

Opinnäytetyö (AMK)  
Bioanalytiikan koulutusohjelma  
Solu- ja molekyylibiologia  
Kevät 2014

Anni-Mari Tuori

# MIKRO-RNA:T LUUTA MUODOSTAVAN SOLUN SÄÄTELYSSÄ



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU  
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Anni-Mari Tuori

## MIKRO-RNA:T LUUTA MUODOSTAVAN SOLUN SÄÄTELYSSÄ

Luuytimen mesenkymaaliset strooman solut ovat monikykyisiä soluja, jotka erilaistuvat mesodermin sukuperäissoluiksi; osteoblasteiksi eli luunemosoluiksi, kondrosyyteiksi eli rustosoluiksi ja adiposyyteiksi eli rasvasoluiksi. Mikro-RNA:t ovat pieniä, ei koodaavia RNA:ita, jotka ovat mukana useissa solujen toiminnoissa kuten kasvussa ja erilaistumisessa. Viime vuosina on löydetty mikro-RNA:ita, jotka ovat mukana mesenkymaalisen strooman solun erilaistumisessa luuta muodostavaksi osteoblastiksi. Mikro-RNA:t voivat tulevaisuudessa olla oiva työkalu luuta muodostavien solujen säätelyssä esimerkiksi ortopedian käytötarkoituksiin.

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli tutkia mikro-RNA:n säätelyn vaikutusta geenimuunnellun hiiren mesenkymaalisen strooman solun erilaistumisessa luuta muodostavaksi soluksi eli osteoblastiksi. Tämän tutkimuksen tavoitteena oli selvittää onko mikro-RNA:n inaktivoinnilla vaikutusta geenimuunnellun hiiren mesenkymaalisen strooman solun erilaistuessa osteoblastiksi. Tutkimuksessa käytettiin kahden eri geenimuunnellun hiirikannan (cre+ ja cre-) luuytimestä eristettyjä mesenkymaalisen strooman soluja. Geenimuokkausten lopputuloksena mikro-RNA:n tuotto voitiin lopettaa toisen hiirilinjan (cre+) luutamuodostavissa soluissa tamoksifeenin avulla. Tamoksifeeni on estrogeenitoimintaa moduloiva rintasyövän hoidossa käytettävä lääkeaine. Sille on kehitetty geenimuunneltu muoto. Luuydinsoluja viljeltiin soluviljelylaboratoriossa tamoksifeenin vaikutuksen alaisena ja ilman tamoksifeenin vaikutusta. Solujen viabiliteettia havainnoitiin mikroskoopilla sekä erilaisin värjäyksin ja mittauksin.

Tuloksissa tamoksifeenin vaikutuksen alla olleet naarashiirten solut erilaistuivat huomattavasti nopeammin kuin naarashiirten solut, joille ei annosteltu tamoksifeenia. Tämä osoitettiin myös ALP-proteiinimittauksessa, jossa huomattiin, että tamoksifeenin vaikutuksen alla olleet naarashiirten solut erittivät erilaistumiseen vaadittavia proteiineja huomattavasti aikaisemmin kuin solut, joille ei oltu annosteltu tamoksifeenia. Toisten kasvatuksien uroshiirten solujen kohdalla ei samanlaista huomattavaa eroa nähty. Tutkimus kuitenkin osoitti, että mikro-RNA:n inaktivoinnilla tamoksifeenin avulla saattaa olla vaikutusta osterix positiivisen (cre+) solun erilaistumisessa luuta muodostavaksi soluksi. Vaikutus saattaa olla nopeampaa naarashiiristä eristetyillä soluilla kuin uroshiirten soluilla.

### ASIASANAT:

Mesenkymaalisen strooman solu, tamoksifeeni, mikro-RNA, osteoblasti, soluviljely, geenimuunneltu hiiri

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Degree programme in Biomedical Laboratory Science | Cell and molecular biology

May 2014 | 47+5

Instructors: Nina Johansson, Jorma Määttä

Anni-Mari Tuori

## MICRORNAs IN REGULATION OF BONE FORMATION CELLS

Mesenchymal stromal cells that reside within the bone marrow stroma are multipotent cells that are capable of differentiating into mesoderm-lineage cells; osteoblasts i.e. bone-forming cell, chondrocytes alias cartilage cells and adipocytes alias fat cells. MicroRNAs are small, noncoding RNAs that are involved in many cell functions e.g. growth and differentiation. In recent years there have been discovered microRNAs that regulate the differentiation of mesenchymal stromal cell into bone formation osteoblast. In future microRNAs can be a useful tool for regulation of bone formation cells e.g. in use of orthopedics.

The purpose of this study was to investigate the effects of microRNAs regulation on gene modified mouse's mesenchymal stromal cell differentiation to bone formation cell, osteoblast. The aim of this study was to sort out if the inactivation of microRNA has effect on gene modified mouse's mesenchymal stromal cell differentiation to osteoblast. In this study was used mesenchymal stromal cells that were isolated from two different kinds of gene modified mouse model (cre+ and cre-) bone marrows. Final result of the gene modification was that production of microRNAs could be terminated with tamoxifen in other mouse model's (cre+) bone formation cells. Tamoxifen is a drug that modulates estrogen function and it is used in breast cancer treatment. It has been developed into a gene modified form. The bone marrow cells were cultured in cell culture laboratory within tamoxifen and without the effect of tamoxifen. The cell viability was observed with microscope and with different kinds of stainings and assays.

The results showed that the female mouse cells that were under the effect of tamoxifen differentiated considerably faster than the female mouse cells which didn't have tamoxifen. This was proved also in ALP protein assays in which were discovered that the female mouse cells that were under the effect of tamoxifen secreted the proteins that are needed in differentiation much earlier than cells that didn't have tamoxifen. In other cultured cells that were isolated from male mice was not seen same considerable difference. However the study proved that the inactivation of microRNAs with tamoxifen may have effect on osterix positive (cre+) cell differentiation to bone formation cell. The effect may be faster on cells that are isolated from female mouse than male mouse.

