Alukkeen korkea GC-pitoisuus (suositeltu pitoisuus 40–60 %) nostaa  $T_m$ -lämpötilaa ja se täytyy ottaa huomioon alukeparin suunnittelussa, sillä alukkeiden sulamislämpötilat eivät saisi erota toisistaan enempää kuin 2 °C:a. Alukeparin sulamislämpötilaa ei kuitenkaan yleensä käytetä suoraan annealing-lämpötilana, vaan sen optimointi aloitetaan  $T_m$ -lämpötilaa 5 astetta alemmaa. Alukkeiden kiinnittymisen spesifisyyttä kohtaan voidaan parantaa käyttämällä mahdollisimman korkeaa annealing-lämpötilaa. (Suominen ym. 2010, 158–160; Palumbi, Martin, Romano, McMillan, Stice ja Grabowski 2002, 22; Strachan ja Read 2011, 184–185.)

Alukkeiden kiinnittymislämpötilan lisäksi myös alukkeiden ja  $Mg^{2+}$ -ionien konsentraatiot voivat tarvita optimointia. Alukkeiden liian suuri konsentraatio voi aiheuttaa niiden sitoutumista väärin kohtiin, jolloin reaktiossa monistuu myös ei-haluttuja alueita ja tuotteen saanto pienenee. Lisäksi se voi aiheuttaa alukedimeerien muodostumista.  $Mg^{2+}$ -ionien määrä reaktiossa on erittäin tärkeä, sillä se on DNA-polymeraasin kofaktori eikä entsyymi toimi ilman sitä. Ioneja sitoutuu DNA:han, alukkeisiin ja

nukleotideihin, joten yleensä  $Mg^{2+}$ -konsentraatio on suurempi kuin nukleotidien ja alukkeiden konsentraatio. (Thermo Scientific 2012b; Qiagen.)

Tässä työssä käytettävä Phusion High-Fidelity DNA-polymeraasi soveltuu tarkkuutensa ansiosta hyvin kloonamiseen ja se valmistaa pitkiäkin templaatteja nopeasti, luoden tuotteille tylpät päät. Ensimmäiseksi valmistetaan Master Mix eli seos, joka sisältää kaikki muut komponentit paitsi polymeraasin ja DNA:n. Polymeraasi lisätään reaktioon viimeisenä, sillä jos entsyymi lisätään reaktioseokseen, johon ei ole lisätty nukleotideja, se voi alkaa hajottaa alukkeita. Polymeraasille optimaaliset olosuhteet voivat erota muille polymeraaseille sopivista yleisistä PCR-protokollista. Reaktiolle optimaalinen entsyymimäärä voi vaihdella 0,2–2 U:iin 50  $\mu$ l:n reaktiilavuudessa, mutta yleensä 1 U:in pitoisuus on riittävä. Ylimäärä  $Mg^{2+}$ -ioneita stabiloi DNA:n kaksoiskierrettä ja estää sen denaturoitumista. Toisaalta liiallinen määrä voi aiheuttaa alukkeiden sitoutumista väärään kohtaan templaattia, jolloin tuotteeksi ei tule suunniteltu alue. Liian vähäinen määrä voi taas pienentää saantoa. Yleisesti sopiva  $Mg^{2+}$ -pitoisuus on 0,5–1 mM suurempi kuin nukleotidien (dNTP) kokonaiskonsentraatio. (Thermo Scientific 2012b.)

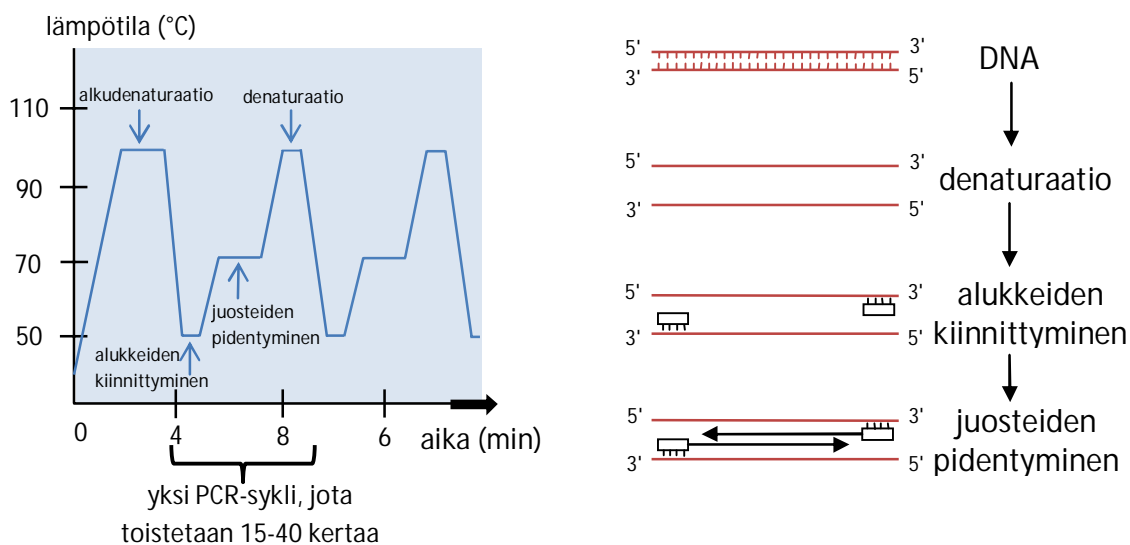
### 5.3 Polymeraasiketjureaktio

Polymeraasiketjureaktio on yleisesti käytetty bioteknologian ja molekyylibiologian menetelmä, jota käytetään esimerkiksi genomisessa kloonamisessa, RNA:n tutkimisessa, kliinisessä diagnostiikassa ja rikostutkinnassa. Menetelmää ja sen eri sovelluksia hyödynnetään myös lääketutkimuksessa uusien lääkeaineiden etsinnässä, niiden kehittämisessä ja diagnostiikassa. Reaktiot tehdään yleensä pienissä ja ohutseinäisissä mikrosentrifugiputkissa, joiden lämpötilaa PCR-laite säätelee tarkasti ja nopeasti. (Sindelar 1997, 123–124; Suominen ym. 2010, 153.)

PCR:llä voidaan valmistaa entsyymaattisesti miljoonia kopioita DNA-jaksosta, joka sijaitsee kahden nukleotidijärjestykseltään tunnetun DNA-jakson välissä. DNA-polymeraaseja on eristetty mm. kuumissa lähteissä elävistä bakteereista, joten ne ovat termostabiileja entsyymejä eivätkä hajoa tai inaktivoidu lähellä 100 °C:ta olevissa lämpötiloissa. Monistaminen perustuu spesifisiin alukkeisiin, jotka kiinnittyvät DNA:n molempiin juosteisiin, monistettavan alueen molempiin päihin. Alukkeet rajaavat monistuvan alueen, joka voi olla kooltaan jopa useita kymmeniätuhansia emäspareja. Alukkeet suunnitellaan tietokoneohjelmien avulla sellaisiksi, ettei monistettavassa DNA:ssa esiinny samanlaista jaksoa muualla, jolloin reaktiosta saadaan monistettua vain haluttu sekvenssi. Aluke on synteettisesti valmistettu lyhyt DNA-fragmentti, jonka pituus on yleensä 15–40 nukleotidia. PCR-menetelmä on niin herkkä, että monistaminen onnistuu jopa yhdestä templaattista. (Suominen ym. 2010, 153–154; Pärssinen ym. 2012, 179.)

PCR:ssä toistetaan kolmea eri vaihetta: denaturaatiota (engl. denaturation), alukkeiden kiinnittymistä (engl. annealing) ja juosteiden pidentymistä (engl. extension). Menetelmän perusidea on esitetty kuviossa 5. Denaturaatio on nopea kuumennusjakso, jonka aikana DNA-juosteiden väliset vetysidokset katkeavat ja templaatti-DNA avautuu yksijuosteiseksi. Denaturoinnin vaatima lämpötila voi vaihdella hieman templaatti-DNA:n alkuperästä riippuen, mutta yleensä se on 91–95 °C. Denatu-

roinnin jälkeen reaktioseos viennetään alukekohtaiseen kiinnittymislämpötilaan (n. 45–60 °C), jossa alukkeet kiinnittyvät komplementaarisesti yksijuosteiseen templaatti-DNA:han. Pidennysvaiheessa putket lämmitetään noin 72 °C:een ja DNA-polymeraasi alkaa valmistaa molemmista suunnista alukkeiden välistä sekvenssiä alukkeiden 3' -päistä lähtien. Vastinnauhan valmistamiseen käytetään reaktioseoksessa olevia nukleotideja (dNTP). Kun nauha on valmis, palataan takaisin ensimmäiseen vaiheeseen ja putket lämmitetään takaisin denaturaatiolämpötilaan. Tätä sykliä toistetaan 15–40 kertaa ja monistettavan tuotteen määrä lisääntyy eksponentiaalisesti. (Sindelar 1997, 124; Strachan ja Read 2011, 183; Suominen ym. 2010, 153–156.)



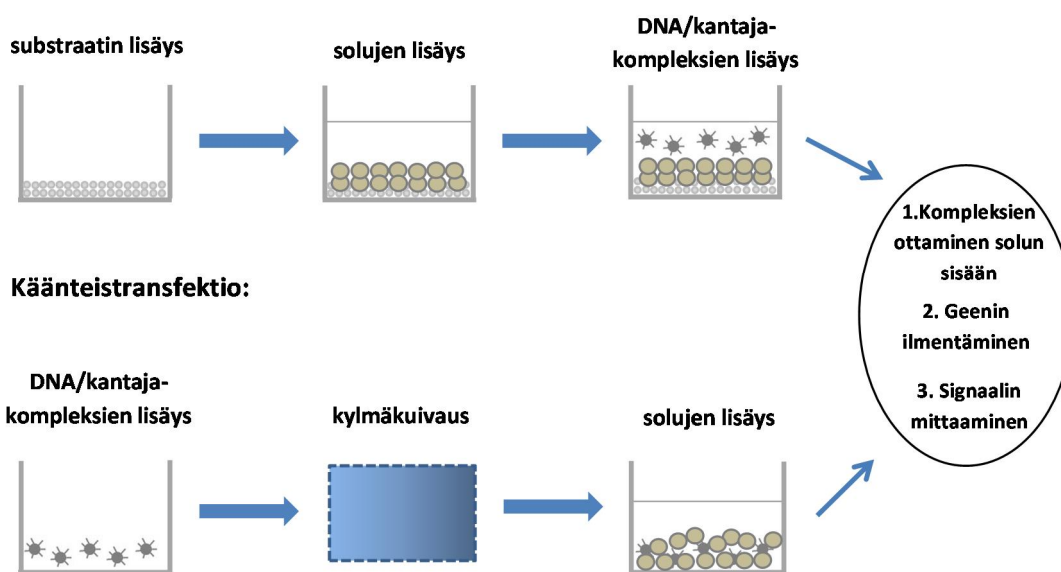
KUVIO 5. PCR:n toimintaperiaate ja eri vaiheet (Mukaiillen Sindelar 1997, 17.)

PCR-sovelluksissa käytetään monia erilaisia polymeraasientsyymejä, joista yleisin on *Thermus aquaticus*-bakteerista eristetty *Taq*-polymeraasi. Se kuitenkin tekee melko paljon virheitä monistuksessa, joten monissa sovellutuksissa käytetään muita, vähemmän virheitä tekeviä polymeraaseja, kuten *Pfu*-, ja *Vent*-polymeraaseja. Osa polymeraaseista pystyy myös korjaamaan tekemiään kopiointivirheitä eli niillä on oikolukuaktiivisuus (engl. proofreading activity). PCR-reaktioissa tapahtuu aina virheitä, mutta erityisen suuri merkitys on virheillä, jotka tapahtuvat aivan ensimmäisten syklien aikana. (Suominen ym. 2010, 153, 158.) PCR-ajon optimiolosuhteet riippuvat käytettävästä polymeraasientsyymistä. Valmistajat antavat suosituksia entsyymeillä yleisesti toimivista olosuhteista sekä PCR-ohjelmista. Työssä käytetty Phusion High-Fidelity DNA -polymeraasi sopii erityisen hyvin kloonaukseen. Se kopioi templaatin nopeasti ja tarkasti jättäen tuotteille tylpät päät. (Thermo Scientific 2012b.) Lisäksi käytettiin DreamTaq™-polymeraasia, joka on paranneltu versio *Taq* DNA polymeraasista ja se käy kaikkiin tavallisimpiin PCR-sovelluksiin. Se lisää PCR-tuotteiden 3' -päihin deoksiadenosi (A)-emäksen. (Thermo Scientific 2012a.)

## 5.4 Käänteistransfektio

Käänteistransfektio on Ziauddin ja Sabatinin (2001, 107–110) kehittämä menetelmä, jossa DNA/kantaja-kompleksi on valmiina transfektioalustalla ja solut lisätään kompleksien päälle. Perinteisessä transfektiossa järjestys on päinvastainen eli solut laitetaan ensin transfektioalustalle ja DNA/kantajakompleksit lisätään solujen joukkoon (kuvio 6).

Reinisalo, Urtti ja Honkakoski (2005, 437) kehittivät hankalasti transfektoitaville ihmisen retinoblastoomasoluille käänteistransfektioimenetelmän, jossa pikajäädetyt DNA/PEI-kompleksit kylmäkuivat- tiin 48-kuoppalevyille ja säilytettiin eksikaattorissa niiden käyttöön asti. Perinteiseen transfektioon verrattaessa sen eduksi havaittiin useita seikkoja: menetelmä ei vaadi seerumivapaita olosuhteita, kompleksit lisäävät solujen kiinnittymistä alustaan ja käänteistransfektiolevyjä voidaan säilyttää pitkiä aikoja transfektiotehokkuuden vähenemättä tai solutoksisuuden lisääntymättä. Niitä voidaan myös valmistaa isoja määriä kerralla, jolloin transfektio voidaan toteuttaa isommassa mittakaavassa. Lisäksi käänteistransfektio vaikuttaa olevan toistettava, edullinen ja monikäyttöinen menetelmä, jota voidaan soveltaa useissa proteiinitutkimuksissa sekä geenien säätelyalueiden tutkimisessa.

**Perinteinen tapa suspensiosolujen transfektioon:**

KUVIO 6. Solujen transfektio perinteisellä tavalla sekä käänteistransfektioilla (Mukaiillen Reinisalo ym. 2005, 438.)

Transfektiossa käytetty PEI (engl. polyethylemine) on rakenteeltaan vakaa kationinen polymeeri, jolla on positiivisesti varautunut selkäranka. Hyvän transfektiotehokkuuden ja monille eri solulinjoille soveltuvuuden ansiosta se on yksi yleisimmin käytetyistä ei-virusperäisistä transfektiotavoista. PEI kietoutuu negatiivisesti varautuneen DNA:n pinnalle ja kompleksi sitoutuu solun pinnalle. Kompleksi kuljetetaan pinnalta soluun endosytoosirakkulan sisällä, josta se vapautuu sytoplasmaan rakkulan revettyä osmoottisen turpoamisen seurauksena. PEI:llä on myös todettu olevan puskurointiominaisuuksia, jotka suojaavat DNA:ta hajoamiselta sekä edistävät kompleksin vapautumista rakkulasta. (Ehrhart ym. 2006, 179, 183; Park, Jeong ja Kim 2006, 471–472.) Transfektio-  
tehokkuuden kannal-

ta on tärkeää, että solut ovat logaritmisessa kasvuvaiheessa. Parhaan lopputuloksen saamiseksi myös DNA:PEI-suhde kannattaa optimoida kullekin solulinjalle erikseen. Suuremman DNA- ja PEI-pitoisuuden käyttäminen parantaa transfektion tehokkuutta vain tiettyyn rajaan asti, sillä suuret PEI-pitoisuudet ovat toksisia soluille. (Ehrhardt ym. 2006, 179, 183; Park ym. 2006, 471–472.)

## 5.5 Reportterigeenimittaus

Reportterigeenimittauksessa käytetään ekspressioplasmidia, joka koodaa soluissa ilmennettävää tumareseptoria, johon ligandi sitoutuu. Ligandin sitoutuminen aktivoi reseptorin, jolloin myös reportterina toimivan proteiinin valmistaminen lisääntyy. Tuotetun reportterin määrä, joka korreloi reseptorin aktivaation määrän kanssa, voidaan mitata esimerkiksi lusiferaasin avulla. (Zang, Li, Tang, Wang ja Yang 2012, 37–38; Allard ja Kopish 2008, 23.)

Reportterigeenimittauksia käytetään uusien lääkeaineiden kehittämisessä ja testaamisessa. Niiden käytöllä pystytään vähentämään koe-eläin käyttöä lääkkeiden kehityksen alkuvaiheessa sekä nopeuttamaan uusien potentiaalisten lääkeaineiden löytymistä. Niiden avulla voidaan tutkia mm. promootorien rakennetta, solun sisäistä viestintää, kantasolujen erilaistumista ja uusia ligandeja. Reportterigeenimittaukset soveltuvat hyvin tumareseptorien tutkimiseen, sillä geenin aktivoituminen on suora seuraus tumareseptorin toiminnasta. Tumareseptorien tutkimisessa käytetään yleisesti lusiferaasiin perustuvia reportterigeenimittauksia, koska menetelmällä on laaja käyttöalue, se on herkkä ja sen vaikutus solun sisäiseen toimintaan on vähäistä. Lusiferaasimenetelmän käyttäminen on myös helppoa sekä edullista. Muita reportterigeenin signaalin tutkimiseen käytettäviä menetelmiä ovat kloramfenikoliasetyylitransferaasi (CAT), vihreä fluoresoiva proteiini (GFP),  $\beta$ -glukuronidaasi (GUS), eritetty alkalinen fosfataasi (SEAP) ja ihmisen kasvuhormoni (hGH). (Paguio, Stecha, Wood ja Fan 2010, 43; Zang ym. 2012, 31; Anttila 2013, 32–34; Allard ja Kopish 2008, 24.)

Yleisesti käytössä on kahdenlaisia reportterimittauksia. Ensimmäisessä tyypissä on mukana kohdegeenistä ylävirtaan sijoitettu vaste-elementti, jonka tiedetään indusoivan kohdegeenin ilmentämistä. Tämä mahdollistaa kokopitkien endogeenisten tai eksogeenisten reseptorien tutkimisen. Kokopitkässä reseptorissa on mukana reseptorin DBD ja LBD. Endogeenisen eli solussa itsessään olevan reseptorin tutkimisen etuna on se, että silloin pystytään tutkimaan reseptorin signaalipolkua sen luonnollisessa biologisessa ympäristössä. Haittapuolina taas voi olla mitattavan signaalin heikkous ja se, että useat reseptorit voivat sitoutua samaan vaste-elementtiin, jolloin tulosten tulkitseminen monimutkaistuu. Toisessa tavassa käytetään vektoria, joka sisältää hiivan GAL4 DBD:hen fuusioituneen tumareseptorin LBD:n. Tällaisen kimeerisen reseptorin etuna on se, että se minimoi endogeenisten reseptoreiden aiheuttaman taustan, ja testattaessa eri reseptoreja rakenteesta täytyy muuttaa vain LBD-osa. (Paguio ym. 2010, 43; Moore ja Kliewer 2000, 5.)