### KEYWORDS:

Mesenchymal stromal cell, tamoxifen, microRNA, osteoblast, cell culture, gene modified mouse

# SISÄLTÖ

|  |           |
|--|-----------|
| <b>KÄYTETYT LYHENTEET (L) JA SANASTO</b>           | <b>6</b>  |
| <b>1 JOHDANTO</b>                                  | <b>8</b>  |
| <b>2 TUTKIMUKSEN TEOREETTINEN TAUSTA</b>           | <b>9</b>  |
| 2.1 Tutkimuksen keskeiset teoreettiset käsitteet   | 9         |
| 2.1.1 Mesenkymaaliset strooman solut               | 9         |
| 2.1.2 Osteoblasti                                  | 9         |
| 2.1.3 Mikro-RNA                                    | 11        |
| 2.1.4 Tamoksifeeni                                 | 12        |
| 2.1.5 Cre-lox rekombinaatio                        | 12        |
| 2.1.6 Dicer  | 13        |
| 2.1.7 Geenimuunneltu hiirikanta                    | 13        |
| 2.2 Menetelmäteoria                                | 14        |
| 2.2.1 Soluviljely                                  | 14        |
| 2.2.2 Deksametasoni                                | 14        |
| 2.2.3 ALP  | 15        |
| 2.2.4 Von Kossa värjäys                            | 15        |
| 2.2.5 Oil red värjäys                              | 16        |
| <b>3 TUTKIMUKSEN TARKOITUS JA TAVOITE</b>          | <b>17</b> |
| <b>4 TUTKIMUKSEN KÄYTÄNNÖN TOTEUTUS</b>            | <b>18</b> |
| 4.1 Metodologiset ratkaisut                        | 18        |
| 4.2 Eettisten näkökohtien tarkastelu               | 19        |
| 4.3 Tutkimuksen kokeellinen osuus                  | 20        |
| 4.3.1 Luuydinsolujen eristys ja viljely            | 21        |
| 4.3.2 Solujen jako kuoppalevyille                  | 23        |
| 4.3.3 Mittaukset ja värjäykset                     | 26        |
| <b>5 TUTKIMUKSEN TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU</b> | <b>28</b> |
| <b>6 POHDINNAT</b>                                 | <b>40</b> |
| 6.1 Tutkimuksen yleinen pohdinta                   | 40        |
| 6.2 Tutkimustulosten pohdinta                      | 40        |

|                              |    |
|------------------------------|----|
| 6.3 Tutkimuksen onnistuminen | 43 |
| 6.4 Jatkotutkimusaiheet      | 43 |

|                |           |
|----------------|-----------|
| <b>LÄHTEET</b> | <b>44</b> |
|----------------|-----------|

## LIITTEET

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| Liite 1. Toimeksiantosopimus    |  |
| Liite 2. Mediumit ja reagenssit |  |
| Liite 3. Bradford standardit    |  |

## KUVAT

|  |    |
|--|----|
| Kuva 1. Osteoblastin erilaistuminen: multipotentti kantasolu, mesenkymaalinen kantasolu, osteoprogenitor-solu, preosteoblasti, kypsä osteoblasti ja pintasolu tai osteosyytti (Eijken 2007). | 10 |
| Kuva 2. Hiiren jalan luut latinaksi (The Anatomy of the Laboratory Mouse 1965).  | 21 |
| Kuva 3. 1. kasvatus, pullo 1 ennen mediumin vaihtoa.   | 23 |
| Kuva 4. 1. kasvatus, pullo 1 mediumin vaihdon jälkeen.   | 23 |
| Kuva 5. 6-kuoppalevy, pleittauskaavio.   | 24 |
| Kuva 6. 24-kuoppalevy, pleittauskaavio.  | 24 |
| Kuva 7. 1. kasvatus, Dicer-osx, urokset, cre+, d1, T+ (tamoksifeeni).  | 29 |
| Kuva 8. 1. kasvatus, Dicer-osx, urokset, cre+, d15, T- (ei tamoksifeenia).   | 29 |
| Kuva 9. 1. kasvatus, Dicer-osx, urokset, cre+, d15, T+.  | 30 |
| Kuva 10. 1. kasvatus, Dicer-osx, urokset, cre+, d15, T+.   | 31 |
| Kuva 11. 1.kasvatus, Dicer-osx, urokset, cre +, d24, T-.   | 31 |
| Kuva 12. 2. kasvatus, Dicer-osx, naaraat, cre+ d9, T+  | 32 |
| Kuva 13. 2. kasvatus, Dicer-osx, naaraat, cre +, d15, T+   | 32 |
| Kuva 14. 2. kasvatus, Dicer-osx, naaraat, cre+, d9, T-   | 33 |
| Kuva 15. 2. kasvatus, Dicer-osx, naaraat, cre+, d15, T-  | 34 |
| Kuva 16. 2. kasvatus, Dicer-osx, naaraat, cre+, d8, T+   | 34 |
| Kuva 17. 2. kasvatus, Dicer-osx, naaraat, cre+, d15, T+, von Kossa värjäys.  | 37 |
| Kuva 18. 3. kasvatus, Dicer-osx, urokset, cre-, d10, T+ ALP-värjäys.   | 38 |
| Kuva 19. 1.kasvatus, Dicer-osx, urokset, cre+, d24, T- adiposyyttejä.  | 39 |

## TAULUKOT

|  |    |
|--|----|
| Taulukko 1. Kaikkien kasvatuksien kuoppalevyjen lopetuspäivät ja mittaukset. | 25 |
| Taulukko 2. 2.kasvatus, Dicer-osx, cre+ (naarashiiret), T+/T-, ALP-mittaus.  | 35 |
| Taulukko 3. 3. kasvatus, Dicer-osx, cre- (uroshiiret), T+/T-, ALP-mittaus.   | 36 |
| Taulukko 4. 3. kasvatus, Dicer.osx, cre+(uroshiiret), T+/T-, ALP-mittaus.    | 37 |

## KÄYTETYT LYHENTEET (L) JA SANASTO

|                 |   |
|-----------------|---|
| Mikro-RNA       | Pieni, ei koodaava RNA, joka toimii välittäjänä pilkkoen ja/tai estäen tietyn kohdegeenin translaation (Harfe 2005).                                      |
| Mesenkymaalinen |   |
| strooman solu   | Monikykyisiä soluja, jotka erilaistuvat osteoblasteiksi, kondrosyyteiksi ja adiposyyteiksi (Laine ym. 2012).  |
| Osteoblasti     | Luuta muodostava solu, joka valmistaa luun soluväliainetta ja tyypin 1 kollageenia (Eijken 2007).   |
| Tamoksifeeni    | Hormonaalinen lääkeaine rintasyövän hoidossa, joka moduloi estrogeenireseptoria (American Cancer Society 2013).   |
| Osterix         | Transkriptiotekijä, joka on välttämätön osteoblastien erilaistumisessa ja luun muodostuksessa (Cao ym. 2005).   |
| DNA             | L sanasta deoksiribonukleiinihappo. Nukleiinihappo, joka sisältää solujen geneettisen materiaalin. (Heino ja Vuento 2010.)                                |
| RNA             | L sanasta ribonukleiinihappo. Nukleotideistä koostuva polymeeri, joka eroaa DNA:sta sokeriosasta, deoksiriboosin tilalla riboosi. (Heino ja Vuento 2010.) |
| Introni         | Ei koodaava jakso DNA:ssa (Heino ja Vuento 2010).   |
| Strooma         | Tukeva sidekudosverkko (Terveyskirjasto 2014d).   |
| Rekombinaatio   | Geenien uudelleenryhmittäminen (Finnish bioindustries 2014).  |
| Geeni           | Perinnöllistä ominaisuutta ohjaava DNA-jakso, joka sisältää tiedon valkuaisaineen tai RNA-molekyylin valmistamiseksi (Finnish bioindustries 2014).        |
| Osteoklasti     | Luunsyöjäsolu, joka hävittää luukudosta (Terveyskirjasto 2014c).  |
| Homeostaasi     | Elimistön sisäinen tasapaino (Terveyskirjasto 2014b).   |
| ESRT-cre        | L muodostettu sanoista domeeni, joka sitoo tietynlaisen tamoksifeenia sitovan estrogeenireseptorin. Muodostettu geenitekniikan avulla. (Maes ym. 2007.)   |
| Fuusioproteiini | Valkuaisaine, jossa on kaksi proteiinia tai niiden osat on yhdistetty geenitekniikan avulla yhdeksi proteiiniksi (Finnish bioindustries 2014).            |

|                 |   |
|-----------------|---|
| GM              | L sanasta geneettinen muuntelu (genetic modification). Organismin, kuten kasvin tai eläimen geenejä on muunneltu bioteknologian avulla. (CSIRO 2011.) |
| Glukokortikoidi | Hiilihydraattiaineenvaihduntaan vaikuttava lisämunuaiskuoren steroidihormoni (esim. kortisoli) (Terveyskirjasto 2014a).                               |
| Apoptoosi       | Ohjelmoitu solukuolema (Solunetti 2006a).   |

# 1 JOHDANTO

Mesenkymaaliset strooman solut ovat olleet tutkimusten kohteena jo 1970-luvulta lähtien. Niiden moninainen kykynsä erilaistua ja lisääntyä soluviljelmillä, tekee niistä mielenkiintoisen tutkimuskohteen kliinisille kokeille. Yhdistämällä mesenkymaalisia strooman soluja erilaisilla biomateriaaleilla, voi se olla mahdollinen sovellutus esimerkiksi ortopedian käyttötarkoituksiin. Tällöin tulevaisuudessa mesenkymaalisia strooman soluja voitaisiin käyttää muun muassa luun- ja ruston korjauksiin esimerkiksi niveltulehduksissa ja luunmurtumissa. (Heino & Hentunen 2008.)

Mikro-RNA:t löydettiin vuonna 1993. Tämän jälkeen yli tuhat ihmisen mikro-RNA:ta on tuotu esille mutta niiden biologiset toiminnot ovat edelleen suurilta osin tuntemattomia. Kehittyvät tutkimukset ovat osoittaneet mikro-RNA:lla olevan huomattava rooli mesenkymaalisten strooman solujen erilaistumisessa. Tällöin mikro-RNA:lle tehtävät tutkimukset tarjoavat varteenotettavan mahdollisuuden mesenkymaalisten strooman solujen tutkimusten kehityksessä. (Laine ym. 2012.)

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli tutkia mikro-RNA:n säätelyn vaikutusta geenimuunnellun hiiren mesenkymaalisen strooman solun erilaistumisessa osteoplastiksi. Tässä tutkimuksessa oli erityisen tarkastelun kohteena vaihe, jossa osterix-transkriptotekijää ilmentävät osteoplastiprogenitor-solut aloittavat lopullisen erilaistumisen aktiiviseksi luukudosta tuottavaksi osteoplastiksi.

Opinnäytetyöni tavoitteena oli tutustua kantasolu/progenitori-solu tyyppisten kasvatusten tekoon ja solujen erilaistamiseen in vitro. Tavoitteena oli myös selvittää, onko solun sisäisen mikro-RNA:n inaktivointi tamoksifeenilla merkityksellistä osteoplastiprogenitorin erilaistuessa osteoplastiksi.