## 6 TYÖN TARKOITUS JA TAVOITTEET

Tämän kvantitatiivisen ja kvalitatiivisen tutkimuksen piirteitä sisältävän opinnäytetyön tarkoituksena oli kloonata koiran CAR ja PXR -tumareseptorien ligandia sitova osa eli LBD. Sen lisäksi samoilla koiran alukkeilla yritettiin monistaa CAR:n ja PXR:n LBD eri lajeista. Kloonaamisen onnistuessa alueet olisi sekvensoitu, jolloin voitaisiin löytää uusia variantteja jo tunnetuille reseptorirakenteille sekä joidenkin lajien kohdalla saada täysin uutta tietoa näiden tumareseptorien rakenteesta. Saatua tietoa ja kloonattuja LBD-alueita olisi voitu käyttää esimerkiksi reseptorien ligandien tutkimiseen, ja tulevaisuudessa niistä olisi voinut olla apua uusien lääkkeiden kehittämisessä ja niiden sivuvaikutusten vähentämisessä, lääkeaineiden yhteisvaikutusten mekanismien selvittämisessä sekä niiden avulla olisi saatu lisätietoa yksilöiden välisistä eroista lääkeainemetaboliassa.

Jos eri lajien CAR:n ja PXR:n LBD-alueiden kloonaus olisi onnistunut, niitä oltaisi hyödynnetty professori Honkakosken tai jonkun hänen ryhmänsä tutkijan tulevissa tutkimuksissa. Tumareseptorien rakenteen selvittäminen antaisi lisätietoa eri lajien välisistä eroista sekä mahdollisesti tumareseptorin toiminnan kannalta tärkeistä aminohapoista. Kloonaamisvaiheen jälkeen työtä jatkettiin reportterigeenimittauksella. Tutkimuksessa testattiin naudan CAR:n ja PXR:n vaikutusta seitsemän erilaisen promoottorialueen aktiivisuuteen ja pyrittiin löytämään naudan CYP-geenin säätelyalueelta kohtia, jotka aktivoituvat CAR:n ja PXR:n vaikutuksesta. Promoottorialue oli kloonattu ja pilkottu pienemmiksi fragmenteiksi Padovan yliopistossa professori Honkakosken yhteistyökumppanien toimesta. Kloonatulla promoottorialueella tiedetään olevan tumareseptorien sitoutumiskohtia, mutta tumareseptorien sitoutuminen ja sen vaikutus aktivaatioon täytyi todistaa kokeellisesti.

Tutkimuksella haluttiin saada lisää tietoa naudan promoottorialueista, sillä nauta on tärkeä lihantuotanto- ja hyötyeläin, jota täytyy lääkittää esimerkiksi tulehduksen tai sairauden takia. Naudoilla käytettävien lääkkeiden vaikutuksista ei kuitenkaan tiedetä paljon, sillä niitä ei ole suunniteltu suoraan nautaa varten. Näin ollen ei tiedetä reagoiko nauta lääkkeisiin samalla tavalla kuin ne lajit, joilla lääkkeitä on testattu tai millainen niiden metabolia on. Myös lääkkeiden riittävästä annostelusta on olemassa tietoa hyvin niukasti. Naudoille annettavilla antibiooteilla ja hormoneilla on todettu olevan vaikutusta ihmisen ja koe-eläinten metabolisoiviin entsyymeihin ja tutkimuksella halutaan selvittää vaikuttavatko ne samalla tavalla myös naudoissa. (Honkakoski 2014-2-3.)

## 7 KOKEELLISEN OSION TOTEUTUS

Työssä käytettävät reagenssit ja laitteet on lueteltu liitteessä 1. Työn toimeksiantaja aikoo tulevaisuudessa tehdä tieteellisiä julkaisuja työn sisältöön liittyvistä asioista, joten promoottorialueiden rakennetta tai CYP-geenin nimeä ei voida ilmoittaa tarkemmin.

### 7.1 Kvantitatiivinen ja kvalitatiivinen tutkimusote

Hirsjärven, Remeksen ja Sajavaaran (2004, 127) mukaan tutkimuksen lähestymistavan määrittely voi olla vaikeaa, sillä kvantitatiivista ja kvalitatiivista tutkimusta on vaikea erottaa toisistaan käytännössä, ja ne ovat toisiaan täydentäviä eivätkä keskenään kilpailevia suuntauksia. Tämä työ sisältää sekä kvalitatiivisen että kvantitatiivisen tutkimuksen piirteitä. Kloonaustyössä lopulliseksi tulokseksi saataisiin sekvenssi tai useampia sekvenssejä CAR:n ja PXR:n LBD-alueista. Myös PCR:n tuloksia arvioidaan visuaalisesti tarkastelemalla agarosigeelillä näkyviä bändejä. Kvantitatiivisia tuloksia saadaan mittaamalla spektrofotometrisesti RNA:n puhtautta. Reportterigeenimittaus taas on tutkimusmenetelmältään selkeämmin kvantitatiivinen, sillä tulokseksi saadaan numeerisia arvoja eli luc- ja ONPG-lukemia, joista varsinaiset tulokset lasketaan. Työssä tehdään myös menetelmän testausta, sillä käytetyistä maksapaloista ei ole aikaisemmin yritetty eristää RNA:ta tai kloonata koiran CAR:n ja PXR:n LBD-alueita. Työssä käytettyjä geenitekniikan perusmenetelmiä on toki käytetty aiemminkin, mutta ei juuri näillä kyseisillä maksapaloilla tai alukkeilla. Reportterigeenimittauksessa käytetyt olosuhteet on testattu ja todettu toimiviksi jo aikaisemmin Anttilan (2013) pro gradu -tutkielmassa, mutta koeasetelma on tässä työssä erilainen. Tässä työssä ei tutkita vierasainesensoreiden aktivaatiota kemikaalialtistuksen seurauksena, vaan CAR:n ja PXR:n vaikutusta promoottorifragmenttien aktivaatioon, joten työssä testataan myös optimoidun reportterigeenimittauksen soveltuvuutta promoottorien tutkimiseen.

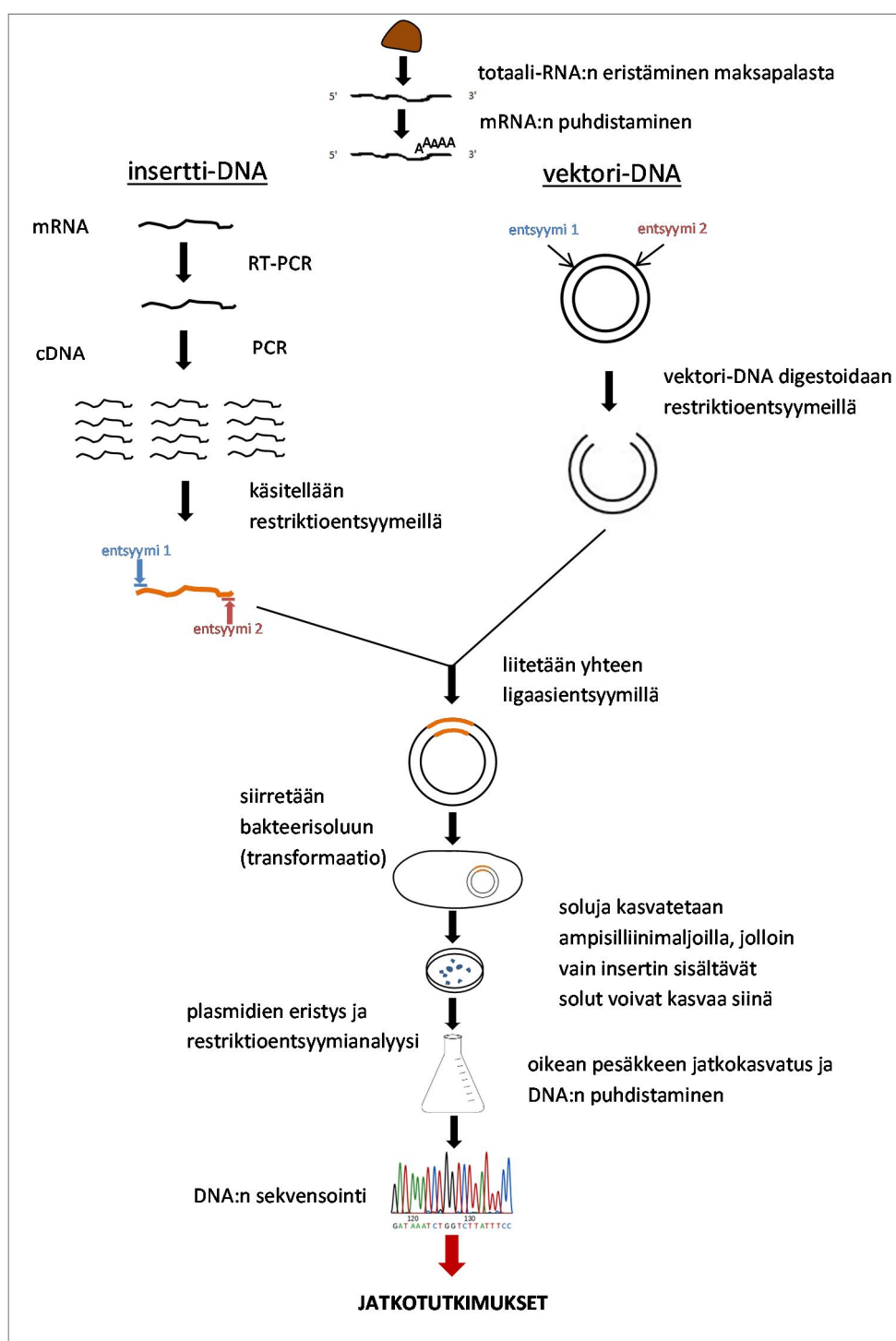
### 7.2 Subkloonaus

Tumareseptorien LBD-alueiden kloonaamisen työvaiheet on esitetty kuviossa 7. Totaali-RNA eristettiin eri eläinlajien maksapaloista käyttäen fenoli-kloroformi- uuttoa ja isopropanoli-saostusta. Eristysmenetelmä saostaa kaikki nukleiinihapot, joten näytteet puhdistettiin eristämisen jälkeen DNA:sta kaupallisella kitillä. Saadun RNA:n määrä ja puhtaus tarkistettiin fotometrisesti. Totaali-RNA:sta puhdistettiin lähetti-RNA:ta oligo(dT)-polystyreenihelmien avulla. Lähetti-RNA:sta valmistettiin komplementaarista DNA:ta (cDNA) käänteistranskriptioentsyymillä kokeillen molempia sekä random hexamer-alukkeita että oligo (dT)18-alukkeita. Tuotettua cDNA:ta käytettiin templaattina PCR:ssä yhdessä LBD-alueiden monistamiseen suunniteltujen alukkeiden kanssa.

Jos agarosielektroforeesigeelillä olisi näkynyt PCR-monistuksen jälkeen lopputuotteita, joiden koko olisi noin 800 emäsparia (dCAR 765 emäsparia) ja noin 900 emäsparia (dPXR 897 emäsparia), niin oikean kokoiset bändit oltaisi leikattu irti geelistä ja puhdistettu geelijäämistä. Reaktiotuotteen oikeus olisi varmistettu restriktioentsyymianalyysin avulla, jonka jälkeen fragmentit ja ekspressiovektorit olisi digestoitu *EcoRI*- ja *BamHI*- restriktioentsyymeillä ja transformoitu joko BL21(DE3)- tai DH5 $\alpha$ -

kannan *E.coli*- soluihin. Solut oltaisi maljattu ampisilliinia sisältäville maljoille, jolloin vain halutun insertin sisältämät solut olisivat muodostaneet pesäkkeitä. Kasvaneista pesäkkeistä olisi valittu sattumanvaraisesti joitakin jatkokasvatukseen ja kasvatettu nestemäisessä mediumissa. Näistä kasvatuksista olisi eristetty DNA, joka olisi lähetetty sekvensoitavaksi.

Subkloonaaminen koostuu monesta eri vaiheesta, joista vain osa saatiin tehtyä. LBD-alueita ei onnistuttu monistamaan PCR:llä, vaikka olosuhteita yritettiin optimoida. Työtä jatkettiin siirtymällä seuraavaan vaiheeseen, jonka kaltaiseen myös kloonauksen onnistuessa tätä konstruktiota olisi käytetty. Reportterigeenimäärityksessä käytettiin erilaista konstruktiota eli naudan CAR:a ja PXR:ää, mutta käytännön vaiheiden toteutus olisi ollut muuten samanlainen.



KUVIO 7. LBD-alueiden kloonauksen työvaiheet



### 7.2.1 Alukkeiden suunnittelu

Työskentely alkoi koiran CAR LBD:n ja PXR LBD:n monistavien alukkeiden suunnittelulla. Käytössä olisi ollut esimerkiksi ihmisen, sian ja naudan kyseisiä alueita monistavia alukkeita, mutta lajikohtaisten sekvenssierojen vuoksi niiden toimiminen koiralla olisi ollut epätodennäköistä ja kloonausta varten suunniteltiin uudet alukkeet. Alukkeisiin haluttiin kloonausta varten leikkauskohdat *EcoRI*- ja *BamHI*-restriktioentsyymeille.

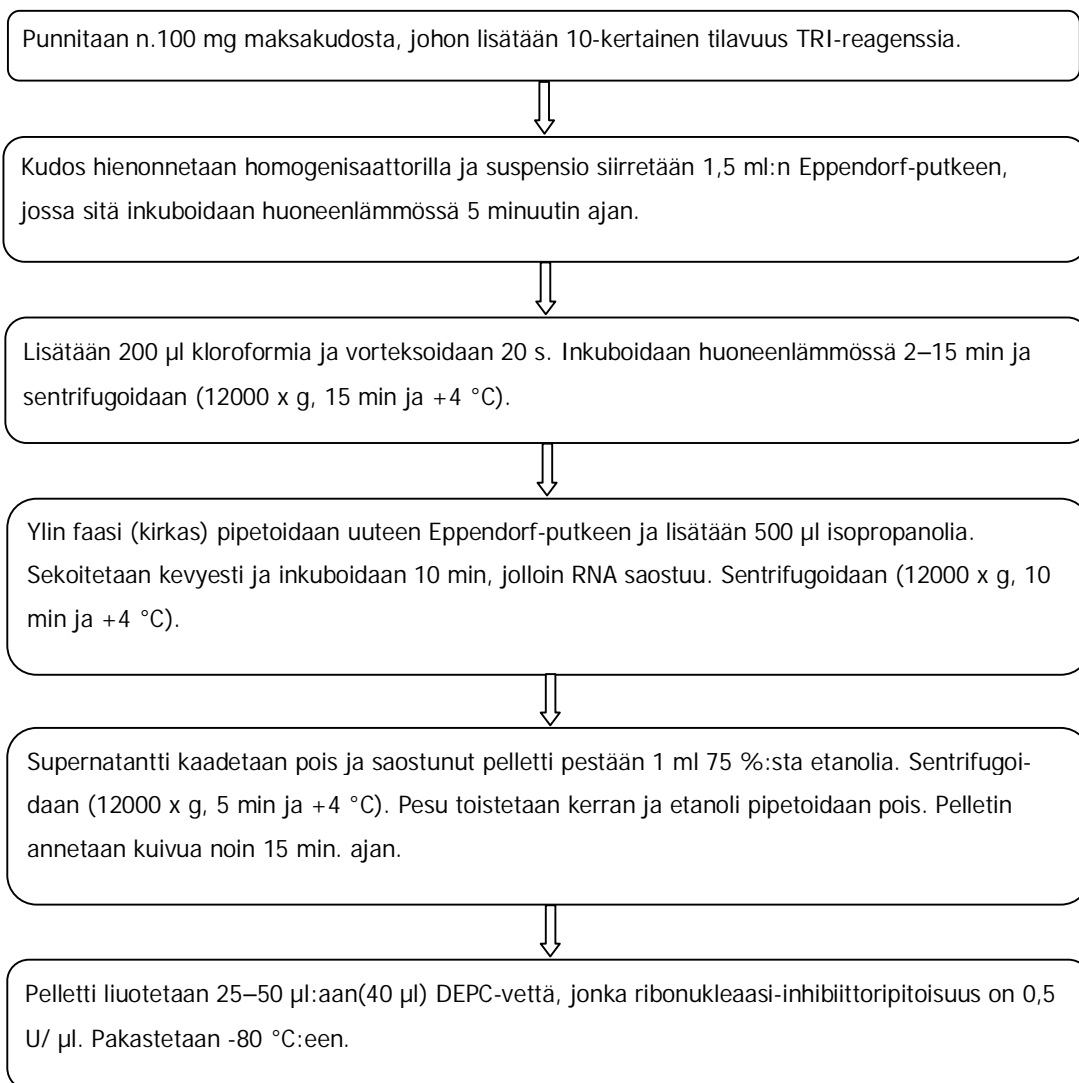
Suunnittelu pohjautui koiran CAR:n ja PXR:n eri varianttien LBD-sekvenssien keskinäiselle vertailulle. Koiran CAR:n ja PXR:n nukleotidisekvenssit haettiin NCBI:n nukleotidihausta ja niitä verrattiin toisiinsa tietokoneohjelman avulla. Rinnakkaisista sekvensseistä etsittiin kohdat, joissa oli vähän varianttien välistä vaihtelua ja joihin saataisiin leikkauskohdat käytettävälle restraikioentsyymeille. CAR:n alukkeet suunniteltiin monistamaan varianttia 4 (PubMed XP\_545770.3) ja PXR:n alukkeet suunniteltiin koiran oletetun rakenteen (PubMed XM\_535750.3) mukaisesti. Sekvenssit on esitelty liitteessä 2. Monistettavaksi alueeksi jätettiin vain LBD-aluetta koodaava osa (dCAR L105, dPXR L530). Alukkeiden suunnittelussa huomioitiin se, että alukeparien sulamislämpötilat eivät saisi erota toisistaan yli 2 °C:ta, ne eivät muodostaisi hiuspinnirakenteita keskenään ja olisivat riittävän pitkiä ollakseen spesifisiä halutulle monistustuotteelle. Kuitenkin PXR:n alukeparin suunnittelussa ylitettiin suositeltu 2 °C:n ero alukkeiden sulamislämpötiloissa, ja niiden välinen ero oli 4.2 °C:ta (s. 31)

TAULUKKO 1. LBD-alueiden monistuksessa käytetyt alukkeet

|          |    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |
|----------|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|--|
| dCAR LBD | 5' |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   | -3' |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |
| aluke 1: | A  | T | T | G | A | A | T | T | C | C | T | G | C | A | G | C | T | G | A   | G | C | A | G | G | A | G | C | A | G |   |  |
| aluke 2: | A  | T | T | G | G | A | T | T | C | T | C | A | G | C | T | G | C | A | G   | A | T | C | T | C | C | T | G | G | A | G |  |
| dPXR LBD |    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |
| aluke 3: | A  | T | T | G | A | A | T | T | C | C | T | G | A | G | T | G | A | G | G   | A | G | C | A | G | C | A | G | A | C | G |  |
| aluke 4: | A  | T | T | G | G | A | T | T | C | T | C | A | G | C | C | G | T | C | C   | G | T | G | A | T | G | C | T | G |   |   |  |

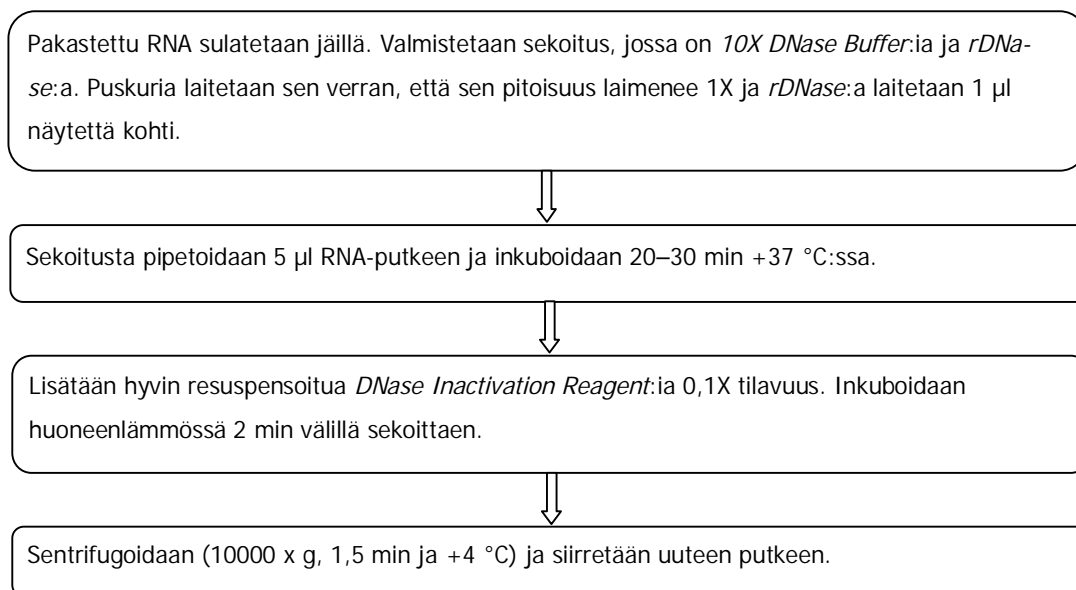
## 7.2.2 RNA:n eristäminen ja puhdistaminen

Totaali-RNA eristettiin -80 °C:een säilytyistä eläinten maksapaloista fenoli-kloroformi-uutolla ja isopropanoli-saostusta käyttäen. Puhdistusprosessi on kuvattu Kuviossa 8.



KUVIO 8. RNA:n eristäminen TRI-reagent:illa

Käytetty eristysmenetelmä saostaa kaikki nukleiinihapot, joten näytteet puhdistettiin DNA:sta DNA-free™ -kitillä valmistajan ohjeen mukaisesti (Kuvio 9).



KUVIO 9. RNA-näytteiden puhdistaminen DNA:sta

### 7.2.3 RT-PCR

RNA-näytteistä (n=73, Liite 3) valittiin puhtaimmat näytteet (n=16, Liite 3), joista valmistettiin komplementaarista DNA:ta (cDNA) käänteistranskriptioentsyymien sekä random hexamer-alkukkeiden ja oligo (dT)<sub>18</sub>-alkukkeiden avulla. Tuotettua cDNA:ta käytettiin templaattina PCR:ssä. Taulukossa 2 näkyy reaktion toteutus ja pipetoitavat määrät.

TAULUKKO 2. Pipetoinnit cDNA:n valmistamiseksi

|                 |                       | 1X     | 10X   | 15X     |
|-----------------|-----------------------|--------|-------|---------|
| Valmista Mix 1: | aluke (0.2 µg/µl)     | 1 µl   | 10 µl | 15 µl   |
|                 | DEPC-H <sub>2</sub> O | 6.5 µl | 65 µl | 97.5 µl |

→ 7.5 µl/putki

|                 |                                    |        |       |        |
|-----------------|------------------------------------|--------|-------|--------|
| Valmista Mix 2: | 5X reaction buffer                 | 4 µl   | 40 µl | 60 µl  |
|                 | RiboLock RNase inhibitor (40 U/µl) | 0.5 µl | 5 µl  | 7.5 µl |
|                 | dNTP Mix (10 mM jokaista)          | 2 µl   | 20 µl | 30 µl  |
|                 | RevertAid reverse transcriptase    | 1 µl   | 10 µl | 15 µl  |

→ 7.5 µl/putki

Pipetoi RNA (0,2µg, esim. 5 µl 0.4 µg/µl), Mix 1 ja Mix 2 samaan putkeen, sekoita kevyesti ja sentrifugoi nopeasti.

Inkuboi 10 min huoneenlämmössä ja aja PCR-ohjelmalla, jonka lämpötilat ja ajat ovat: 60 min 45 °C, 10 min 70 °C ja ∞ 4 °C. Pakasta -80 °C:een.

cDNA:ta valmistettiin hylkeestä, hevosesta, lampaasta, karhusta, hirvestä ja koirasta. Kun kloonauksen ei vaikuttanut onnistuvan, kokeiltiin reaktiossa oligo (dT)18-alukkeiden käyttämistä, koska ne ovat random hexamer-alukkeita spesifisempiä lähetti-RNA:lle (Life Technologies 2014.)

#### 7.2.4 PCR

Valmistetusta cDNA:sta yritettiin monistaa CAR:n ja PXR:n LBD-alueita PCR:n avulla. Ensimmäisellä yrityksellä alueiden monistuksessa käytettiin kahta eri polymeraasia, CAR:lla Taq-polymeraasia (Taulukko 4) ja PXR:llä Phusion-polymeraasia (Taulukko 5), joilla oli aikaisemmin onnistuttu monistamaan koiran CAR- ja apinan PXR-tumareseptorien LBD-alueita. (Tauriainen 2006, 59). Käytetyt PCR-ohjelmat ja reaktioon tarvittavien komponenttien määrät suunniteltiin polymeraasien valmistajien perusprotokollien mukaisiksi.

TAULUKKO 3. 1. yrityksen pipetoinnit ja PCR-ohjelma (CAR)

##### CAR(Taq)

|                           | $\mu\text{l}$ |
|---------------------------|---------------|
| 10X Taq buffer            | 5             |
| dNTP(0.2mM)               | 5             |
| aluke1(50 $\mu\text{M}$ ) | 0,5           |
| aluke2(50 $\mu\text{M}$ ) | 0,5           |
| MgCl(25mM)                | 1             |
| DNA(~1 $\mu\text{g}$ )    | 1             |
| Taq polymeraasi           | 0,25          |
| vesi                      | 36,75         |
| yht.                      | 50            |

pipetoi 48,75  $\mu\text{l}$  MM:ä,  
1  $\mu\text{l}$  DNA:ta ja 0,25  $\mu\text{l}$  polymeraasia

| PCR-ohjelma        |        |     |
|--------------------|--------|-----|
| $^{\circ}\text{C}$ | aika   |     |
| 95                 | 2 min  | 45X |
| 95                 | 25 s   |     |
| 55                 | 25 s   |     |
| 72                 | 2 min  |     |
| 72                 | 10 min |     |

TAULUKKO 4. 1. yrityksen pipetoinnit ja PCR-ohjelma (PXR)

##### PXR(Phusion)

|                           | $\mu\text{l}$ |
|---------------------------|---------------|
| vesi                      | 35,0          |
| 5X Phusion bufferHF       | 10,0          |
| dNTP(10mM)                | 1,0           |
| aluke3(50 $\mu\text{M}$ ) | 0,5           |
| aluke4(50 $\mu\text{M}$ ) | 0,5           |
| DNA(~1 $\mu\text{g}$ )    | 1,0           |
| DMSO*                     | 1,5           |
| Phusion polymerase        | 0,5           |
| yht.                      | 50,0          |

pipetoi 48,5  $\mu\text{l}$  MM:ä,  
1  $\mu\text{l}$  DNA:ta ja 0,5  $\mu\text{l}$  polymeraasia

| PCR-ohjelma        |       |     |
|--------------------|-------|-----|
| $^{\circ}\text{C}$ | aika  |     |
| 98                 | 30 s  | 35X |
| 98                 | 10 s  |     |
| 60                 | 15 s  |     |
| 72                 | 31 s  |     |
| 72                 | 5 min |     |

Annealing-lämpötilat laskettiin internetistä saatavalla laskurilla (Thermo Scientific) käyttäen alukepitoisuutena 50  $\mu\text{M}$ . Reaktioiden suolapitoisuus oli erilainen, sillä Dream Taq:in puskuriliuoksen  $\text{MgCl}_2$ -pitoisuus on 20 mM, jolloin lopulliseksi pitoisuudeksi tuli 2 mM (Thermo Scientific 2012a). Phusion High Fidelityn lopullinen  $\text{MgCl}_2$ -pitoisuus reaktioseoksessa oli 1,5 mM (Thermo Scientific 2012b). Laskurin mukaan CAR:n laskennalliset  $T_m$ -lämpötilat olisivat 59,6  $^{\circ}\text{C}$  (aluke 1) ja 59,5  $^{\circ}\text{C}$  (aluke 2).

PXR:n alukkeiden vastaavat lämpötilat olisivat 56,5 °C (aluke 3) ja 60,7 °C (aluke 4). DreamTaq:n valmistaja suosittelee vähentämään laskennallisesta  $T_m$ -arvosta 5 °C:sta ja Phusion High Fidelity:ä käytettäessä suositellaan lisäämään 3 °C:sta sen alukkeen  $T_m$ -arvoon, jonka  $T_m$  on matalampi. Näin ollen CAR:n optimaalinen annealing-lämpötila olisi 54,6 °C ja PXR:n 59,5 °C.

Kun haluttua tuotetta ei saatu monistettua käyttämällä laskennallisesti sopivaa  $T_m$ -lämpötilaa, yritettiin sopivaa annealing-lämpötilaa etsiä käyttämällä gradienttiohjelmaa ja samalla optimoitiin myös  $MgCl_2$ -pitoisuutta (taulukko 5 ja 6). Pipetoinnit ja ohjelmat olivat muuten samat, mutta annealing-lämpötilat olivat 46 °C–67 °C:ta.

| CAR(Taq)                 | 2,0 mM |        | 2,5 mM |       | 3 mM  |       | 3,5 mM |       |
|--------------------------|--------|--------|--------|-------|-------|-------|--------|-------|
|                          |        |        |        |       |       |       |        |       |
| 10X Taq buffer           | 5      | 45     | 5      | 45    | 5     | 45    | 5      | 45    |
| dNTP(0.2mM)              | 5      | 45     | 5      | 45    | 5     | 45    | 5      | 45    |
| aluke1(50µM)             | 0,5    | 4,5    | 0,5    | 4,5   | 0,5   | 4,5   | 0,5    | 4,5   |
| aluke2(50µM)             | 0,5    | 4,5    | 0,5    | 4,5   | 0,5   | 4,5   | 0,5    | 4,5   |
| MgCl <sub>2</sub> (25mM) | 0      | 0      | 1      | 9     | 2     | 18    | 3      | 27    |
| DNA(~1µg)                | 1      | ---    | 1      | ---   | 1     | ---   | 1,0    | ---   |
| Taq polymeraasi          | 0,25   | ---    | 0,25   | ---   | 0,25  | ---   | 0,25   | ---   |
| vesi                     | 37,75  | 339,8  | 36,75  | 330,8 | 35,75 | 321,8 | 34,75  | 312,8 |
| yht.                     | 50     | 438,75 | 50     |       | 50    |       | 50     |       |

pipetoi 47,75 µl MM:ä, 1 µl DNA:ta ja 0,25 µl polym.

| PCR-ohjelma |        | 45X |
|-------------|--------|-----|
| °C          | aika   |     |
| 94          | 2 min  |     |
| 94          | 25 s   |     |
| 46-67       | 25 s   |     |
| 72          | 2 min  |     |
| 72          | 10 min |     |

TAULUKKO 5. Annealing-lämpötilan ja suolapitoisuuden optimointi (CAR)

| PXR(Phusion)             | 1,5 mM |       | 2 mM |      | 2,5 mM |      | 3 mM |      |
|--------------------------|--------|-------|------|------|--------|------|------|------|
|                          |        |       |      |      |        |      |      |      |
| vesi                     | 35     | 315   | 34   | 306  | 33     | 297  | 32   | 288  |
| 5X Phusion bufferHF      | 10     | 90    | 10   | 90   | 10     | 90   | 10   | 90   |
| dNTP(10mM)               | 1      | 9,0   | 1    | 9    | 1      | 9    | 1    | 9    |
| aluke3(50µM)             | 0,5    | 5     | 0,5  | 4,5  | 0,5    | 4,5  | 0,5  | 4,5  |
| aluke4(50µM)             | 0,5    | 4,5   | 0,5  | 4,5  | 0,5    | 4,5  | 0,5  | 4,5  |
| DNA(~1µg)                | 1      | ---   | 1    | ---  | 1      | ---  | 1    | ---  |
| MgCl <sub>2</sub> (25mM) | ---    | ---   | 1    | 9    | 2      | 18   | 3    | 27   |
| DMSO*                    | 1,5    | 13,5  | 1,5  | 13,5 | 1,5    | 13,5 | 1,5  | 13,5 |
| Phusion polymerase       | 0,5    | ---   | 0,5  | ---  | 0,5    | ---  | 0,5  | ---  |
| yht.                     | 50     | 436,5 | 50   |      | 50     |      | 50   |      |

48,5 µl MM:ä, 1 µl DNA:ta ja 0,5 µl polymeraasia

| PCR-ohjelma |       | 35X |
|-------------|-------|-----|
| °C          | aika  |     |
| 98          | 30 s  |     |
| 98          | 10 s  |     |
| 46-67       | 15 s  |     |
| 72          | 35 s  |     |
| 72          | 5 min |     |

TAULUKKO 6. Annealing-lämpötilan ja suolapitoisuuden optimointi (PXR)

Geeleillä ei näkynyt optimoinnin jälkeenkään halutun kokoisia tuotteita. Molemmilla tumareseptoreilla päädyttiin käyttämään vain Phusion High Fidelity-polymeraasia, koska silloin molemmille voitiin käyttää samaa PCR-ohjelmaa ja -laitetta, jolloin käytännön työskentely helpottui. Myös eri DNA-määriä testattiin sekä oligo(dt)-alukkeiden käyttämistä RT-PCR:ssä (taulukko 7).

| 10 ng(oligo(dt)-alukkeet) |      | 50 ng(random hexamer- ja oligo(dt)-alukkeet) |      | 100 ng(random hexamer- ja oligo(dt)-alukkeet) |      | 250 ng(random hexamer- ja oligo(dt)-alukkeet) |      |
|---------------------------|------|--|------|---|------|---|------|
|                           | µl   |  | µl   |   | µl   |   | µl   |
| vesi                      | 35,0 | vesi   | 31,0 | vesi  | 35,0 | vesi  | 35,0 |
| 5X Phusion bufferHF       | 10,0 | 5X Phusion bufferHF                          | 10,0 | 5X Phusion bufferHF                           | 10,0 | 5X Phusion bufferHF                           | 10,0 |
| dNTP(10mM)                | 1,0  | dNTP(10mM)                                   | 1,0  | dNTP(10mM)                                    | 1,0  | dNTP(10mM)                                    | 1,0  |
| aluke1/3(50µM)            | 0,5  | aluke1/3(50µM)                               | 0,5  | aluke1/3(50µM)                                | 0,5  | aluke1/3(50µM)                                | 0,5  |
| aluke2/4(50µM)            | 0,5  | aluke2/4(50µM)                               | 0,5  | aluke2/4(50µM)                                | 0,5  | aluke2/4(50µM)                                | 0,5  |
| DNA(10ng/µl)              | 1,0  | DNA(10ng/µl)                                 | 5,0  | DNA(100ng/µl)                                 | 1,0  | DNA(250ng/µl)                                 | 1,0  |
| DMSO*                     | 1,5  | DMSO*  | 1,5  | DMSO*   | 1,5  | DMSO*   | 1,5  |
| Phusion polymerase        | 0,5  | Phusion polymerase                           | 0,5  | Phusion polymerase                            | 0,5  | Phusion polymerase                            | 0,5  |
| yht.                      | 50,0 | yht.   | 50,0 | yht.  | 50,0 | yht.  | 50,0 |

TAULUKKO 7. Eri DNA-määrien ja oligo(dt)-alukkeiden testaaminen

### 7.2.5 PCR-tuotteiden erottelu agarosigeelielektroforeesilla

Agarosigeelielektroforeesissa käytettiin 1 %:sta geeliä sekä 1X-TAE-puskuria. Geelille pipetoitiin näytteisiin ja molekyyli-markkereihin oli lisätty SYBR Green:iä, joten geelejä voitiin tarkastella UV-valossa. Ohje geelien valmistamisesta ja niiden ajamisesta on liitteessä 4. Haluttuja alueita ei saatu monistettua optimoinnista huolimatta, joten työssä siirryttiin seuraavaan vaiheeseen eli käänteis-transfektiolevyjen valmistukseen ja reportterigeenimääritykseen.

### 7.3 Käänteistransfektiolevyjen valmistus

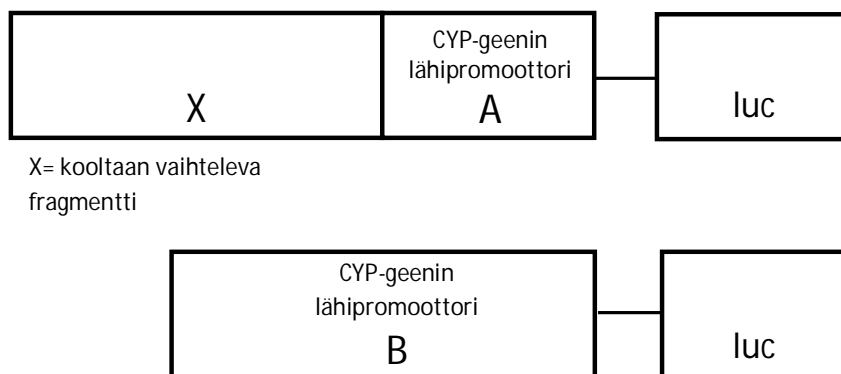
Käänteistransfektio määritys perustuu DNA/PEI-25-kompleksin muodostamiseen ja sen kylmäkuivaukseen. Levyt valmistettiin Anttilan (2013) optimoimalla tavalla, ja tarkempi valmistusohje löytyy Liitteestä 5. Plasmidit sulatettiin ja laimennettiin. DNA/PEI-kompleksit muodostettiin lisäämällä DNA:ta PEI:n joukkoon tippa kerrallaan samalla vorteksoiden. Kompleksien annettiin muodostua 20 minuuttia huoneenlämmössä ja liuokseen lisättiin 2 % sakkaroosia 1:1, jolloin lopulliseksi pitoisuudeksi saatiin 1 %. Liuosta pipetoitiin 100 µl/kuoppa 48-kuoppalevyille. Levyt jäädettiin välittömästi kuivajälillä ja vietiin kylmäkuivaimeen vuorokaudeksi. Levyt säilytettiin valolta suojattuina eksikaattorissa niiden käyttöön asti.