## 2 TUTKIMUKSEN TEOREETTINEN TAUSTA

### 2.1 Tutkimuksen keskeiset teoreettiset käsitteet

#### 2.1.1 Mesenkymaaliset strooman solut

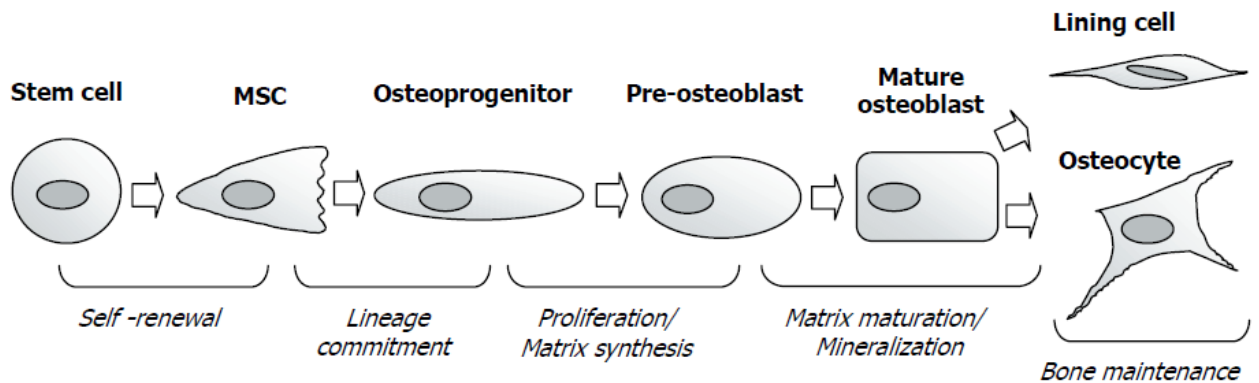
Luuytimen mesenkymaaliset strooman solut ovat monikykyisiä soluja, jotka erilaistuvat mesodermin sukuperäissoluiksi; osteoblasteiksi eli luunemosoluiksi, kondrosyyteiksi eli rustosoluiksi ja adiposyyteiksi eli rasvasoluiksi. On myös tutkinnan alla, että ne pystyisivät erilaistumaan hermoston, maksan tai lihaksen soluiksi. (Warwick ym. 2012; Neagu ym. 2005.)

Mesenkymaaliset strooman solut sijaitsevat pääasiassa luuytimen erilaistumattomassa sidekudoksessa, stroomassa, lähellä hematopoieettisia kantasoluja. Mesenkymaalisia strooman soluja voidaan myös löytää lähes kaikista muista kudoksista, jotka ylläpitävät homeostaasia. Nykyään esimerkiksi ihmisen rasvakudoksesta voidaan myös eristää mesenkymaalisia strooman soluja. (Eijken 2007.) Riippuen transkriptionaalisista tekijöistä ja solunsisäisistä viestintäreiteistä kuten viestimolekyyleistä ja reseptoriproteiineista, mesenkymaaliset strooman solut pystyvät erilaistumaan ja tätä kautta muodostamaan luuta. Tämä tekee niistä oivallisen työkalun lääketieteelle luun uudelleenrakentamisessa. (Solunetti 2006b; Heino & Hentunen 2008; Abdallah & Kassem 2011.)

#### 2.1.2 Osteoblasti

Oikeissa olosuhteissa mesenkymaaliset strooman solut erilaistuvat ensin osteoprogenitor-soluiksi, sitten preosteoblasteiksi ja tämän jälkeen osteoblasteiksi. Osteoblastien erilaistuessa ne muodostavat luuta kolmessa eri vaiheessa: solujen lisääntymisvaihe, matriksin kypsymisvaihe ja mineralisaatiovaihe (Kuva 1.). Osteoblastit muodostavat luumassaa tuottamalla kalsiumilla ja fosfaatilla rikastettua tyypin 1 kollageenia. Tämä kollageeni

muodostaa rakennusaineita ja lopulta luun soluväliainetta; matriksia ja näin kehittyvää uutta luukudosta, osteoidia. (Parra-Torres ym. 2013; Maes ym. 2007; Promocell 2008.)



Kuva 1. Osteoblastin erilaistuminen: multipotentti kantasolu, mesenkymaalinen kantasolu, osteoprogenitor-solu, preosteoblasti, kypsä osteoblasti ja pintasolu tai osteosyytti (Eijken 2007).

Kuvassa 1. näkyy osteoblastien erilaistumisen vaiheet. Ensiksi pre-osteoblastit muodostavat mineralisoimatonta osteoidia, joka koostuu pääasiassa tyypin 1 kollageenista. Kollageeni tuo luulle rakenteellista voimaa ja joustavuutta ja sen lisäksi se toimii pohjana mineralisaatiokerrostumalle. Osteoidin valmistumisen jälkeen pre-osteoblastit alkavat muodostaa solukalvojensa reunoille rakkuloita eli vesikkeleitä, joissa on korkea kalsiumin ja alkaalisen fosfaatin pitoisuus. Tämä mahdollistaa hydroksiapatiittikristalli ( $\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6[\text{OH}]_2$ ) sijoittamisen osteoidiin. Tästä alkaa ensimmäisten mineraalikiteiden valmistus kollageenisäikeiden luomaan, jonka valmiiksi kypsyneet osteoblastit tekevät. Mineralisaation valmistus on monimutkainen prosessi, jota ohjaavat monet tekijät kuten kalsium ja fosfaattipitoisuudet sekä osteoidin koostumus. (Eijken 2007.)

Osteoblastit voivat ottaa paikkansa valmistuneessa soluväliaineessa, jolloin niitä kutsutaan osteosyyteiksi. Toiset osteoblastit kypsyvät luun pintasoluiksi tukemaan soluväliainetta. (Parra-Torres ym. 2013; Bjälle ym. 1998.) Loput osteoblastit kuolevat pois apoptoottisesti, jotka ovat noin 50-70 % kaikista

osteoblasteista yhteensä (Lynch ym. 1998). Osteosyytit ja pintasoluiksi erilaistuvat osteoblastit muodostavat yhdessä ohuen verkoston, joka on merkittävä luun kyvyllä vastaanottaa mekaanista voimaa ja korjata vammoja (U.S. Department of Health and Human Services 2004).

Osteoblastisoluviljelmillä mineralisaation tuotanto näkyy luunoduleiden muodostumisena, jotka ovat luuntapaisia muodostelmia. Tämä antaa tärkeää tietoa kypsyneistä osteoblasteista ja viljelmien viabiliteetista. (Wang 2006.)