### 7.4 Reportterigeenimittaus

Tutkimuksessa yhteistyökumppanina toimivalla Padovan yliopistolla on tutkittu sytokromi 3A-perhettä, joka on tärkein lääkeaineita metaboloiva geeniryhmä eläimillä ja erityisesti ihmisillä. He haluaisivat saada lisää tietoa erään CYP-geenin säätelystä. CYP-geenin lähetti-RNA:n määrän tiedetään lisääntyvän muun muassa fenobarbitaali- ja deksametasonialtistuksen seurauksesta. Tumareseptorit aktivoituvat lääkeaineilla, kuten fenobarbitaalilla ja deksametasonilla, ja metaboloivien CYP-geenien ilmentäminen lisääntyy kiihdyttäen lääkeaineiden metaboliaa. (Honkakoski 2014-2-3.) Tutkimuksella halutaan selvittää osallistuvatko naudan CAR ja PXR edellä mainitulla tavalla lääkeaineiden säätelyyn.

Padovan yliopistolla on kloonattu CYP-geenin promoottorialue, jossa sijaitsee geenin säätelyelementtejä. Säätelyalueelta on etsitty bioinformatiikka-analyyysillä alueita, joilla sijaitsee sekvenssi "AGGT-CA", johon tumareseptorien DBD-alueet sitoutuvat. Tumareseptorin sitoutuminen säätelyalueelle aktivoi promoottorin lisäten lähetti-RNA:n valmistamista. CAR ja PXR sitoutuvat dimeereinä yhdessä RXR:n kanssa DNA:han ja niihin tarttuu lisäksi koaktivaattoreita. Ligandin sitoutuminen tumareseptoriin saa aikaan sen kiinnittymisen säätelyelementtiin, mutta CAR:lla sitoutumiseen ei vaadita ligandin läsnä oloa, koska se on konstitutiivisesti aktiivinen.

Promoottorialuetta on pilkottu sellaisiksi pieniksi fragmenteiksi, jotka sisältävät paljon tumareseptorien sitoutumisalueita. Fragmentteihin on jätetty CYP-geenin lähipromoottori sekä liitetty sen säätelyalueen tilalle lusiferaasia koodaava alue (luc). Mukana oli kaksi erilaista lähipromoottoria: A ja B. A-lähipromoottori oli kooltaan 0.3 kbp ja B 1.2 kbp. B-lähipromoottorialuetta testattiin sellaisenaan ja A:han liitettiin erikokoisia fragmentteja (Kuvio 10). Reportterigeenimittaus toteutettiin yhdessä erikolaboratoriomestari Lea Pirskasen kanssa.



KUVIO 10. Käytettyjen säätelyalueiden perusrakenne

Ennen mittausta solut jaettiin sopivaan solutiheyteen ja transfektoitiin kylmäkuivatuille käänteis-transfektiolevyille. Tässä tutkimuksessa ei tutkittu kemikaalien vaikutusta, vaan solut altistettiin joko liuottimelle eli DMSO:lle tai PXR:n ligandille SR12813 (10  $\mu$ M) ja inkuboitiin vuorokausi. Sen jälkeen solut hajotettiin, pakastettiin ja levyjen luc- sekä ONPG-arvot mitattiin. Mittausprosessi on esitetty tarkemmin liitteessä 5.

Työssä käytettiin sisäisenä kontrollina  $\beta$ -galaktosidaasi-aktiivisuuden mittaamista. Käytetyt plasmidit sisältävät *E. coli*-bakteerin *lacZ*-geenin, joka koodaa  $\beta$ -galaktosidaasia. Kun hajotettujen solujen joukkoon lisätään ONPG:tä sisältävä liuos (Liite 6), alkaa solujen tuottama  $\beta$ -galaktosidaasi hajottaa ONPG:tä keltaisen väriseksi ONP:ksi. Keltaisen värin voimakkuus mitataan absorbanssin avulla. Absorbanssin suuruus kertoo transfektion tehokkuudesta, ja siinä olevat levy- ja kuoppakohtaiset erot saadaan normalisoitua sen avulla.

## 8 TULOKSET

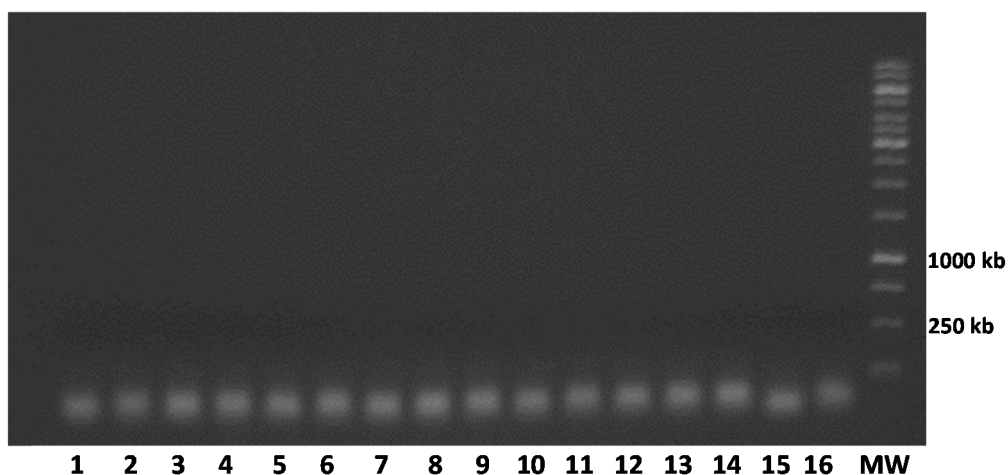
Tuloksissa esitellään osa kloonamistyössä valmistetuista geeleistä, kuvaajat reportterigeenimittauksista sekä niiden tulokset kokoava taulukko.

### 8.1 Kloonaminen

Tein yhteensä 73 RNA:n eristystä käytössä olevista eri eläinten maksanäytteistä (Liite 3). Yritin eristää RNA:ta kaikista näytteistä kerran ja yhteensä seitsemällä eri kerralla. Ensimmäisellä kerralla sain RNA:ta itämerennorpasta, lampaasta, hirvestä ja koirasta. Kolmannella kerralla sain hevosesta, karhusta ja toisesta koiranäytteestä riittävän puhdasta RNA:ta.

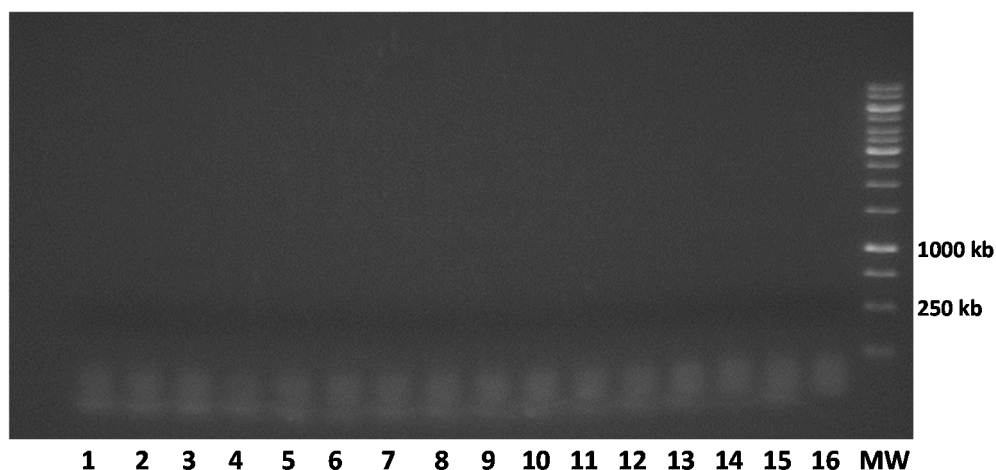
Kuudestatoista RNA:sta valmistettiin cDNA:ta ja niistä yritettiin monistaa suunnitelluilla alukkeilla tumareseptoreiden LBD-alueita PCR:n avulla. Monistumisen onnistumista testattiin kaikista lajeista käyttäen kahta eri polymeerasientsyymiä. Pipetoitavat määrät sekä PCR-ajon olosuhteet pohjautuivat polymeerasien valmistajien suosituksiin.

#### **CAR 16.9.2013**



KUVIO 11. 1.PCR-ajo (CAR)

#### **PXR 16.9.2013**

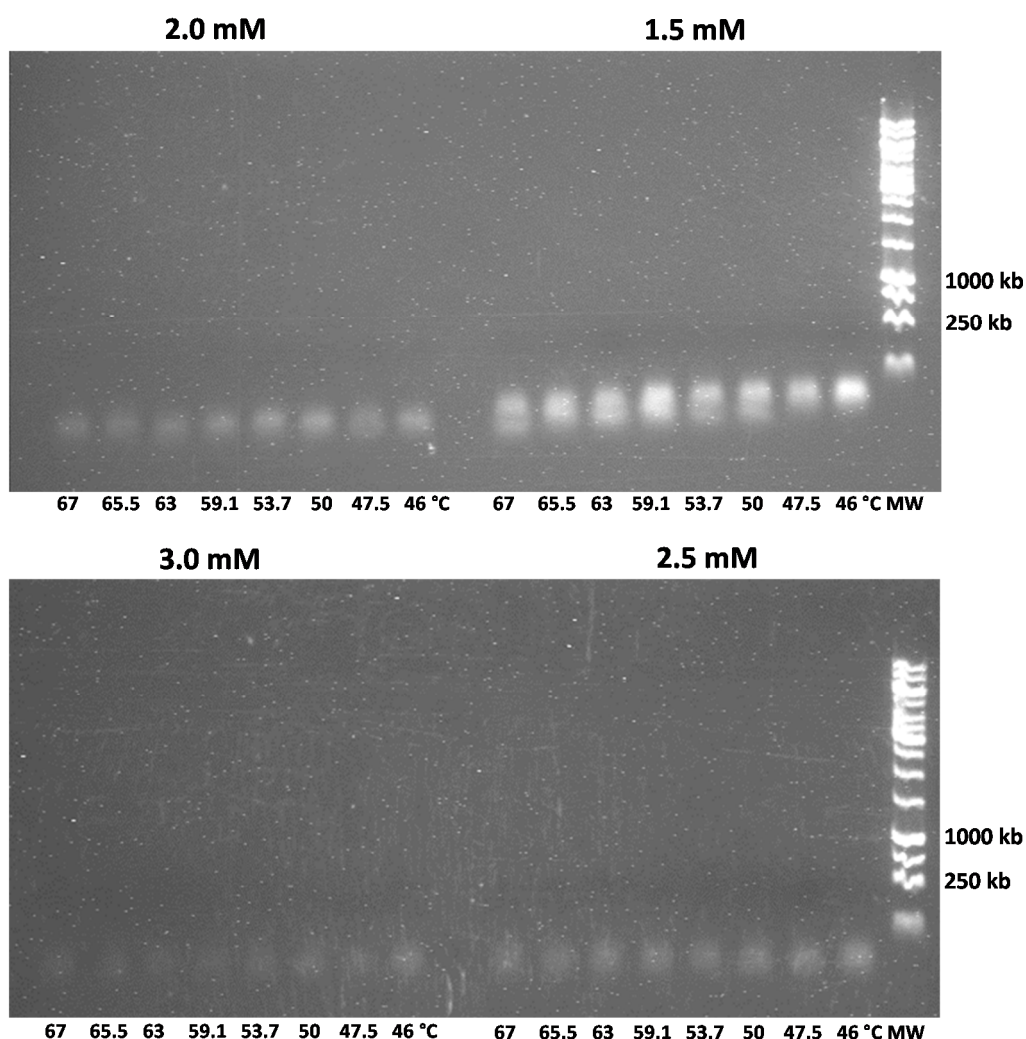


KUVIO 12. 1.PCR-ajo (PXR)



Kuvioista 11 ja 12 nähdään, ettei ensimmäisellä PCR-ajolla monistunut haluttua tuotetta, joten reaktio-olosuhteita täytyi optimoida. Geelillä näkyvät kooltaan pienet bändit ovat joko alukkeita tai alukedimeerejä. Oletuksena oli ollut, että reaktiossa saataisiin monistettua koiran näytteitä sekä mahdollisesti myös muita lajeja, mutta koska koirankaan monistaminen ei onnistunut, tein eri koiranäytteiden DNA:sta sekoituksen. Käytin tätä sekoitusta myöhemmissä yrityksissä ja keskityin vain koiran LBD-alueiden monistamiseen. Testasin sopivaa annealing-lämpötilaa (46 °C–67 °C) gradienttiohjelmalla käyttäen sekä testasin eri MgCl<sub>2</sub>-pitoisuuksia (1,5–3,0 mM). Geelillä näkyi vain alle 100 emäsparin kokoisia tuotteita eli todennäköisesti alukkeet olivat kiinnittyneet toisiinsa ja polymeraasi monisti niitä muodostaen alukedimeerejä (Kuvio 13). Optimointi tehtiin myös PXR:lle samoissa olosuhteissa, ja sen tulokset olivat samanlaiset kuin CAR:lla eli haluttua tuotetta ei saatu monistettua.

### CAR 21.9.2013



KUVIO 13. CAR:n annealing-lämpötilan ja MgCl<sub>2</sub>-pitoisuuden optimointi

Ongelma pyrittiin poistamaan sillä, että näytteet laitettiin denaturointilämpötilaan esikuumennettuun PCR-laitteeseen, jolloin alukkeiden epäspesifisen kiinnittymisen olisi pitänyt vähentyä. Alukedimeerit eivät poistuneet PCR-laitteen esikuumennuksella eikä halutun kokoista tuotetta näkynyt. Tämän jälkeen testattiin oligo (dT)18-alukkeiden käyttöä RT-PCR:ssä, mutta se ei auttanut. Myös DNA:n määrän (normaalisti 10ng/reaktio) lisäämistä 50, 100 tai 250 ng:aan/reaktio testattiin.

## 8.2 Reportterigeenimittaus

Promoottorifragmenttien tarkkaa rakennetta ei voitu esittää, sillä tutkimuksen tuloksia ei ole vielä julkaistu ja ne ovat tällä hetkellä salaisia. Fragmentit koodattiin nimillä REP1 jne. tulosten kirjoittamisen ja tulkinnan helpottamiseksi. PBREM ja XREM toimivat positiivisina kontrolleina, ja ne lisäävät molempien, CAR:n ja PXR:n, aktiivisuutta. PBREM lisää erityisesti CAR:n aktiivisuutta ja XREM PXR:n aktiivisuutta (Pelkonen ym. 2008, 685). Jotta PXR:n kiinnittymistä säätelyalueelle voitaisiin tutkia, niin se täytyy aktivoida ensin ligandilla. Ligandina oli tässä kokeessa SR12813, jonka on vielä julkaisemattomissa tutkimuksissa todettu aktivoivan naudan PXR:ää. CAR omaa perusaktiivisuuden ilman ligandia, joten sitä ei tarvinnut lisätä.

TAULUKKO 8. Kokeissa käytetyt promoottorialueet

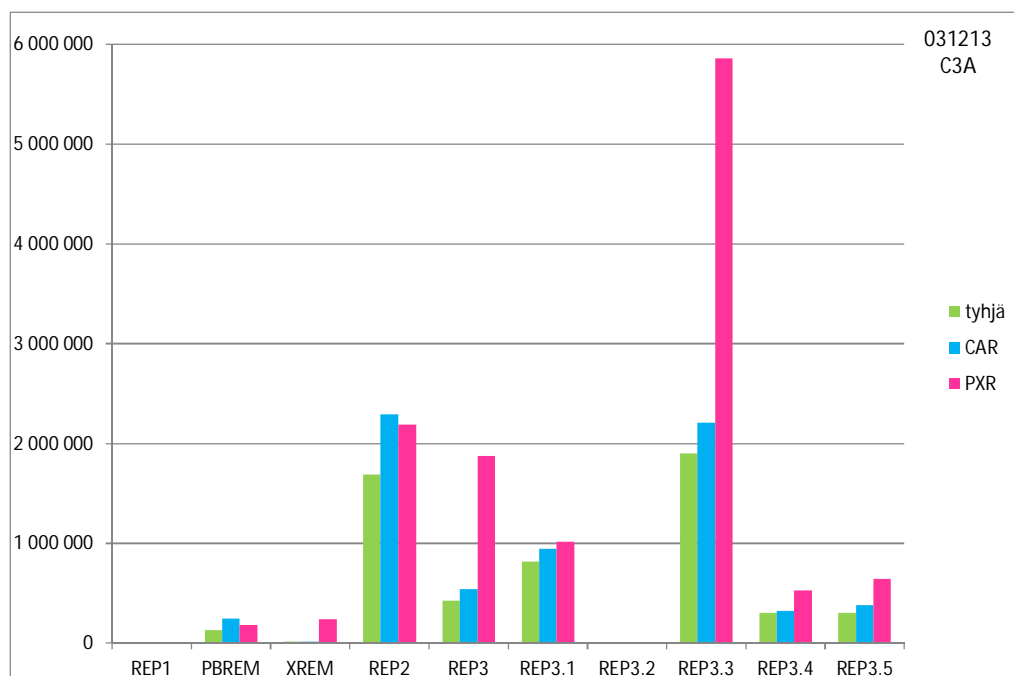
|        |                                     |
|--------|-------------------------------------|
| REP1   | 0-promoottori                       |
| PBREM  | tr.aktiivisuus↑<br>erit. CAR        |
| XREM   | tr.aktiivisuus↑<br>erit. PXR        |
| REP2   | B-lähipromoottori                   |
| REP3   | A-lähipromoottori                   |
| REP3.1 | A-lähipromoottori<br>+ fragmentti 1 |
| REP3.2 | A-lähipromoottori<br>+ fragmentti 2 |
| REP3.4 | A-lähipromoottori<br>+ fragmentti 3 |
| REP3.4 | A-lähipromoottori<br>+ fragmentti 4 |
| REP3.5 | A-lähipromoottori<br>+ fragmentti 5 |

## Tulosten laskeminen

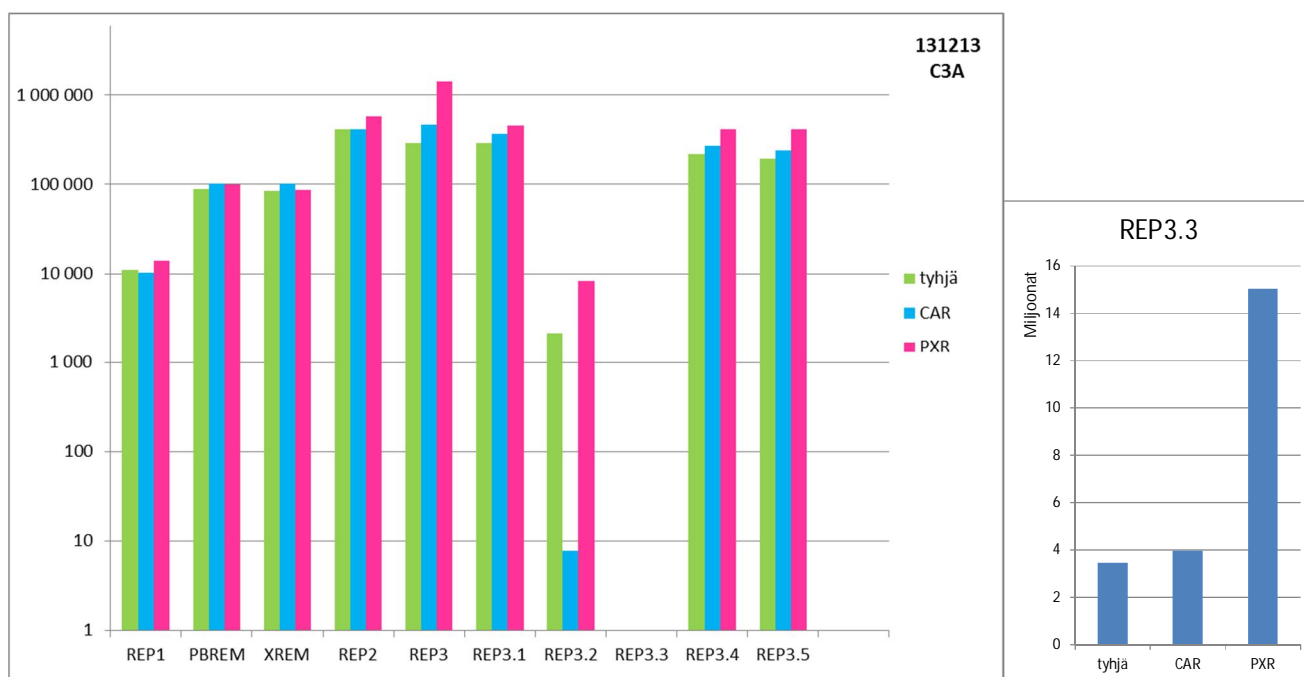
Kemikaalialtistuskokeissa käytetään yleensä aktivaatiokerrointa tulosten keskinäisessä vertailussa. Tällöin aktivaatiokerroin lasketaan vertaamalla kemikaalin aktiivisuuden keskiarvoa käytetyn liuottimen aktiivisuuden keskiarvoon, jolloin tuloksista saadaan vähennettyä taustan ja liuottimen vaikutus tuloksiin. Aktivaatiokertoimen avulla saatuja tuloksia voidaan vertailla muihin kemikaaleihin sekä kirjallisuudesta löytyviin arvoihin. (Anttila 2013, 43.) Tämän työn tulosten laskemisessa sovelletaan aktivaatiokertoimen ideaa siltä osin, että mittaustuloksista vähennetään taustan eli 0-tulosten arvot mittaustuloksista ja saatuja normalisoituja luc-keskiarvoja vertaillaan keskenään. 0-kuopissa on vain liuottimena käytettyä 0,1 % DMSO:ta. Tulokset laskettiin näytekohteisesti seuraavalla tavalla:

- 1) 0-kuoppien luc-tuloksista laskettiin keskiarvo, joka vähennettiin kaikista mitatuista luc-arvoista
- 2) 0-kuoppien onpg-tuloksista laskettiin keskiarvo, joka vähennettiin kaikista mitatuista onpg-arvoista
- 3) luc-tulokset kerrottiin 3000:lla ja onpg-tuloksille tehtiin seuraava laskutoimitus: 
$$\frac{1000 \cdot 50}{\text{inkubaatioaika (min)}}$$
- 4) luc-tulokset kerrottiin onpg-arvoilla
- 5) rinnakkaisille luc-arvoille laskettiin keskiarvo

Keskiarvojen laskemisen yhteydessä tuloksia editoitiin jättämällä negatiiviset sekä selvästi rinnakkaissa mittauksissa muista tuloksista eroavat arvot pois. Liitteessä 7 on esimerkki tulosten laskemisesta ja editoinnista. Saaduista arvoista tehtiin kuvaajat (Kuviot 14–17), jotka havainnollistavat CAR:n ja PXR:n eri promoottorifragmenttien aktivoinnin välisiä eroja.

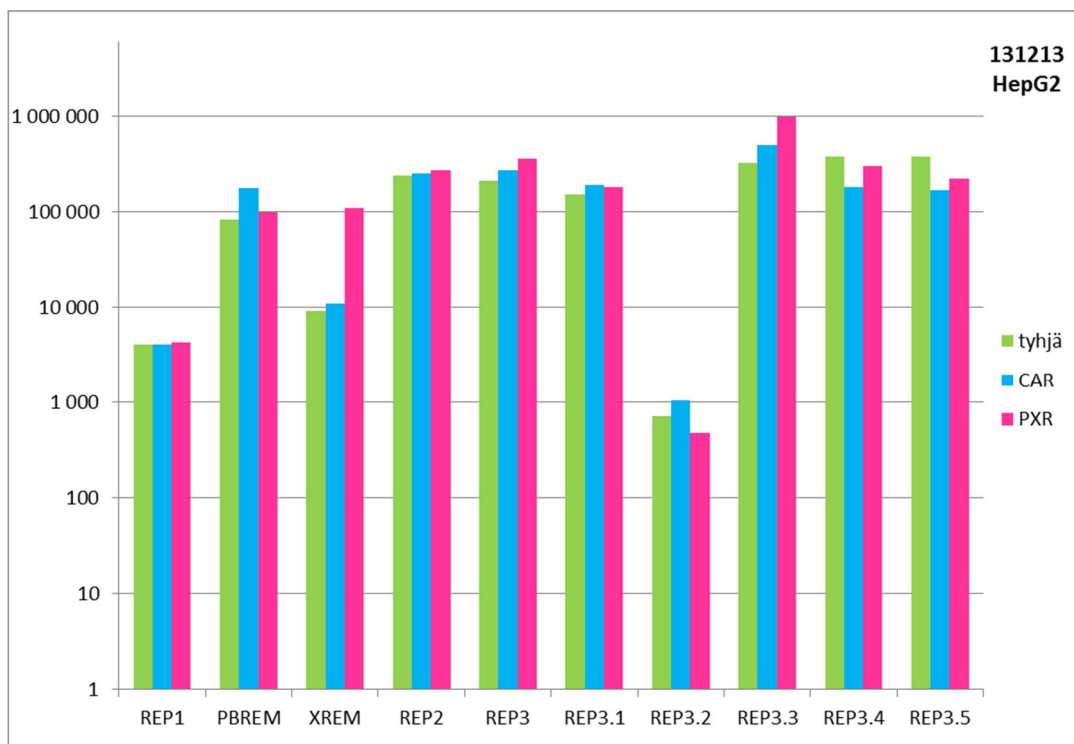


KUVIO 14. Ensimmäisen C3A-solujen testin tulokset



KUVIO 15. Toisen C3A-solujen testin tulokset REP3.3:n tulokset ovat niiden suuruuden vuoksi omalla kuvaajallaan

KUVIO 16. REP3.3



KUVIO 15. HepG2-soluilla tehty testi

C3A-solujen lisäksi koe tehtiin myös HepG2-soluilla (kuvio 17), jotka ovat myös kuolemattomia ihmisen hepatosyyttejä. Ne ovat yleisimmin käytetty ihmisen hepatosyyttisolulinja, mutta ne eivät ilmennä kaikkia sytokromi P450-entsyymejä. Niiden on tutkittu vähentävän CYP2B6-, CYP2C9- ja CYP3A4-aktiivisuutta jopa 2- tai 3-kertaisesti primäärihepatosyytteihin verrattuna. (Donato, Lahoz, Castell ja Gómez-Lechón 2008, 1.) Mittauksella haluttiin selvittää HepG2-solujen soveltuvuutta tumareseptorien reportterigeenimittaukseen ja tulosten yhteneväisyyttä enemmän käytettyjen C3A-solujen kanssa.

TAULUKKO 9. Tumareseptorien aktiivisuus 0-plasmidiin(tyhjä) verrattuna

|        | C3A (031213) |       | C3A (131213) |      | HepG2 (131213) |       |
|--------|--------------|-------|--------------|------|----------------|-------|
|        | CAR          | PXR   | CAR          | PXR  | CAR            | PXR   |
| REP1   | 0,11         | -0,33 | -0,06        | 0,28 | 0,01           | 0,07  |
| PBREM  | 0,93         | 0,38  | 0,17         | 0,15 | 1,16           | 0,21  |
| XREM   | 0,19         | 18,24 | 0,20         | 0,03 | 0,20           | 10,80 |
| REP2   | 0,36         | 0,30  | -0,01        | 0,38 | 0,04           | 0,13  |
| REP3   | 0,26         | 3,41  | 0,61         | 3,97 | 0,29           | 0,68  |
| REP3.1 | 0,16         | 0,24  | 0,26         | 0,56 | 0,25           | 0,20  |
| REP3.2 | 12,25        | 4,55  | -1,00        | 2,87 | 0,56           | -0,34 |
| REP3.3 | 0,16         | 2,08  | 0,15         | 3,36 | 0,56           | 2,11  |
| REP3.4 | 0,07         | 0,89  | 0,24         | 0,89 | -0,52          | -0,20 |
| REP3.5 | 0,25         | 1,15  | 0,24         | 1,15 | -0,55          | -0,40 |

Taulukossa 10 esitellään tumareseptorien vaikutus eri promoottorifragmenttien aktiivisuuteen. Tulokset jaettiin 0-plasmidin arvoilla, joista muodostui taulukossa olevat kertoimet.

REP1:ssä ei ollut promoottorialuetta ollenkaan, joten sen tulosten oletettiin olevan matalia. Aktiivisuus oli lähellä 0-plasmidin tuloksia ja ne olivat lähellä nollaa. CAR lisäsi hieman PBREM:in aktiivisuutta, mutta aktiivisuuden lisääntyminen oli melko vähäistä eikä aktivaatiota syntynyt toisella testikerralla. Molempien tumareseptorien, ja erityisesti PXR:n, pitäisi nostaa XREM:in aktiivisuutta. Ensimmäisessä C3A-testissä ja HepG2-soluilla näin tapahtuikin, mutta toisessa C3A-testissä aktiivisuus ei lisääntynyt. Eri testikerroilla käytettiin samoja plasmideja, joten toisen testikerran ongelmat voivat johtua levyjen vuotamisesta. REP2:n arvot ovat lähellä nollaa eikä aktiivisuus lisääntynyt kummallakaan solulinjalla. Erityisesti PXR vaikuttaisi lisäävän REP3:n aktiivisuutta C3A-soluilla, mutta aktiivisuuden lisääntyminen oli vähäisempää HepG2-soluilla. Kummallakaan tumareseptorilla ei ollut merkittävää aktiivisuutta lisäävää vaikutusta REP3.1:een. Taulukon 10 perusteella molemmat tumareseptorit näyttäisivät lisänneen REP3.2:n aktiivisuutta, mutta kertoimien suuruus syntyi siitä, että 0-plasmidin arvot olivat huomattavasti pienempiä kaikkiin muihin fragmentteihin verrattuna, ja todellisuudessa tumareseptorien aikaansaama aktivaatio romahti. PXR lisäsi selkeästi ja toistettavasti REP3.3:n aktiivisuutta ja HepG2-soluilla myös CAR lisäsi hieman aktiivisuutta. REP3.4:n aktiivisuus nousi PXR:n vaikutuksesta C3A-soluilla, mutta nousu oli pienempää kuin REP3.3:lla. CAR:lla tai PXR:llä ei ollut vaikutusta REP3.5-fragmentin aktiivisuuteen.

## 9 POHDINTA

Reportterigeenimittauksen tulosten perusteella CAR ja PXR lisäävät promoottorifragmenttien REP3 ja REP3.3 aktiivisuutta. Tulosten perusteella nähdään myös fragmentin 3.2 aktiivisuuden vähenevän molempien tumareseptorien vaikutuksesta.

### 9.1 Tulosten luotettavuus ja jatkotutkimuksen tarve

CAR:n ja PXR:n LBD-alueiden subkloonaaminen epäonnistui, eikä sen syytä tiedetä varmasti. Alueiden monistaminen PCR-reaktiossa ei onnistunut eikä geeleillä näkynyt mitään tuotetta. Yritin optimoida PCR-ajon olosuhteita sekä eri komponenttien määriä reaktiossa, mutta se ei auttanut. Löytääkseni parhaat mahdolliset näytteet eristin RNA:ta lähes kaikista käytettävissä olevista näytteistä, mutta eristetty RNA oli yleisesti huonolaatuista ja epäpuhdasta. Jos maksapalaa ei ole laitettu RNA:n säilövään liuokseen riittävän nopeasti eläimen kuoltua, niin lähetti-RNA on voinut hajota. Vain noin 2 % totaali-RNA:sta on lähetti-RNA:ta (Suominen ym. 2010, 108), joten haluttuja tumareseptoreja on myös voitu ilmentää niin pieniä määriä, etteivät ne ole sattuneet mukaan näytteeseen. On myös mahdollista, vaikkakin epätodennäköistä, etteivät eläinten maksat ole palan irrottamisen hetkellä ilmentäneet kumpaakaan tumareseptoria.

Yritin myös eristää uudelleen RNA:ta samoista näytteistä, joista olin aikaisemmin saanut huonolaatuista RNA:ta. Eristetyn RNA:n laatu oli yleisesti huonoa: vain kolme 78:sta RNA-näytteestä oli laadultaan hyvää, mutta yksikään näyte ei täyttänyt aivan puhtaan RNA:n kriteereitä. Puhtaan RNA:n A260/280 on noin 2 ja A260/230 2,0–2,2 (Thermo Scientific 2009, 1–2; Suominen ym. 2010, 111), ja vain kolmella näytteellä nämä molemmat luvut olivat lähellä tavoitearvoja, mutta yhdessä näytteessä ei ollut A260/230-arvoa, joka olisi ollut merkittävästi yli 2. Hyvälaatuisten RNA-näytteiden vähäinen määrä kertoo ongelmista maksanäytteiden laadussa ja kaikkien näytteiden huono A260-230-arvo taas jostakin näytteissä olevasta epäpuhtaudesta. Näytteisiin on voinut jäädä epäpuhtauksia RNA:n eristysreagenssista eli TRI-Reagent:ista, joka absorboi aallonpituuksilla 230 nm–270 nm (Thermo Scientific 2009, 2.). Kuitenkaan epäpuhtauden lähteestä ei ollut varmuutta, joten ongelmaa ei saatu poistettua.

On myös mahdollista, etteivät käytetyt alukkeet olleet sopivia tähän monistukseen. Alukkeet suunniteltiin tietokoneohjelmalla, joka havaitsee alukkeiden hiussolmukerakenteiden ja toisiinsa sitoutumisen riskin, joten riski niiden muodostumiseen oli pieni. Suositeltu alukkeiden sulamislämpötilojen välinen ero eli 2 °C:ta, ylitettiin PXR:n alukkeilla, ja tämä on voinut vaikuttaa monistumisen epäonnistumiseen. Tumareseptoreista on olemassa eri variantteja, joten näytteissä ei välttämättä ole ollut juuri sitä varianttimuotoa, jonka perusteella alukkeet oli suunniteltu. CAR:n alukkeiden suunnittelussa otettiin huomioon koiran tunnettujen varianttien rakenne ja kiinnittymiskohdat olivat sellaisia, joiden pitäisi sopia eri varianteille. Koiran PXR:n rakenteesta oli saatavilla vain oletettuja sekvenssejä, joten alukkeiden suunnittelussa ei voitu olla varmoja niiden sopivuudesta näytteissä olevien LBD-alueiden monistamiseen. Alukkeiden kiinnittymiskohdiksi valikoitiin kuitenkin sellaisia alueita, joiden tiedetään olevan hyvin konservoituneita, jolloin eri varianttien monistamisen pitäisi onnistua.

Reportterigeenimittauksen tulosten perusteella ei voida vielä vetää suoria johtopäätöksiä CAR:n ja PXR:n vaikutuksesta promoottorifraktioiden aktivaatioon, sillä ne ovat vasta alustavia. Kaksi mittaus- ta ei riitä luotettavien ja toistettavien tulosten saamiseksi ja mittaus täytyy toistaa vielä useamman kerran, jotta mahdollisten muuttujien vaikutus tulokseen saadaan minimoitua. Mittausten toistettavuudessa olisi ollut parannettavaa, sillä useiden näytteiden kohdalla oli neljän rinnakkaisen tuloksen välillä myös paljon hajontaa, ja tuloksia täytyi editoida negatiivisten tai sarjasta selkeästi poikkeavien tulosten poistamiseksi. C3A-solujen uusintamittauksessa oli ongelmia soluviljelyssä käytettävien 48-kuoppalevyjen kanssa, koska osa niistä vaikutti vuotavan pohjan liitoskohdasta. Saman valmistuserän levyjä testattiin käsittelemällä ne samalla tavalla kuin kokeessa käytetyt levyt oli valmistettu. Niitä pidettiin +37 °C:ssa, kuivajäällä, -80 °C:ssa ja noin vuorokausi kylmäkuivurissa, jonka jälkeen kuoppiin pipetoitiin violetiksi värjättyä vettä, jolloin nesteen vuotaminen oltaisi havaittu helposti. Nesteen sakkaroosipitoisuus oli myös 1 % eli sama kuin kokeessakin. Nesteen vuotamista tarkasteltiin eri lämpötilasta toiseen siirtämisen välillä, mutta testilevyillä neste pysyi kuopissa. Nesteen vuotaminen olisi voinut johtua siitä, ettei levyissä käytetty muovi olisi kestänyt suuria lämpötilavaihteluita, mutta testin perusteella se ei ole vuodon todennäköisin aiheuttaja. Sen olisi voinut aiheuttaa myös se, että levyjä oltaisi käsitelty kovakouraisesti ja ne olisivat esimerkiksi tipahtaneet lattialle. Näin ei kuitenkaan ollut tapahtunut missään vaiheessa, joten ongelman syy jäi selvittämättä.

CAR odotetusti lisäsi PBREM:in aktiivisuutta, mutta aktiivisuuden nousu ei ollut suurta eikä se lisääntynyt toisella mittauskerralla. PXR lisäsi selkeästi XREM:in aktiivisuutta ensimmäisessä mittauksessa ja HepG2-soluilla, mutta toisella mittauskerralla aktivointia ei tapahtunut. PBREM ja XREM toimivat mittauksessa promoottorikontrolleina, sillä CAR:n ja PXR:n tiedetään sitoutuvan niihin ja lisäävän aktiivisuutta. Niiden toimimattomuus toisella mittauskerralla kertoo jostain testissä tapahtuneesta virheestä. Ongelma voisi johtua esimerkiksi levyjen liitoskohtien vuotamisesta, mutta testikerran tulokset ovat muilta osin samanlaisia muiden mittausten kanssa, joten niiden epätavallista toimintaa ei voida aukottomasti selittää silläkään. Reportterigeenimittausten tulosten perusteella CAR, ja erityisesti PXR, lisäsivät promoottorifragmenttien REP3 ja REP3.3 aktiivisuutta. PXR lisäsi myös REP3.4 ja REP3.5-fragmenttien aktiivisuutta, mutta se oli vähäisempää kuin REP3:lla ja REP3.3:lla.

Mittauksella testattiin myös HepG2-solujen soveltuvuutta tumareseptorien reportterigeenimittauksiin. HepG2-solujen tulostaso oli selkeästi pienempi kuin C3A-solujen, mutta niiden väliset tulokset olivat kuitenkin yhteneväisiä. Tulostason alhaisuuden takia vaikuttaisi siltä, että tulevaisuudessa olisi parempi käyttää C3A-soluja niiden vahvemman signaalin vuoksi.