### 2.1.3 Mikro-RNA

Mikro-RNA:t ovat pieniä, noin 22 nukleotidiä pitkiä, ei koodaavia RNA:ita. Niiden toiminta perustuu niiden kykyyn tukahduttaa tietyn transkriptin 3'-pää sitomalla se itseensä tai aukaisemalla lähetti-RNA:n geneettisen informaation. Tällöin ne toimivat välittäjinä pilkkoen ja/tai estäen tietyn kohdegeenin translaation. (Laine ym. 2012; Baglio ym. 2013.)

Mikro-RNA:t löydettiin ensimmäisenä sukkulamadosta (*Caenorhabditis elegans*). Sen jälkeen sitä on löydetty suurien selkärankaisten, kuten hiiren ja ihmisten geenistöistä. Mikro-RNA:itten sekvenssit ovat hyvin konservoituneita, sillä lähes 90% ihmisen sekvensoiduista mikro-RNA:ista ovat identtisiä hiiren ja rotan kanssa. (Harfe ym. 2005 & Lakshminpathy ym. 2007.) Mikro-RNA:ita sijaitsee kaikkialla genomissa, geenien introneissa ja eksoneissa sekä geenien välisellä alueella. Ihmisen mikro-RNA:iden arvellaan kontrolloivan yli 60 % :a kaikista proteiinia koodaavista geeneistä. Mikro-RNA:t ovat tekemisissä useissa biologisissa toiminnoissa, kuten solun kehityksessä, erilaistumisessa, metaboliassa, kasvussa, lisääntymisessä ja apoptoosissa. (Moore ym. 2010.)

Tutkijaryhmät keskittyvät jatkuvasti mikro-RNA:itten vaikutukseen luun erilaistuessa ja muodostuessa. Viime vuosina on löydetty kolme mikro-RNA:ta (miR-138, miR-204, ja miR-20a), jotka säätelevät osteoblastien erilaistumista signaloimalla osteoblastigeenejä. (Wang 2013.) Mikro-RNA:t ovat lupaava työkalu tieteelle mesenkymaalisten strooman solujen erilaistumisen säätelyssä, luuta muodostaviksi soluiksi (Baglio ym. 2013).

#### 2.1.4 Tamoksifeeni

Tamoksifeeni on hormonaalinen lääkeaine, jota käytetään muun muassa rintasyövän hoidossa. Tamoksifeeni on selektiivinen estrogeenireseptoria moduloiva aine. Se estää estrogeenin toiminnan soluissa sitomalla itsensä estrogeenireseptoriin. Tällöin luonnollinen estrogeeni ei pääse sitoutumaan kohteeseensa, joka estää solunsisäisten jakautumis- ja kasvuviestien kulun. (American Cancer Society 2013.)

Rinnan syöpäsoluissa tamoksifeeni estää estrogeenin toiminnan niin, että solut, jotka tarvitsevat toimiakseen estrogeeniä kuolevat. Luustossa tamoksifeenilla on todettu olevan suojaava vaikutus. Se aiheuttaa apoptoosia preosteoklasteilla ja samalla edesauttaa osteoblastien kasvua. Tämä on kuitenkin pystytty todistamaan vain menopaussin ohittaneilla naisilla, joilla estrogeenin tuotanto on alentunut. (Vehmanen ym. 2006.)

Tässä tutkimuksessa tamoksifeenia hyödynnettiin cre-lox rekombinaatiotekniikassa. Tamoksifeenille on geenitekniikassa kehitetty estrogeenireseptorin mutanttimuoto, joka sitoo vain tamoksifeenia. Fuusioproteiinina cre rekombinaasin kanssa tämä mutanttiestrogeenireseptori mahdollistaa konditionaalisesti induoitavan geenirekombinaation.

#### 2.1.5 Cre-lox rekombinaatio

Cre-lox rekombinaatio on paikkakohtaisessa rekombinaatiossa käytettävä tekniikka. Se koostuu yhdestä cre rekombinaasi entsyymistä, joka uudelleenyhdistää parin lox kohdesekvenssejä (loxP). Järjestelmän avulla saadaan aikaan tietyn DNA:n kohdan poistoja, lisäyksiä ja kromosomien uudelleenjärjestelyä eli translokaatiota. Cre-lox rekombinaation avulla DNA:n muutos voidaan kohdentaa tiettyyn solutyypin tai saadaan aikaan ulkoisen ärsyksen avulla. Tämä mahdollistaa DNA:ssa geenien tukahduttamisen, aktivoinnin tai niiden vaihtamisen täysin toiseen geeniin. Rekombinaatio on toteutettu eukaryoottisissa ja prokaryoottisissa soluissa. (Turan ym. 2011.)

### 2.1.6 Dicer

Dicer on RNAasi III entsyymi, joka antaa ohjeita proteiinien tekoon DNA:ssa. Nämä proteiinit säätelevät muiden geenien ilmentymistä. Dicer on välttämätön mikro-RNA:n tuotannossa, sillä ne pilkkovat mikro-RNA:n esiasteisia molekyylejä. Dicerilla on keskeinen asema monessa fysiologisessa prosessissa, kuten alkion kehityksessä, solun kasvussa ja mikro-RNA:n kypsymisessä. (Kawase-Koga ym. 2010; Gaur ym. 2010.)

### 2.1.7 Geenimuunneltu hiirikanta

Tämän tutkimuksen solut eristettiin geenimuunnelluista hiirikannoista. Geenimuunneltu eli GM-hiirikanta oli muodostettu risteyttämällä kaksi hiirtä (Bendre 2013, ei julkaistu). Tässä tutkimuksessa käytetyllä toisella hiirellä oli Dicer-geeniä muokattu kahteen geenin introniin. Näihin introneihin oli liitettyä loxP-tunnistuskohdat. Toinen risteytyksessä ollut hiiri kantoi genomissaan ylimääräistä osterix-promoottoria (olennainen transkriptionaalinen tekijä osteoblastin erilaistumisessa (Cao ym. 2005).), jonka ohjaamana tuotetaan ESRT-Cre –fuusioproteiinia. (Harfe ym. 2005; Maes ym. 2007.)