## 9.2 Työn luotettavuus ja eettisyys

Tutkimustyön luonteeseen kuuluu sen kokeellisuus ja usein kokeen lopputuloksesta ei ole etukäteen varmaa tietoa. Tutkittavista asioista ei välttämättä ole saatavilla aikaisempaa julkaistua tietoa, jolloin ennen kokeen suorittamista tuloksista voidaan esittää vain arvioita. Tutkimustyölle tyypillistä on myös se, etteivät kaikki asiat ja työvaiheet etene aina suunnitellusti, ja tarkasti suunniteltu koekin voi epäonnistua. Tutkimustyön voidaan myös sanoa etenevän tavallaan yrityksen ja erehdyksen

kautta, sillä kaikkien työvaiheiden onnistumista ei voida välttämättä tietää etukäteen eikä mahdollisia ongelmia pystytä aina ennakoimaan. Usein käytössä on menetelmiä tai olosuhteita, joita ei ole aikaisemmin testattu juuri kyseisen kaltaisessa koeasetelmassa.

Opinnäytetyön luotettavuuden arviointi on tutkimustyössä haasteellista: teoriatasolla tiedetään, mitä pitäisi tapahtua ja miksi, mutta kaikesta huolimatta työvaiheet eivät välttämättä etene oletetulla tavalla. Viljeltävät solut käyttäytyvät aina hieman eri tavalla ja kokeiden tuloksissa tulee olemaan pieniä eroja vaikka koeasetelmat olisivatkin identtiset. Mahdollisten virheiden ja kloonaamisen epäonnistumisen syiden etsiminen on haastavaa, sillä käytössä oli vain rajallinen määrä aikaa ja myös yhteistyökumppaneiden taloudelliset resurssit ovat rajalliset. Työn luotettavuutta lisää se, että toimeksiantaja on tarkastanut kokeellisen osion toteutuksen sekä kirjallisen työn sisällön. Käytetyt työmenetelmät sekä työn asiasisältö on todettu oikeiksi ja tähän työhön soveltuviksi, joten luotettavuuden näkökulmasta voin lähinnä arvioida omaa työskentelyäni sekä kirjallisen työn lähteitä.

Hyvään tieteelliseen käytäntöön kuuluu rehellisyys, yleinen huolellisuus ja tarkkuus sekä varsinaisessa tutkimustyössä sekä tulosten tallentamisessa, esittämisessä ja tulosten arvioinnissa. Tiedonhaussa tulee noudattaa tieteellisen tutkimuksen kriteerien mukaisia ja eettisiä menetelmiä, joihin kuuluu asianmukainen viittaaminen muiden tutkijoiden julkaisuihin. (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2012.) Työtä tehdessä noudatin hyvän tieteellisen käytännön periaatteita, ja työskentelin huolellisesti ja tarkasti sekä arvioin työskentelyäni sekä saatujen tulosten laatua. Lähteiden laadun arvioimista ei voi tehdä pelkästään arvioimalla lähteen tuoreutta, sillä osa molekyylibiologian ja geeniteknikan perusmenetelmistä sekä protokollista on kehitetty jo vuosikymmeniä sitten, mutta ne ovat edelleenkin toimivia ja niitä käytetään maailmalaajuisesti. Käytin lähteinä enimmäkseen tieteellisiä artikkeleita, joiden sisältö on tarkastettu ja vertaisarvioitu ennen niiden julkaisemista. Lähteinä on myös muutamia toimeksiantajan ohjaamia pro gradu -tutkimuksia, jotka tarjosivat suomenkielistä tietoa helpottaen aiheeseen tutustumista. Ne toimivat myös lähteenä silloin, kun minulla ei ollut maksutonta pääsyä niissä käytettyihin alkuperäislähteisiin. Kirjalliseen työhön valitsin luotettavia lähteitä, kuten tieteellisiä artikkeleita, ammattikirjallisuutta sekä reagenssivalmistajien internetsivuja.

Työssä käytetyt maksupalat oli saatu lahjoituksina Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitokselta ja eläinkokeita tekeville yrityksiltä, joilla on ollut asianmukaiset luvat eläinten lopettamiseen. Tutkimus ei vaatinut eettisen toimikunnan lausuntoa tai erillistä tutkimuslupaa, koska se on yliopiston perustutkimusta. Yhteistyökumppanien luvat kattoivat maksanäytteiden saamisen ja käytön myös tämän opinnäytetyön osalta.

### 9.3 Tiedonhankinta ja aikataulu

Aiheen ideointi alkoi toukokuun 2013 lopulla, jolloin sain opinnäytetyön aiheen professori Honkakoskelta. Alkuperäisen suunnitelman mukaan olisin tehnyt työn eri aiheesta, mutta olosuhteiden muuttuessa päädyimme yhdessä tähän aiheeseen. Aihe oli minulle hyvin mieluinen, ja se vaikutti heti kiinnostavalta sekä monipuoliselta. Aiheen vahvistuttua aloitin tiedonhaun aiheeseen liittyvistä asioista. Etsin tietoa ja kirjoitin opinnäytetyöraporttia rinnakkain samalla työn käytännön osuuden ede-



tessä. Kloonaustyön vaiheet suoritin kesäkuussa ja heinäkuussa 2013 sekä jatkoin PCR:n optimointia syksyllä. Kun selvisi, ettei kloonaus onnistu, siirryin työskentelemään erikoislaboratoriomestari Lea Pirskasen kanssa. Valmistin käänteistransfektiolevyjä ja tein reportterigeenimittauksia hänen kanssaan joulukuun 2013 aikana. Saimme kokeiden tuloksista vasta alustavaa tietoa, mutta aikataulullisista syistä en enää jatkanut pidempään projektin parissa, vaan keskityin kirjallisen työn kirjoittamiseen.

Tiedonhaku oli työlästä, sillä suurin osa tumareseptoreja, ja erityisesti CAR:a ja PXR:ää, koskeva tieto löytyy englanninkielisistä tieteellisistä artikkeleista. Valtaosa tumareseptoreista, käänteistransfektioista ja reportterigeenimittauksesta kertovasta tiedosta on löydetty PubMed-sivustolta. Siellä ongelmana ei ollut artikkeleiden vähäinen määrä, vaan se kuinka löytää artikkeleiden joukosta ne, jotka sisältävät aiheen kannalta oleellimmän tiedon. Välillä koin myös ongelmalliseksi sen, ettei minulla ollut maksutonta pääsyä kaikkiin mielenkiintoisiin ja oleellista tietoa sisältäviin artikkeleihin eikä kaikkia kirjoja saanut lainattua lähikirjastoista. Työn alkuvaiheessa käytännön asioiden ja työvaiheiden suunnittelu tapahtui yhteistyössä ohjaajien kanssa, mutta työn edetessä suunnittelin itse omat aikatauluni ja etsin PCR-monistuksen ongelmiin ratkaisuja kirjallisuudesta ja internetistä sekä kokeilin eri keinoja sen poistamiseksi. Sain apua laitteiden käyttöön sekä hyviä neuvoja työvaiheiden toteuttamiseen ohjaajaltani ja muulta laboratorion henkilökunnalta.

#### 9.4 Oma oppiminen ja ammatillinen kasvu

Valtioneuvoston asetuksessa 352/2003 7 § opinnäytetyön tavoitteeksi on määritelty opiskelijan valmiuksien kehittäminen ja niiden osoittaminen ammattipintoihin liittyvässä käytännön asiantuntijuustehtävässä, johon hän soveltaa tietojaan ja taitojaan (Valtioneuvoston asetus ammattikorkeakouluista 2003). Hakala (2004, 9–10) taas listaa työelämän vaatimuksia, joiden kohtaamiseen opinnäytetyö osaltaan kasvattaa opiskelijaa. Hän mainitsee vaatimuksiksi mm. tiedonetsimisen täsmällisen ongelman ratkaisemiseksi, tietojen ja taitojen soveltamisen, aikataulujen laatimisen ja kyvyn ratkaista ongelmia. Näiden lisäksi työelämä vaatii taitoa viestiä kirjallisesti sekä suullisesti, lähdekriittisyyttä, itsekriittisyyttä ja oman työn arviointia. Opinnäytetyön tekeminen vaatii minulta oman toiminnan kriittistä arviointia, tiedon etsimistä ja sen soveltamista käytännön työskentelyyn, suunnitelmallisuutta sekä kykyä tehdä itsenäisiä päätöksiä. Tarkastelin kriittisesti omaa työskentelyäni ja toistin epäonnistuneita vaiheita poistaakseni työn tekijästä johtuvan virheen mahdollisuuden.

Bioanalytikko voi työskennellä terveydenhuollon kliinisten laboratorioden lisäksi myös muunlaisissa työtehtävissä, kuten tutkimustyössä, eläinlääkinnässä ja lääketeollisuudessa (Bioanalyttikoliitto 2014). Tämän opinnäytetyön kautta pääsin työskentelemään tutkimuslaboratoriossa ja laajentamaan osaamistani myös kliinisten laboratorioden ulkopuolelle. Kloonaustyön toteuttaminen edellyttää hyvää kokonaisprosessin hallintaa sekä teorian ja käytännön yhdistämistä. Siinä tarvitaan myös riittävän laaja teoreettinen tietämys käytettävistä menetelmistä ja riittävät kädentaidot. Työvaiheiden toteutus vaatii huolellista suunnittelua ennen kunkin vaiheen aloittamista ylimääräisen työn ja reagenssien turhan käytön välttämiseksi. Jotta haluttu lopputulos olisi mahdollista saavuttaa, täytyi työskennellessä arvioida omaa toimintaa ja sen oikeellisuutta. Esimerkiksi PCR:ssä on tärkeää lisätä oikea

määrä kutakin komponenttia, joten pitoisuudet ja tilavuudet täytyi laskea oikein sekä ne täytyi pipetoida oikeassa järjestyksessä. PCR-työskentely vaatii myös tarkkuutta ja suunnitelmallisuutta, sillä yksikin nukleotidi väärässä putkessa voisi kontaminoida reagenssin tai näytteen.

Tämä opinnäytetyöprosessi oli kokonaisuutena minulle erittäin antoisa ja mieluisa, ja koen oppineeni sitä tehdessä paljon tulevaisuudessa ja työelämässä tarvittavia taitoja. Opinnäytetyön aihe on työelämälähtöinen ja se vastaa myös omia mielenkiinnon kohteitani. Itsenäinen ja projektityyppinen työskentely tukee työelämään siirtymistä sekä vahvistaa asiantuntijuuttani ja osaamistani bioanalyttikkona. Työssä ei vain suoritettu työvaiheita suoraan työohjeita lukien, vaan se vaati myös ongelmanratkaisutaitoa, kriittisen lukemisen taitoa, aiheen teoreettista osaamista sekä työn eri vaiheiden toteuttamisen osaamista. Koen molekyylibiologian ja geenitekniikan osa-alueen ammatillisen osaamiseni lisääntyneen merkittävästi tehdessäni tätä opinnäytetyötä.

## LÄHTEET

ALLARD, Simon ja KOPIH, Kevin 2008. Luciferase reporter assays: powerful, adaptable tools for cell biology research. Promega Corporation [verkkajulkaisu] 23–26. [Viitattu 2014-3-19.] Saatavissa: <http://fi.promega.com/~media/files/resources/cell%20notes/cn021/luciferase%20reporter%20assays-%20powerful%20adaptable%20tools%20for%20cell%20biology%20research.pdf?la=en>

ANTTILA, Teemu 2013. Ihmisen vierasaineita tunnistavien reseptorien aktivaatiomittaukset. Pro gradu -tutkimus. Farmasian teknologian ja biofarmasian laitos. Kuopio: Itä-Suomen yliopisto.

ARANDA, Ana ja PASCUAL, Angel 2001. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiological reviews* [verkkolehti] 81 (3), 1269–1304. [Viitattu 2013-6-25.] Saatavissa: <http://physrev.physiology.org/content/physrev/81/3/1269.full.pdf>

BIOANALYYTIKKOLIITTO 2014. Mikä ihmeen bioanalyttikko? [verkkoesite]. Saatavissa: [http://bioanalyttikkoliitto-fi-bin.directo.fi/@Bin/91f15dfc7bf9494cb030b9884f35c16f/1396878436/application/pdf/512556/Mik%C3%A4%20ihmeen%20bioanalyttikko\\_esite\\_nettiin.pdf](http://bioanalyttikkoliitto-fi-bin.directo.fi/@Bin/91f15dfc7bf9494cb030b9884f35c16f/1396878436/application/pdf/512556/Mik%C3%A4%20ihmeen%20bioanalyttikko_esite_nettiin.pdf)

BROWN, T.A 2005. *Genetics : a molecular approach*. 3. painos. New York: Taylor & Francis Group.

CHEN, Yakun, TANG, Yong, GUO, Changxiong, WANG, Jiuwei, BORAL, Debasish ja NIE, Daotai 2012. Nuclear receptors in the multidrug resistance through the regulation of drug-metabolizing enzymes and drug transporters. *Biochemical Pharmacology* [verkkolehti] 83 (8), 1112–1126. [Viitattu 2013-2-23.] Saatavissa: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006295212000779>

DONATO, M.T, LAHOZ, A., CASTELL, J.V. ja GÓMEZ-LECHÓN, M.J. 2008. Cell lines: a tool for *in vitro* drug metabolism studies [verkkolehti] 9 (1), 1–11. [Viitattu 2013-9-16.] Saatavissa: <http://www.eurekaselect.com/66202/article>

EHRHARDT, Christina, SCHMOLKE, Mirco, MATZKE, Andreas, KNOBLAUCH, Alexander, WILL, Carola, WIXLER, Viktor ja LUDWIG, Stephan 2006. Polyethylenimine, a cost-effective transfection reagent. *Signal transduction* [verkkolehti] 6 (3), 179–184. [Viitattu 2013-3-7.] Saatavissa: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/sita.200500073/abstract>

ERLICH, Henry A. 1989. *Basic Methodology*. Julkaisussa: ERLICH, Henry A. (toim.) *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification*. New York: Stockton Press, 1–6.

GEFLAND, David H., SNINSKY, John J. ja WHITE, Thomas J. (toim.) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. San Diego: Academic Press, 3–12.

- GIGUÈRE, Vincent 1999. Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocrine Reviews* [verkkolehti] 20 (5), 689–725. [Viitattu 2013-2-12.] Saatavissa: <http://press.endocrine.org/doi/full/10.1210/edrv.20.5.0378>
- HAKALA, Juha 2004. *Opinnäyteopas ammattikorkeakouluille*. Tampere: Gaudeamus.
- HIRSJÄRVI, Sirkka, REMES, Pirkko ja SAJAVAARA, Paula 2004. *Tutki ja kirjoita*. 10. painos. Helsinki: Tammi.
- HONKAKOSKI, Paavo 2014-2-3. *Biofarmasian professori*. [haastattelu]. Kuopio: Itä-Suomen yliopisto.
- HUUPPONEN, Risto ja RAUNIO, Hannu 2007. *Vierasainemetabolia*. Teoksessa *Koulu, Tuomisto (toim.)*. *Farmakologia ja toksikologia*. 7.painos [verkkójulkaisu]. [Viitattu 2013-1-17.] Saatavissa: [http://www.medicina.fi/index.php?option=com\\_content&view=article&id=72&Itemid=78](http://www.medicina.fi/index.php?option=com_content&view=article&id=72&Itemid=78)
- INNIS, Michael A. ja GEFLAND, David H. 1990. *Optimization of PCRs*. Julkaisussa: INNIS, Michael A. (toim.) *PCR protocols : a guide to methods and applications*. San Diego: Academi Press.
- KÜBLBECK, Jenni 2012. *Use of xenosensors for drug metabolism studies: Focus on Constitutive Androstane Receptor*. *Dissertations in Health Sciences*. Number 130. School of Pharmacy, Faculty of Health Sciences. . Kuopio: University of Eastern Finland.
- KÜBLBECK, Jenni, JYRKKÄRINNE, Johanna, MOLNÁR, Ferdinand, KUNINGAS, Tiina, PATEL, Jayendra, WINDSHÜGEL, Björn, NEVALAINEN, Tapio, SIPPL, Wolfgang, POSO, Antti ja HONKAKOSKI, Paavo 2011. *New in Vitro Tools to Study Human Constitutive Androstane Receptor (CAR) Biology: Discovery and Comparison of Human CAR Inverse Agonists*. *Molecular Pharmaceutics* [verkkolehti] 8 (6), 2424–2433. [Viitattu 2012-10-20.] Saatavissa: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/mp2003658>
- LEE, Eun ja PARK, Young 2008. *Metabolic regulation of nuclear receptors*. *Journal of Korean Endocrine Society* [verkkolehti] 23 (3), 155–164. [Viitattu 2014-4-2.] Saatavissa: <http://synapse.koreamed.org/Synapse/Data/PDFData/0008JKES/jkes-23-155.pdf>
- LI, Haishan ja WANG, Hongbing 2010. *Activation of Xenobiotic Receptors: Driving into the Nucleus*. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* [verkkolehti] 6 (4), 409–426. [Viitattu 2012-10-13.] Saatavissa: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1517/17425251003598886>
- LIFE TECHNOLOGIES 2014. *RNA priming strategies* [verkkójulkaisu]. [Viitattu 2014-3-19.] Saatavissa: <http://www.lifetechnologies.com/fi/en/home/life-science/pcr/reverse-transcription/rna-priming-strategies.html>
- MOORE, John T. ja Kliewer, Steven A. 2000. *Use of the nuclear receptor PXR to predict drug interactions*. *Toxicology* [verkkolehti] 197 (1-3), 1–10. [Viitattu 2014-3-19.] Saatavissa: <http://ac.els->

cdn.com/S0300483X00003000/1-s2.0-S0300483X00003000-main.pdf?\_tid=06a6739c-af3b-11e3-8bb9-00000aab0f01&acdnat=1395215560\_7409da3da2e7791f0e7265af2a51bafb

NEBERT, Daniel, WIKVALL, Kjell ja MILLER, Walter 2013. Human cytochromes P450 in health and disease. *Philosophical Transactions of The Royal Society B* [verkkolehti] 368 (1612), 1–22. [Viitattu 2014-3-24.] Saatavissa: <http://rstb.royalsocietypublishing.org/content/368/1612/20120431.full.pdf>

OTTOW, Eckhard ja WEINMANN, Hilmar 2008. *Esipuhe. Teoksessa Ottow, Weinmann (toim.). Nuclear receptors as drug targets.* 2008. 1.painos. Saksa: Wiley.