Kun nämä kaksi hiirtä risteytettiin, cre rekombinaatioentsyymi tunnisti loxP-tunnistuskohdat ja poisti näiden välisen DNA jakson genomisesta DNA:sta. Kun risteytetyn hiiren mesenkymaaliselle strooman solulle annosteltiin tamoksifeenia, inaktivoitui dicerin tuotanto niissä osteoblastiprogenitor-soluissa, jotka ilmensivät osterixia ja tuottivat ESRT-Cre-fuusioproteiinia. Tämä hiljensi kaiken mikro-RNA:n tuoton. (Harfe ym. 2005; Maes ym. 2007.)

## 2.2 Menetelmäteoria

### 2.2.1 Soluviljely

Kun eläinten tai kasvien solut poistetaan kudoksistaan, voivat ne jatkaa kasvuaan sopivalla alustalla, asiamukaisten ravinteiden ylläpitämänä. Suoritettua toimenpidettä kutsutaan soluviljelyksi. Viljely mahdollistaa laboratorio-olosuhteissa yksittäisen solun toiminnan omana yksikkönään. Solut jakaantuvat ja kasvavat kokoaan kasvatusalustoilla niin kauan, kunnes jokin rajoittava tekijä, esimerkiksi ravinteiden loppuminen estää kasvun. (SCQ 2006.)

Solut tarvitsevat kasvaakseen tarkasti säädellyn ympäristön. Tällöin ravintoaineiden, lämpötilan ja pH-arvon täytyy olla säädettyjä. Soluja voidaan kasvattaa suspensiossa tai kiinteällä kasvualustalla. Suspensiossa pystytään kasvattamaan suuria solumääriä, mutta esimerkiksi jotkut eläinsolulinjat eivät pysty kasvamaan irrallaan alustasta. Tällaisia solulinjoja kasvatetaan pulloissa, maljoilla tai kuoppalevyillä, joissa solut ovat peitettynä kasvatusliuoksella eli mediumilla. (Solunetti 2006c.)

Soluviljelyn avulla voidaan tutkia erilaisten solujen fysiologisia ja biokemiallisia tapahtumia. Soluille voidaan myös annostella kemiallisia yhdisteitä tai lääkkeitä, jolloin testataan niiden vaikutusta solun kasvun kannalta. Suurin etu soluviljelmissä on, että samoja viljelmiä voidaan toistaa. Kuitenkaan toistaminen ei aina onnistu halutulla tavalla, koska solujen ominaisuudet voivat muuttua eri populaatioiden välillä. (SCQ 2006.)

### 2.2.2 Deksametasoni

Deksametasoni (lyhenne dexa) on synteettinen glukokortikoidi, josta on tutkittu olevan apua osteoblastien erillaistumisessa. Deksametasoni edesauttaa soluviljelyn alussa osteoblasti progenitorsolujen erilaistumista vähentämällä solujen lisääntymistä. Sillä on myös näyttöä luunmuodostuksen

(mineralisaation) ja ALP aktiivisuuden lisäämisessä. (Beloti & Rosa 2005.) Deksametasonia käytettiin tämän tutkimuksen soluviljelyvaiheessa.

### 2.2.3 ALP

Alkalinen fosfataasi (eng. alkaline phosphate, ALP) on metalliosan sisältämä isoentsyymi. ALP:lla on tärkeä rooli kovakudosten, kuten luun muodostuksessa. ALP sitoutuu osteoblastien solukalvojen vesikkeleihin ja sitä käytetään yleisesti merkkiaineena osteogeenisessä erilaistumisessa. ALP:n suurin ilmentyminen tapahtuu luun matriksin kypsymisvaiheessa ja mineralisaation tapahtumisen jälkeen ALP:n määrä vähenee. ALP aktiivisuutta mitataan, että voidaan tarkastella erilaistuvatko solut. (Golub & Boesze-Battaglia 2007; Eijken 2007.) ALP-aktiivisuus voidaan osoittaa myös ALP-värjäyksellä, jossa väriaine sitoutuu alkaaliseen fosfataasi entsyymiin ja värjää solut purppuran värisiksi (Kotti 2011).

ALP:n spesifinen aktiivisuus saadaan laskettua ALP aktiivisuuden ja Bradfordin kokonaisproteiini mittauksella. Bradfordin menetelmässä mitataan absorbansin muutoksia väriaineen sitoutuessa näytteen proteiineihin. Mittauksen yhteydessä käytetään proteiinistandardeja, joilla on tiedettävästi lineaarinen absorbanssi. (Applichem 2014.)

### 2.2.4 Von Kossa värjäys

Von Kossa värjäystä käytetään osteoblastien muodostaman mineralisaation(kalkkeutuminen) ilmentämisessä. Von Kossa värjäys perustuu hopea ionien sitoutumiseen kalsiumsuolojen anioneihin. Hopeasuolat vähenevät kemiallisen valon alla muodostaen tumman ruskean tai mustan, metallisen värjäyksen luunoduleihin. (Wang ym. 2006.)

### 2.2.5 Oil red värjäys

Oil-Red värjäyksen periaatteena on näytteen triglyseridien ja rasvojen osoitus. Värjäyksessä käytetään öljypohjaisia väriaineita, jotka sitoutuvat rasvasoluihin paremmin kuin normaalit alkoholipohjaiset väriaineet. (IHCWorld 2011.)



### 3 TUTKIMUKSEN TARKOITUS JA TAVOITE

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli tutkia mikro-RNA:n säätelyn vaikutusta geenimuunnellun hiiren mesenkymaalisen strooman solun erilaistumisessa luuta muodostavaksi soluksi eli osteoblastiksi. Tässä tutkimuksessa oli erityisen tarkastelun kohteena vaihe, jossa osterix-transkriptiotekijää ilmentävät osteoblastiprogenitor-solut aloittavat lopullisen erilaistumisen aktiiviseksi luukudosta tuottavaksi osteoblastiksi.