PAGUIO, Aileen, STECHA, Pete, WOOD, Keith ja FAN, Frank 2010. Improved Dual-Luciferase Reporter Assays for Nuclear Receptors. *Current Chemical Genomics* [verkkolehti]. 3 (4), 43–49. [Viitattu 2014-2-3.] Saatavissa: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3115594/pdf/TOCHGENJ-4-43.pdf>

PALUMBI, Steve, MARTIN, Andrew, ROMANO, Sandra, MCMILLAN, W.Owen, STICE, Ligaya ja GRABOWSKI, Gail 2002. *The Simple Fool's Guide to PCR* [verkkojulkaisu]. Department of Zoology and Kewalo Marine Laboratory. University of Hawaii. [Viitattu 2013-9-12.] Saatavissa: <http://palumbi.stanford.edu/SimpleFoolsMaster.pdf>

PARK, Tae Gwan, JEONG, Ji Hoon ja KIM, Sung Wan 2006. Current status of polymeric gene delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* [verkkolehti] 58 (4), 467–486. [Viitattu 2014-3-21.] Saatavissa: [http://ac.els-cdn.com/S0169409X06000500/1-s2.0-S0169409X06000500-main.pdf?\\_tid=47781e76-b0d4-11e3-892e-00000aab0f6b&acdnat=1395391333\\_c64fbc4b592a0456665d19c53ce1cf4b](http://ac.els-cdn.com/S0169409X06000500/1-s2.0-S0169409X06000500-main.pdf?_tid=47781e76-b0d4-11e3-892e-00000aab0f6b&acdnat=1395391333_c64fbc4b592a0456665d19c53ce1cf4b)

PELKONEN, Olavi, TURPEINEN, Miia, HAKKOLA, Jukka, HONKAKOSKI, Paavo, HUKKANEN, Janne ja RAUNIO, Hannu 2008. Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status. *Archives of Toxicology* [verkkolehti] 82 (10), 667–715. [Viitattu 2014-3-18.] Saatavissa: [http://download.springer.com/static/pdf/419/art%253A10.1007%252Fs00204-008-0332-8.pdf?auth66=1395318255\\_f8fc79a80ee71e315977589c7c1c537d&ext=.pdf](http://download.springer.com/static/pdf/419/art%253A10.1007%252Fs00204-008-0332-8.pdf?auth66=1395318255_f8fc79a80ee71e315977589c7c1c537d&ext=.pdf)

PÄRSSINEN, Raimo, SUOMINEN, Ilari ja HAAJANEN, Kari 2012. *Biogeeni - Ammatillista biokemiaa ja geenitekniikkaa.* Tampere: Opetushallitus.

QIAGEN. *PCR protocols & Applications* [verkkosivu.] [Viitattu 2014-2-18.] Saatavissa: <http://www.qiagen.com/knowledge-and-support/spotlight/protocols-and-applications-guide/pcr/>

RECHLY, E.J. ja KRASOWSKI, M.D. 2006. Evolution and function of the NR11 nuclear hormone receptor subfamily (VDR, PXR, and CAR) with respect to metabolism of xenobiotics and endogenous compounds. *Current Drug Metabolism* [verkkolehti] 7 (4), 349–365. [Viitattu 2014-4-9.] Saatavissa: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2231810/pdf/nihms38430.pdf>

REINISALO, Mika, URTTI, Arto ja HONKAKOSKI, Paavo 2005. Freeze-drying of cationic polymer DNA complexes enables their long-term storage and reverse transfection of post-mitotic cells. *Journal of Controlled Release* [verkkolehti] 110 (2), 437–443. [Viitattu 2014-3-19.] Saatavissa: [http://ac.els-cdn.com/S0168365905005316/1-s2.0-S0168365905005316-main.pdf?\\_tid=227b16a0-af53-11e3-a051-00000aab0f6c&acdnat=1395225914\\_6574a78f48c53ba0c115cfb20ee08081](http://ac.els-cdn.com/S0168365905005316/1-s2.0-S0168365905005316-main.pdf?_tid=227b16a0-af53-11e3-a051-00000aab0f6c&acdnat=1395225914_6574a78f48c53ba0c115cfb20ee08081)

SAITO, Kosuke, KOBAYASHI, Kaoru, MIZUNO, Yuki, FURIHATA, Tomomi ja CHIBA, Kan 2012. Constitutive androstane/active receptor is a target of retinoic acid receptor in humans. *Biochemical Pharmacology* [verkkolehti] 80 (8), 129–135. [Viitattu 2013-1-20.] Saatavissa: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006295210001668>

SCHEININ, Mika 2007. Lääkeaineiden vaikutusmekanismit: reseptorit. Teoksessa Koulu, Tuomisto (toim.). *Farmakologia ja toksikologia*. 7.painos [verkkójulkaisu]. [Viitattu 2013-2-3.] Saatavissa: [http://www.medicina.fi/index.php?option=com\\_content&view=article&id=70&Itemid=78](http://www.medicina.fi/index.php?option=com_content&view=article&id=70&Itemid=78)

SINDELAR, Robert D. 1997. *Additional Biotechnology-Related Techniques*. Julkaisussa: CROMMELIN, Daan J A ja SINDELAR Robert D. (toim.) *Pharmaceutical Biotechnology*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 123–165.

STRACHAN, Tom ja READ, Andrew 2011. *Human Molecular Genetics*. 4. painos. New York: Garland Science.

SUOMINEN, Ilari, PÄRSSINEN, Raimo, HAAJANEN, Kari ja PELKONEN, Jani 2010. *Geenitekniikka*. Turku: Turun ammattikorkeakoulu.

TAURIAINEN, Eveliina 2006. Lajien väliset erot CAR- ja PXR-tumareseptorien toiminnassa. Pro gradu -tutkimus. *Farmasian teknologian ja biofarmasian laitos*. Kuopio: Itä-Suomen yliopisto.

THERMO SCIENTIFIC 2009. 260/280 and 260/230 Ratios [tuotemanuaali]. Saatavissa: <http://www.phenogenomics.ca/transgenics/docs/NanoDrop%20Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf>

THERMO SCIENTIFIC. Tm calculator [laskuri]. Saatavissa: <http://www.thermoscientificbio.com/webtools/tmc/>

THERMO SCIENTIFIC 2012a. PRODUCT INFORMATION. DreamTaq DNA Polymerase [tuotemanuaali]. Saatavissa: <http://www.thermoscientificbio.com/uploadedFiles/Resources/ep0702-dreamtaq-product-information.pdf>

THERMO SCIENTIFIC 2012b. PRODUCT INFORMATION. Phusion High-Fidelity DNA Polymerase [tuotemanuaali]. Saatavissa: <http://www.thermoscientificbio.com/uploadedFiles/Resources/f-530s-product-information.pdf>

- TIMSIT, Yoav E. ja NEGISHI, Masahiko 2006. CAR and PXR: The Xenobiotic-sensing receptors. *Steroids* [verkkolehti] 72 (3), 231–246. [Viitattu 2012-10-20]. Saatavissa: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039128X06002649>
- TOJIMA, Hiroki, KAKIZAKI, Saturo, YAMAZAKI, Yuichi, TAKIZAWA, Daichi, Horiguchi, Norio, SATO, Ken ja MORI, Masatomo 2012. Ligand dependent hepatic gene expression profiles of nuclear receptors CAR and PXR. *Toxicology Letters* [verkkolehti] 212 (3), 288–297. [Viitattu 2012-10-13.] Saatavissa: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378427412011654>
- TUTKIMUSEETTINEN NEUVOTTELUKUNTA 2012. Hyvä tieteellinen käytäntö ja sen loukkausepäilyjen käsitteleminen Suomessa [verkkajulkaisu]. [Viitattu 2014-4-15.] Saatavissa: [http://www.tenk.fi/sites/tenk.fi/files/HTK\\_ohje\\_verkkoversio040413.pdf.pdf#overlay-context=fi/ohjeet-ja-julkaisut](http://www.tenk.fi/sites/tenk.fi/files/HTK_ohje_verkkoversio040413.pdf.pdf#overlay-context=fi/ohjeet-ja-julkaisut)
- ULMANEN, Ismo, TENHUNEN, Jukka, YLÄNNE, Jari, VALSTE, Juha ja VIITANEN, Pertti 2001. *Geeni*. 1.-4. painos. Porvoo: Wsoy.
- WALSH, Gary 2007. *Pharmaceutical Biotechnology: Concepts and Applications*. Wiley: Chichester.
- VALTIONEUVOSTON ASETUS AMMATTIKORKEAKOULUISTA 15.5.2003/352. Finlex. Lainsäädäntö [Viitattu 2014-4-5]. Saatavissa: [http://www.finlex.fi/fi/laki/ajantasa/2003/20030352?search\[type\]=pika&search\[pika\]=15.5.2003%2F352%20#L3P7](http://www.finlex.fi/fi/laki/ajantasa/2003/20030352?search[type]=pika&search[pika]=15.5.2003%2F352%20#L3P7)
- VIGNATI, Luisella, BOGNI, Alessia, GROSSI, Pietro ja MONSHOUWER, Mario 2004. A human and mouse pregnane X receptor reporter gene assay in combination with cytotoxicity measurements as a tool to evaluate species-specific CYP3A induction. *Toxicology* [verkkolehti] 199 (1), 23–33. [Viitattu 2012-10-13.] Saatavissa: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300483X04001118>
- WU, Baojian, LI, Sha ja DONG, Dong 2013. 3D structures and ligand specificities of nuclear xenobiotics receptor CAR, PXR and VDR. *Drug Discovery Today* [verkkolehti] 18 (11–12), 574–581. [Viitattu 2014-4-1]. Saatavissa: [http://ac.els-cdn.com/S1359644613000020/1-s2.0-S1359644613000020-main.pdf?\\_tid=7abdbb36-b982-11e3-8f85-00000aacb361&acdnat=1396345760\\_6b6737f0681680de81fae587b5eb9d07](http://ac.els-cdn.com/S1359644613000020/1-s2.0-S1359644613000020-main.pdf?_tid=7abdbb36-b982-11e3-8f85-00000aacb361&acdnat=1396345760_6b6737f0681680de81fae587b5eb9d07)
- YAMAMOTO, Yukio ja NEGISHI, Masahiko 2008. The Antiapoptotic Factor Growth Arrest and DNA-Damage-Inducible 45  $\beta$  Regulates the Nuclear Receptor Constitutive Active/Androstane Receptor-Mediated Transcription. *Drug Metabolism and Disposition* [verkkolehti] 36 (7), 1189–1193. [Viitattu 2012-10-13]. Saatavissa: <http://dmd.aspetjournals.org/content/36/7/1189.long>
- ZANG, Ru, LI, Ding, TANG, I-Ching, WANG, Jufang ja YANG, Sheng-Tian 2012. Cell-based assays in high-throughput screening for drug discovery. *International Journal of Biotechnology for Wellness*

Industries [verkkolehti] 1 (1), 31–51. [Viitattu 2014-2-19.] Saatavissa:  
<http://www.lifescienceglobal.com/pms/index.php/ijbwi/article/view/94/84>

ZIAUDDIN, Junaid ja SABATINI, David 2001. Microarrays of cells expressing defined cDNAs. Nature [verkkolehti] 411 (3), 107–110. [Viitattu 2014-3-21.] Saatavissa:  
<http://www.nature.com/nature/journal/v411/n6833/pdf/411107a0.pdf>



## LIITE 1: REAGENSsit JA LAITTEET

| <u>Reagenssit</u>   | Valmistaja   | Tuotenro.   |
|---|--|---|
| Alukkeet<br> dCAR LBD (1, 2) ja dPXR LBD (1, 2)   | Oligomer (Helsinki)  |   |
| RNA:n eristäminen<br> TRI reagent<br> kloroformi<br> isopropanoli<br> Ribolock Rnase  | Sigma-Aldrich<br>Sigma-Aldrich<br>Sigma-Aldrich<br>Thermo Scientific   | T9424<br>C2432<br>I9516<br># EO0381   |
| RNA:n puhdistaminen DNA:sta<br> DNA-free™ Kit   | Invitrogen   | AM1906  |
| RT-PCR<br> RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit  | Thermo Scientific  | #K1621  |
| PCR<br> DreamTaq™-polymeraasi<br> Phusion High-Fidelity DNA-polymeraasi<br> 10X Taq buffer<br> dNTP(0.2mM)<br> MgCl(25mM)<br> 5X Phusion bufferHF<br> dNTP(10mM)<br> DMSO | Thermo Scientific<br>Thermo Scientific<br>Thermo Scientific<br>Thermo Scientific<br>Thermo Scientific<br>Thermo Scientific<br>Thermo Scientific<br>Thermo Scientific | #EP0701<br>#F-530S<br># B65<br>#R0241<br>#R0971<br>#F-518<br>#R0192<br>#F-515 |
| mRNA:n puhdistaminen<br> GenElute™ mRNA Miniprep Kit  | Sigma-Aldrich  | MRN 10  |
| Agaroosigeelielektroforeesi<br> agaroosi<br> 1X TAE-puskuri<br> GeneRuler™ 1 kb DNA ladder<br> SYBR® Green  | Sigma-Aldrich<br>valmistettu itse<br>Thermo Scientific<br>Invitrogen   | A9539<br># SM0311<br>S7563  |
| <u>Laitteet</u>   |  |   |
| RNA:n puhtauden mittaaminen<br> NanoVue Plus™-spektrofotometri  | GE Healthcare  |   |
| RT-PCR ja PCR<br> iCycler   | Bio-Rad  |   |
| Agaroosigeelielektroforeesi<br> GelCoc 2000   | Bio-Rad  |   |

Kääteistransfektiolevyjen valmistamisessa ja reportterigeenimittauksessa käytetyt materiaalit ja laitteet ovat samat kuin Anttilan (2013, 55–57) pro gradu -tutkielmassaan käyttämät.

LIITE 2: ALUKKEIDEN SUUNNITTELUN PERUSTANA OLLEET SEKVENSSIT

PREDICTED: *Canis lupus familiaris* transcript variant 4 (NR1I3), mRNA NCBI Reference Sequence: XM\_545770.3

```

1   atggccagcg  ggga cga tga  gccaggaac  tgtatgggat  gtggagaccg  agccacgggc
61  tatcatttcc  atgccctgac  ttgtgagggc  tgcaagggct  tcttcagacg  aa cgggtcagc
121  aaaagca ccg  ggctcacctg  ccccttcgct  ggaa gctgta  aggtcaaca  ggctcagagg
181  cggccactgc  cggcctgca  gt tgcagaag  tgcc tagatg  ctggc atgag  gaagga aatg
241  atcctgtcgg  ctga agccct  ggcgctgcgg  cgagca aagc  aggcc agcg  gcgggc ccag
301  caagcacctc  tgcagctgag  ca aggagcag  aa agagctag  tccagacact  cctgggggct
421  caca cccgcc  acgtgggcac  catgtttgac  cagt ttgtgc  agttc agggc  tccagctcat
481  ctgt tca ccc  acta cca gcg  ct tgc cccatc  ccag tccctg  taatgcctct  gctcgtgca c
541  ttggcggaca  tcaaaccttt  catggtacag  ca agtcacca  agttca cca  ggacctgcc
601  ctct tccggt  cctgccca  ggag gaccag  atct cctcc  tcaaggcg  agctgtgga a
661  atctgtcaca  ttgctctca  caccacgttc  tgcc tccaaa  cgcgacact  cctctgcggg
721  ccgctgcgct  atacgatgga  ggacggcgtc  cgccttccc  ccgcgggct  ccagga agag
781  tttttagagt  tgcctcttc  ct tccatggg  accctgaagc  gactccagct  ccagga gcc
841  aggt aagaga  taga cca tct  gcaa gaggtg  atgg cctga  ccctgcagag  ctacatcaga
901  ggccagcagc  ccag gectcg  ggatcggttt  ctgtatgga  agctgctggg  cctgttggct
1021  gagctccgga  gca taa caa  tgcgtacggg  ca ccaaatcc  agca catcca  ggga ctgtct
1081  gccatgagtc  cgtcgtcca  ggagatctgc  agctga

```

PREDICTED: *Canis lupus familiaris* (NR1I2), mRNA NCBI Reference Sequence: XM\_535750.3

```

1   atgcccgagc  ccggtgagga  acaggtgcag  cctcagtaa  aactggatgc  tgattcacag
61  gaacgagaga  tgtggctggc  cctaccgggt  caccagttg  ccgtca tttt  cctgtccatg
121  ggcacccctg  ctgtgaggac  tgatggtggg  ggagtaggt  caga agtgca  ggcatcagca
181  ggcaccccca  tccacccag  gtccccattt  tatttctgc  atga tctgt  gttgacagag
241  tgcagctacg  agttctgctc  ca ca tggcat  cagctggatg  ctctactgga  ctgcgcgggc
301  tcaactcgct  ggagcctggt  ggggggagc  ctggtgcggc  acttccctcc  cgcctcttc
361  tctccctgg  ccgggttctc  cctcccgctc  ta ccccggg  gcctcgccag  gttctcccc
421  tctcgttcta  ctccgcgcc  ctcccaagg  tctccctcg  gcctctact  ccgcggccct
481  cgcaggttc  tccccctcc  gctctactcc  gggccctcg  ccaggtctc  cccctccgc
541  tcta ctcgc  ggccctgc  agttctccc  cctcgggctc  tactccggg  ccctcgccag
601  gttctcccc  tgggctcta  ctccgggcc  ctcccaagg  tctccccct  gcgctctact
661  ccgcggccct  ccaggttc  cctccctcc  gctctctcc  gcggccctcg  ccaggtctc
721  cccctgggg  tcta ctcgc  ggccctgc  aggttctcc  cctcgcgctc  ta cccggg
781  cctcgcag  gttctcccc  tcccgtcta  ctccgggcc  ctcccaagg  tctccccctg
841  gcgctctacc  ccgcggccct  ccaggttc  tccccctgc  gctctactcc  ccggccctcg
901  ccaggttctc  cccctcgc  tcta ctcgc  ggcttccc  aggttctccc  cctcgtctc
961  ta ctcgc  cctcaccag  gttctcccc  tcccgtcta  ccccgggcc  ccaggttc
1021  tctccccctg  gcgctctact  ccgcagccct  gtggccgag  acacgctccc  ggggtcccc
1081  gccccccgcc  ccca cgggtc  tcccagacc  ctgagggctg  ccccgagggg  tcagctctgg
1141  ccccgcaagg  ccca agcaca  gctgaggggc  agaccgggg  aa agcggga  ccatgctga c
1201  cctgcgcct  cgcagaagc  ccgcgggct  ccgga aagg  ctgacgggg  ccgga cgt
1261  ggagctgggt  gtccccagg  gtgcctgtg  tgcgggaca  gggcga ccg  ctaccactc
1321  aa cgtcctga  cgtgtgagg  atgcaagggc  ttttccagga  gaac cgtga  acgcaacacg
1381  cggctgagg  gcccttccg  ga agggcacc  tgcgaaatca  cgagga agac  ccggcgacag
1441  tgccagccct  gccgctccg  ca agtgctg  gaga cggca  tgaa ga agga  gatgatcatg
1501  tccgacgcg  ctgtggagca  gagcgggct  ctgacccga  ggaa aa agcg  agaa cggatg
1561  ggcgctgcg  cgtgggagc  ca aggggctg  agtgaggagc  agcaga cga  gatccgagag
1621  ctgagtgatg  cccagatgaa  aa cctttgac  acca cctct  ccaa ctcca  ggatttccgg
1681  ctgcggccg  cgtgcagcag  cgggcgagc  gtcccaggag  cggcgcaca  tccagtgggg
1741  gaggaagctg  ccaagtggag  ccaggtcagg  gaggatctgt  gctcgtgaa  ggtgtgctg
1801  cggctgcgcg  gggagga cgg  cagcgtccag  aa ctacaca  ccca ggccga  ccgcagcggc
1861  gccgagatct  ttccctgct  gccccacatg  gctgacatgt  ccactacat  gttcaaggc
1921  gtcatacaact  ttgcaaaagt  catctcccac  ttcagggaat  tgccca tca  ggaccagatc
1981  tgcgtgctaa  agggggccac  ctccgaggtg  tgcagctga  ggttca acac  ggtgttcaac
2041  gcagagaccg  gaacctggga  gtgtggccgg  ctgtcctact  gcctggaaga  ccctgcaggc
2101  ggcttccagc  agcttctcct  ggagccaagt  ctga agttcc  acta caggct  gaagagctg
2161  cagctgcata  aggagga gta  tgtgctgatg  caggccatct  ctctttctc  cccagaccgc
2221  ccaggtgtgg  tgcagcgca  cgtggtgga  cagctgcagg  agagat ttgc  catccgctg
2281  aaaggcctaca  tcgagtgcaa  tcggccgca  cctgcccacc  ggttcctgt  cctgaaagtc
2341  atggcca tgc  tcaccgagct  tcgcagatc  aatgcccagc  acaccagaa  gctgctgcgc
2401  atccaggaca  ta cccccct  ccagcccc  ctca tgcagg  agctgtcag  ca tcaaggac
2461  ggtcga