Työn opetuksellisena tavoitteena oli tutustua kantasolu/progenitori-solutyypisten kasvatusten tekoon soluviljelemällä. Tutkimuksellisena tavoitteena oli selvittää onko solun sisäisen mikro-RNA:n inaktivointi tamoksifeenillä merkityksellistä osteoblastiprogenitorin erilaistuessa osteoblastiksi.

Tutkimustehtävät:

1. Kahden eri geenimuunnellun hiirikannan luuytimeistä eristettiin kantasoluja. Hiiret joko ilmensivät (Cre+) tai eivät ilmentäneet ESRT-Cre fuusioproteiinia osterix-transkriptiotekijää ilmentävissä soluissa. Hiirten geneettinen tausta oli sama.
2. Soluja viljeltiin soluviljelylaboratoriossa tamoksifeenin alaisena ja ilman tamoksifeenia 3-24 päivää, jona aikana solujen viabiliteettia havainnoitiin mikroskoopilla ja työpäiväkirjaa täyttäen.
3. Solunäytteille tehtiin erilaisia mittauksia ja värjäyksiä, joiden tuloksia vertailtiin eri hiirikantojen välillä.

## 4 TUTKIMUKSEN KÄYTÄNNÖN TOTEUTUS

Tutkimuksen käytännön osuus suoritettiin lokakuun 2013 ja joulukuun 2013 välisenä aikana Turun yliopistolla, Biolääketieteen laitoksella, Solubiologian ja anatomian osastolla. Tutkimuksen ohjaajina toimi Turun yliopistolla dosentti-Jorma Määttä ja FM- Päivi Tervola. Tutkimuksen ohjaajana Turun ammattikorkeakoulusta toimi Nina Johansson. Tutkimukselle tehtiin toimeksiantosopimus (liite 1.) Turun yliopiston kanssa. Tutkimuksen aineistona käytettiin Turun yliopiston, Solubiologian ja anatomian osaston koe-eläinhiiristä kerättyjä luuydinsoluja. Soluja viljeltiin soluviljelylaboratoriossa ja niiden kasvua tarkasteltiin mikroskoopilla, värjäyksillä ja mittauksilla.

### 4.1 Metodologiset ratkaisut

Kvantitatiivinen eli määrällinen tutkimus perustuu aiemmalle tiedolle. Siinä on keskeistä aiempien johtopäätösten ja teorioiden esittäminen, sekä tätä kautta tutkittavan ilmiön sijoittaminen teoriasuuntaukseen. Käsitteet, jotka koskevat työtä, tulee määrittää. Ennen tutkimuksen alkua suunnitellaan koejärjestelyt ja sen aineiston keruu. Kvantitatiivisesta tutkimuksesta kootaan päätelmät, jotka havainnollistetaan tilastollisesti analysoiden. (Hirsjärvi ym. 2000.)

Kvalitatiivinen eli laadullinen tutkimus tutkii uutta tietoa. Tutkimus koostuu kokonaisvaltaisesta tiedon hankinnasta ja aineisto kootaan todellisissa tilanteissa. Laadullisessa tutkimuksessa suositaan ihmistä tiedon hankkijana. Tutkija luottaa omiin havaintoihinsa ja hänen pyrkimyksenä on paljastaa odottamattomia seikkoja tutkimuksen aikana. Laadullisessa tutkimuksessa valitaan kohdejoukko tarkoituksenmukaisesti. Tutkimusta käsitellään ainutlaatuisena. (Hirsjärvi ym. 2009.)

Tämä opinnäytetyö koostuu kvantitatiivisesta ja kvalitatiivisesta tutkimuksesta. Tutkimusaiheeseen liittyy aiempia aiheita koskevia tutkimuksia ja uusia lähtökohtia. Työssä tehtävä tutkimus perustuu osittain aiemmalle teorialle.

Uutena lähtökohtana on mikro-RNA:n merkitys osteoblastien erilaistumisen loppuvaiheessa.

#### 4.2 Eettisten näkökohtien tarkastelu

Eettiset ongelmat tässä opinnäytetyössä painottuivat koe-eläinten käyttöön. Tutkimuksen tekijälle opetettiin toimintatavat koe-eläinkeskuksessa ja oikeanlainen koe-eläinten käsittely. Tutkimuksen tekijä osallistui hiirten preparointiin tutkijan kanssa, joka oli pätevä työskentelemään koe-eläinten kanssa. Tutkimuksen aikana aiheutettiin mahdollisimman vähän haittaa koe-eläinhiiriä kohtaan.

Eläinkokeiden tekeminen on laissa säädettyä ja luvanvaraista toimintaa. Näin varmistetaan, että eläimiä käytetään tutkimuksiin vain tärkeistä ja tarpeellisista syistä. Säädökset koskevat koe-eläimiä tuottavia, säilyttäviä ja eläinkokeita suorittavia laitoksia. (KEK 2014; KEK 2009.) Eläimiä käytetään tieteellisiin tai opetustarkoituksiin mahdollisimman vähäinen määrä ja eläimille voi aiheutua vain neulanpistoon verrattavissa olevaa kipua, tuskaa tai pysyvää haittaa, joka on suoritettu eläinlääkintäkäytännön mukaisesti (Laki tieteellisiin tai opetustarkoituksiin käytettävien eläinten suojelusta 497/2013).

Koe-eläimet, joiden perimää on muokattu keinotekoisesti, ovat eläinsuojeluviranomaisen lisäksi myös geenitekniikkalautakunnan valvonnassa (KEK 2014). Geenitekniikalla muunnetulla organismilla tarkoitetaan organismia, jonka perintöainesta on muunnettu tavalla, joka ei toteudu luonnossa pariumin tuloksena tai luonnollisena yhdistelmänä (Geenitekniikkalaki 377/1995).

Eläinkokeita saa tehdä ainoastaan viranomaisten hyväksymissä ja valvomissa toimitiloissa sekä niitä saavat suorittaa ainoastaan siihen koulutuksen saaneet henkilöt (KEK 2014). Viranomaiset keräävät vuosittain tiedot kaikista eläimistä lajeittain, joita on käytetty tutkimustarpeisiin (KEK 2009). Turun yliopiston koe-eläinkeskus noudattaa viranomaisten laatupolitiikkaa ja on läpäissyt GLP- eli Good Laboratory Practice –tarkastuksen vuonna 2013 (KEK 2013).