```





## LIITE 4: AGE-OHJE

### AGE-geelin teko ja ajaminen

\*iso geeli n.150 ml, pieni n.50 ml

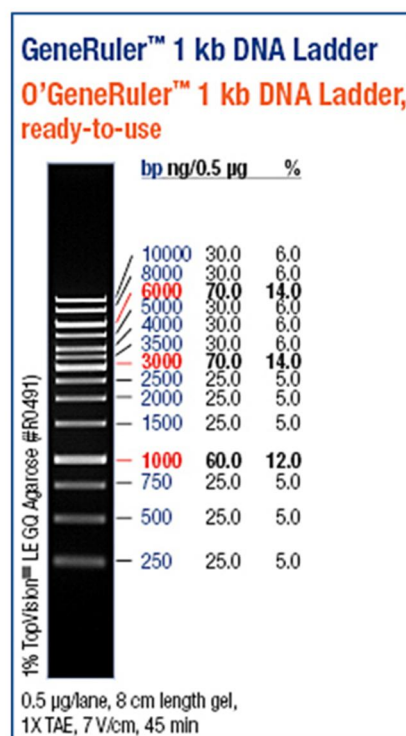
- Punnitse agarooosi ja liuota 1X TAE-puskuriin. (Esim.1 % geeli: 250 ml →2,5 g agaria)
- Liuota agar lämmittämällä sitä mikrossa kunnes neste on kirkasta. Älä sulje korkkia kokonaan, muuten paine voi kasvaa liian suureksi. Anna jäähtyä n. 60-asteiseksi.
- Teippaa kelkan reunat umpeen ja kaada agarooosi siihen. Aseta näytekampa paikoilleen ja poista mahdolliset ilmakuplat esim. pipetin kärjellä.
- Anna jähmettyä noin 30 min ja poista näytekampa.
- Laita kelkka ajolaitteistoon ja kaada 1X TAE-puskuria sen verran, että geeli peittyy kokonaan.
- Pipetoi molekyylimarkkeri ja näytteet näytekoloihin.
- Kytke johdot virtalähteeseen (punainen + ja musta -), laita kansi paikoilleen ja säädä haluttu jännite (esim.iso geeli 210 V, ~2 h. pieni geeli 80 V,~1 h )

|                            |      |
|----------------------------|------|
| MW                         |      |
| Gene Ruler 1 kb DNA ladder | 9 µl |
| SYBR green                 | 4 µl |

pipetoi 10 µl

|                               |       |
|-------------------------------|-------|
| näyte                         | 14 µl |
| 5X BPB                        | 4 µl  |
| SYBR green <sub>(1:100)</sub> | 2 µl  |

pipetoi 15 µl



[http://www.thermoscientificbio.com/uploadedImages/Products/DNA\\_Electrophoresis/DNA\\_Ladders/sm031\\_fam.jpg](http://www.thermoscientificbio.com/uploadedImages/Products/DNA_Electrophoresis/DNA_Ladders/sm031_fam.jpg)

### Kuvaaminen

- Tarkista alustavasti UV-valossa.
- Quantity One-ohjelmisto: File -> Gel Doc

Paina TRANS UV-päälle

Säädä kuva teräväksi

→Freeze

→Save

File ->Export to TIFF

SYBRgreen laimennetaan 99 % DMSO:hon, VALOSUOJAUS

## LIITE 5: KÄÄNTEISTRANSFEKTIOLEVYJEN VALMISTAMINEN

### Käänteistransfektiolevyjen valmistus

- Plasmidit ja PEI-25 sulatettiin sekä laimettiin.
- DNA/PEI-kompleksi muodostettiin lisäämällä DNA PEI-laimennoksen joukkoon tippa kerrallaan samalla vorteksoiden.
- Kompleksin annettiin muodostua 20 min ajan, jonka jälkeen lisättiin 2 % sakkaroosi (lisätään 1:1 eli lopullinen pitoisuus on 1 %).
- Kompleksiliuosta pipetoitiin 100 µl/kuoppa 48-kuoppalevyille.
- Valmiit levyt jäädytettiin kuivajäällä välittömästi ja erän valmistuttua ne vietiin kylmäkuivaimeen noin 24 tunniksi.
- Levyt säilytettiin eksikaattorissa +4 °C:ssa.

|     |                | pitoisuus | ng/kuoppa | µl/kuoppa |
|-----|----------------|-----------|-----------|-----------|
| 1.) | pCMVbeta       | 200 ng/µl | 600       | 3         |
|     | luc            | 200 ng/µl | 500       | 2,5       |
|     | tumareseptori  | 100 ng/µl | 100       | 1         |
|     | vesi           |           |           | 18,5      |
|     |                |           |           | 25        |
| 2.) | PEI            | 0,9 mg/ml |           | 2,0196    |
|     | vesi           |           |           | 22,9804   |
|     |                |           |           | 25        |
| 3.) | 2 % sakkaroosi |           |           | 50        |
|     |                |           | yht.      | 100       |

## LIITE 6: LUC- JA ONPG-MITTAUKSEN TEKEMINEN

### Solujen jakaminen ja transfektio (1.päivä)

- Solut pestään 4 ml PBS:ää.
- Solut irrotetaan pohjasta 2 ml TE-puskuria, inkuboidaan muutama minuutti 37 °C:ssa ja tarkistetaan irtoaminen mikroskoopilla.
- Solut pipetoidaan putkeen, jossa ne voidaan sentrifugoida pohjalle.
- Sentrifugoidaan (1200 x g, 3 min ja +22 °C).
- TE-puskuri imetään pois päältä ja solut suspensoidaan mediumiin (2 ml/pullo)
- Eppendorfputkeen pipetoidaan 100 µl mediumia ja 10 µl soluja, lisätään 100 µl erytrosiini B-väriainetta ja sekoitetaan hyvin. Väriaineen annetaan inkuboitua noin 5 min ajan.
- Pipetoidaan n. 10 µl värjättyä näytettä Bürkerin solulaskentakammioon ja lasketaan solut viidestä A-ruudusta. Lasketaan keskiarvo, jonka perusteella tehdään sopiva laimennos (200 000 solua/ml eli 100 000 solua/kuoppa).

Solut kaadetaan pipetointikaukalo, josta ne pipetoidaan levyille monikanavapipetillä. Levyjä sekoitellaan kevyesti, jotta mahdollisimman suuri osa DNA:ta transfektoituisi soluihin. Solujen tasainen jakaantuminen levyille tarkistetaan mikroskoopilla ja solut laitetaan inkubaattoriin noin vuorokaudeksi.

### Kemikaalialtistus (2.päivä)

- Valmistetaan medium, jossa on 5 % lipidöntä seerumia ja jaetaan se omiin putkiin kullekin kemikaalille. Kemikaalit on laimennettu mM-pitoisuuksiksi ja niitä lisätään 1 µl/1 ml mediumia, jolloin lopullinen pitoisuus on µM.
- Kuopista imetään medium pois ja lisätään 500 µl kemikaalit sisältävää mediumia
- Soluja inkuboidaan noin vuorokausi.

### Solujen hajotus (3.päivä)

- Lyysipuskuriin lisätään juuri ennen käyttöä PMSF (10 µl/1 ml lyysipuskuria) ja DTT (1 µl/1 ml lyysipuskuria) ja se laitetaan jäälle.
- Solut otetaan inkubaattorista, niiden kunto tarkistetaan mikroskooppisesti ja ne laitetaan jäälle.
- Kuopista imetään medium pois ja pipetoidaan 150 µl lyysipuskuria/kuoppa, käsitellään yksi levy kerrallaan.
- Levyt kiedotaan parafilmiin ja niitä taputellaan kevyesti solujen irtoamisen tehostamiseksi. Levyt pakastetaan -80 °C:een noin vuorokaudeksi.

### Mittaus (4.päivä)

- Solut ja reagenssit sulatetaan kädenlämpöisessä vedessä. β-gal-liuos (sis. ONPG) laimennetaan 1:1 milliQ-vedellä.
- Mittauslaitteen (Victor<sup>2</sup>) pumppu huuhdotaan ja täytetään luc-reagenssilla.
- Sulaneet solut siirretään jäälle ja 20 µl solulysaattia pipetoidaan kirkkaille (ONPG) ja valkeille (luc) 96-kuoppalevyille.
- Luc-levyt mitataan LUC-MINI-ohjelmalla ja ONPG-levyille pipetoidaan 100 µl 1 X β-gal-liuosta/kuoppa.
- ONPG-levyjä inkuboidaan, kunnes ne saavuttavat halutun keltaisen värin (n. 30–60 min). Reaktio pysäytetään 50 µl:lla STOP-liuosta ja absorbanssit mitataan ONPG-ohjelmalla.
- Mittauksen päätyttyä pumppu tyhjennetään ja huuhdotaan vedellä.

LIITE 7: TULOSTEN LASKEMINEN

| Well | Receptor | Reporter | Chemical | Conc | LUC_count     |                     |          | Absorbance       |                     |                            | normalized LUC | average  |
|------|----------|----------|----------|------|---------------|---------------------|----------|------------------|---------------------|----------------------------|----------------|----------|
|      |          |          |          |      | s_per_s (CPS) | LUC-blank (average) | G*50*60  | @ 405 (1.0s) (A) | ABS-blank (average) | J*1000*50/incub time (min) |                |          |
| A01  | A1 tyhjä | REP1     | DMSO     |      | 77            | -9                  | -25600   | 0,048            | -0,039              | -10,69860732               | 2392,834809    |          |
| A02  | A1 tyhjä | REP1     | DMSO     |      | 3046          | 2960                | 8880800  | 0,409            | 0,323               | 89,66811062                | 99040,78427    |          |
| A03  | A1 tyhjä | REP1     | DMSO     |      | 2270          | 2185                | 6554600  | 0,397            | 0,310               | 86,09623896                | 76131,084      |          |
| A04  | A1 tyhjä | REP1     | DMSO     |      | 2368          | 2282                | 6846200  | 0,401            | 0,315               | 87,44294805                | 78293,33471    | 84488,4  |
| A05  | C1 tyhjä | REP3     | DMSO     |      | 1145          | 1059                | 3177200  | 0,291            | 0,204               | 56,72194575                | 56013,59329    |          |
| A06  | C1 tyhjä | RER3     | DMSO     |      | 3481          | 3396                | 10187600 | 0,526            | 0,440               | 122,1119079                | 83428,39103    |          |
| A07  | C1 tyhjä | REP3     | DMSO     |      | 4896          | 4811                | 14432600 | 0,578            | 0,491               | 136,3843774                | 105822,9709    |          |
| A08  | C1 tyhjä | REP3     | DMSO     |      | 1224          | 1139                | 3416000  | 0,457            | 0,370               | 102,8862081                | 33201,72901    | 69616,67 |
| B01  | A2 CAR   | REP1     | DMSO     |      | 79            | -7                  | -19600   | 0,047            | -0,040              | -11,05056028               | 1773,665723    |          |
| B02  | A2 CAR   | REP1     | DMSO     |      | 2411          | 2326                | 6977000  | 0,315            | 0,228               | 63,41620246                | 110019,2022    |          |
| B03  | A2 CAR   | REP1     | DMSO     |      | 1689          | 1603                | 4809200  | 0,264            | 0,177               | 49,30173512                | 97546,26258    |          |
| B04  | A2 CAR   | REP1     | DMSO     |      | 1353          | 1267                | 3801200  | 0,282            | 0,195               | 54,15284473                | 70193,91168    | 92586,46 |
| B05  | C2 CAR   | REP3     | DMSO     |      | 1117          | 1031                | 3093200  | 0,289            | 0,202               | 56,17522528                | 55063,41959    |          |
| B06  | C2 CAR   | RER3     | DMSO     |      | 2913          | 2827                | 8482400  | 0,508            | 0,421               | 117,0149563                | 72489,87883    |          |
| B07  | C2 CAR   | REP3     | DMSO     |      | 3818          | 3732                | 11196800 | 0,409            | 0,322               | 89,46241137                | 125156,4744    |          |
| B08  | C2 CAR   | REP3     | DMSO     |      | 1885          | 1799                | 5398400  | 0,302            | 0,216               | 59,92868666                | 90080,3989     | 95908,92 |
| C01  | A3 PXR   | REP1     | SR1218   | 10   | 103           | 17                  | 51800    | 0,048            | -0,039              | -10,84405431               | -4776,811192   |          |
| C02  | A3 PXR   | REP1     | SR1218   | 10   | 3492          | 3406                | 10219400 | 0,394            | 0,308               | 85,49912832                | 119526,3648    |          |
| C03  | A3 PXR   | REP1     | SR1218   | 10   | 3773          | 3688                | 11063000 | 0,473            | 0,387               | 107,4491031                | 102960,3755    |          |
| C04  | A3 PXR   | REP1     | SR1218   | 10   | 864           | 779                 | 2336600  | 0,210            | 0,124               | 34,31734507                | 68088,01775    | 96858,25 |
| C05  | C3 PXR   | REP3     | SR1218   | 10   | 812           | 726                 | 2179400  | 0,212            | 0,126               | 34,96770779                | 62326,07563    |          |
| C06  | C3 PXR   | RER3     | SR1218   | 10   | 2377          | 2292                | 6875600  | 0,378            | 0,291               | 80,88403269                | 85005,6528     |          |
| C07  | C3 PXR   | REP3     | SR1218   | 10   | 1720          | 1634                | 4902200  | 0,263            | 0,177               | 49,05668749                | 99929,29101    |          |
| C08  | C3 PXR   | REP3     | SR1218   | 10   | 1718          | 1632                | 4897400  | 0,263            | 0,177               | 49,11416922                | 99714,60533    | 86743,91 |
| D01  | B1 tyhjä | PBREM    | DMSO     |      | 100           | 14                  | 43400    | 0,048            | -0,039              | -10,73043884               | -4044,568974   |          |
| D02  | B1 tyhjä | PBREM    | DMSO     |      | 4093          | 4007                | 12021800 | 0,524            | 0,438               | 121,5593288                | 98896,5645     |          |
| D03  | B1 tyhjä | PBREM    | DMSO     |      | 1971          | 1885                | 5655200  | 0,351            | 0,265               | 73,54552097                | 76893,8737     |          |
| D04  | B1 tyhjä | PBREM    | DMSO     |      | 11077         | 10991               | 32973200 | 0,902            | 0,815               | 226,4420588                | 145614,2917    | 87895,22 |
| D05  | D1 tyhjä | XREM     | DMSO     |      | 2210          | 2125                | 6374600  | 0,407            | 0,320               | 88,97514691                | 71644,72576    |          |
| D06  | D1 tyhjä | XREM     | DMSO     |      | 4074          | 3988                | 11964200 | 0,678            | 0,591               | 164,3034799                | 72817,6908     |          |
| D07  | D1 tyhjä | XREM     | DMSO     |      | 12138         | 12053               | 36158000 | 0,513            | 0,426               | 118,3118754                | 305615,9823    |          |
| D08  | D1 tyhjä | XREM     | DMSO     |      | 1771          | 1686                | 5057600  | 0,252            | 0,166               | 46,05670373                | 109812,4614    | 84758,29 |
| E01  | B2 CAR   | PBREM    | DMSO     |      | 133           | 47                  | 141800   | 0,050            | -0,036              | -10,13882112               | -13985,8469    |          |
| E02  | B2 CAR   | PBREM    | DMSO     |      | 2833          | 2747                | 8241800  | 0,426            | 0,339               | 94,25633988                | 87440,27203    |          |
| E03  | B2 CAR   | PBREM    | DMSO     |      | 572           | 487                 | 1460600  | 0,149            | 0,063               | 17,42223427                | 83835,40121    |          |
| E04  | B2 CAR   | PBREM    | DMSO     |      | 10785         | 10700               | 32099000 | 0,921            | 0,834               | 231,7291995                | 138519,4445    | 103265   |
| E05  | D2 CAR   | XREM     | DMSO     |      | 2360          | 2275                | 6824600  | 0,409            | 0,322               | 89,43528943                | 76307,68619    |          |
| E06  | D2 CAR   | XREM     | DMSO     |      | 6487          | 6401                | 19203200 | 0,667            | 0,581               | 161,2650679                | 119078,4852    |          |
| E07  | D2 CAR   | XREM     | DMSO     |      | 8510          | 8424                | 25272200 | 0,410            | 0,324               | 89,97155623                | 280890,9955    |          |
| E08  | D2 CAR   | XREM     | DMSO     |      | 2614          | 2528                | 7585400  | 0,337            | 0,250               | 69,41928225                | 109269,3522    | 101551,8 |
| F01  | B3 PXR   | PBREM    | SR1218   |      | 128           | 42                  | 126800   | 0,056            | -0,031              | -8,546069283               | -14837,23052   |          |
| F02  | B3 PXR   | PBREM    | SR1218   |      | 5850          | 5765                | 17294600 | 0,795            | 0,708               | 196,7452603                | 87903,51529    |          |
| F03  | B3 PXR   | PBREM    | SR1218   |      | 4396          | 4310                | 12930800 | 0,645            | 0,559               | 155,1655621                | 83335,50196    |          |
| F04  | B3 PXR   | PBREM    | SR1218   |      | 9696          | 9610                | 28830200 | 0,880            | 0,794               | 220,5236738                | 130735,1701    | 100658,1 |
| F05  | D3 PXR   | XREM     | SR1218   |      | 4353          | 4267                | 12802400 | 0,682            | 0,595               | 165,2813628                | 77458,21903    |          |
| F06  | D3 PXR   | XREM     | SR1218   |      | 4196          | 4111                | 12332600 | 0,608            | 0,521               | 144,7407039                | 85204,78116    |          |
| F07  | D3 PXR   | XREM     | SR1218   |      | 2971          | 2885                | 8655200  | 0,216            | 0,129               | 35,8407942                 | 241490,1844    |          |
| F08  | D3 PXR   | XREM     | SR1218   |      | 2473          | 2387                | 7161200  | 0,347            | 0,261               | 72,44967898                | 98843,7782     | 87168,93 |
| G01  | BLANK    | BLANK    |          |      | 84            | 86                  |          | 0,089            | 0,087               |                            |                |          |
| G02  | BLANK    | BLANK    |          |      | 88            |                     |          | 0,086            |                     |                            |                |          |
| G03  | BLANK    | BLANK    |          |      | 85            |                     |          | 0,084            |                     |                            |                |          |