Tutkimuksen luotettavuus tarkoittaa sitä, että tutkimuksessa käytetty informaatio on perusteltu kriittisesti ja tutkija on rehellinen (Karjalainen ym. 2002). Luotettavuus tarkoittaa myös tulosten tarkkuutta ja mittaustulosten toistettavuutta. Hyvän tieteellisen käytännön noudattaminen tarkoittaa, että tutkimustekstin tulee säilyttää tieteelliseen tutkimukseen liittyvä perusluonteensa. Määrällisessä tutkimuksessa käytetään vakioitua, tutkimuksen luonteeseen sopivaa tapaa raportoida ja laadullisessa tutkimusmenetelmässä rakenne on vapaampi. (Vilkkä 2005.)

Opinnäytetyön tekijän osuus tutkimuksen käytännön toteutuksessa oli suuri, minkä hän koki edukseen. Tutkija lopetti hiiret ja preparoi hiirten luut opinnäytetyön tekijän kanssa. Opinnäytetyön tekijä sai toimia soluviljelyssä itsenäisesti tutkijan huolellisen perehdytyksen jälkeen. Tämä vähensi mahdollisia virhelähteitä, koska tekijä pysyi samana. Kuitenkin työn ollessa käsityötä, oli virheiden mahdollisuus aina olemassa. Opinnäytetyön tekijä merkitsi koko työprosessin kulun työpäiväkirjaan. Päiväkirja lisäsi työn luotettavuutta, koska sieltä voitiin aina tarkistaa, että mitä oltiin tehty.

#### 4.3 Tutkimuksen kokeellinen osuus

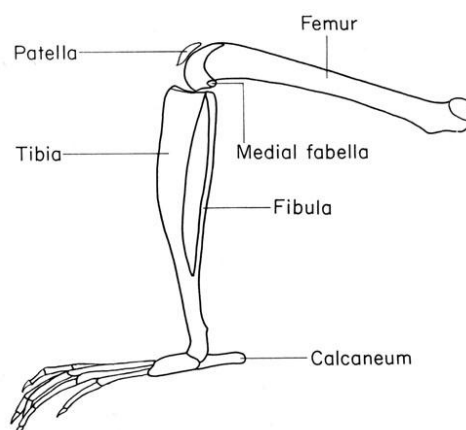
Tutkimusta varten kerättiin yhteensä kymmenen hiiren reisi(femur) –ja sääriluusta(tibia) luuydinsoluja, joita kasvatettiin soluviljelylaboratoriossa. Hiiret olivat kahdesta eri kannasta ja tehtiin kolmessa eri kasvatuksessa. Ensimmäisessä kasvatuksessa oli kaksi, 3 kuukautta 6 päivää vanhaa uroshiirtä (Dicer fl/fl; osx-ESRTcre+). Toisessa kasvatuksessa neljä, 4 viikkoa vanhaa naarashiirtä (Dicer fl/fl; osx-ESRTcre+). Kolmannessa kasvatuksessa oli kaksi, 1 kuukausi 15 päivää vanhaa uroshiirtä (Dicer fl/fl; osx-ESRTcre+) ja toiset, yhtä vanhat uroshiiret eri kannasta (Dicer fl/fl; osx-ESRTcre-).

Soluja kasvatettiin 3-21 päivää niille sopivissa kasvatusliuoksissa eli mediuumeissa, tamoksifeenin vaikutuksen alaisena ja ilman tamoksifeenin vaikutusta kuoppalevyillä. Soluviljelyn onnistuessa ne jakaantuvat ja erilaistuvat viljelmillä 21 päivään mennessä. Solujen viabiliteettia tarkasteltiin

havainnoimalla mikroskoopilla ja ottamalla kuvia mikroskooppikameralla (Nikon digital sight, DS-L2). ALP-aktiivisuutta mitattiin proteiinimäärityksin. Mineralisaatioiden muodostuminen varmistettiin von kossa värjäyksin. Soluille tehtiin myös ALP-värjäyksiä ja oil-red värjäystä. Suunniteltuja DNA ja RNA mittauksia ei tehty tutkimuksen aikana, sillä laboratoriollla ei ollut käytössä näytteille optimoitua PCR:ää, joten solunäytteet jäivät odottamaan pakkaseen näitä mittauksia.

#### 4.3.1 Luuydinsolujen eristys ja viljely

Hiiret lopetettiin ja preparoitiin koe-eläinkeskuksen tiloissa. Hiirien femurit ja tibiaat (kuva 2.) preparoitiin steriloiduilla työvälineillä (sakset, pinsetit, skapelli). Työskentelyn aikana välineitä puhdistettiin absoluuttisella etanolilla. Femur irroitettiin lantion kohdalta, tibia jalkaterästä ja lopuksi luut irroitettiin toisistaan polven kohdalta. Tibiasta katkaistiin irti fibula. Pehmytkudos poistettiin mahdollisimman hyvin luiden ympäriltä skapellin kanssa.



Kuva 2. Hiiren jalan luut latinaksi (The Anatomy of the Laboratory Mouse 1965).

Preparoidut luut kuljetettiin soluviljelylaboratorioon fosfaatilla puskuroidussa, fysiologisessa suolaliuksessa, PBS (eng. phosphate-buffered saline). Seuraavat työvaiheet suoritettiin steriilisti laminaarikaapissa. Tibiat ja femurit huuhdeltiin nopeasti 70 %:ssa etanolissa, jonka jälkeen ne siirrettiin petrimaljalle, jossa oli PBS-liuosta. PBS-liuksessa poistettiin luiden ympäriltä

vielä pehmytkudosriekaleita, jonka jälkeen luut siirrettiin normaaliin mediumiin (liite 2.).

Luiden päät leikattiin pois, että luuydinosiso saatiin näkyville. Luuydin ruiskutettiin 10 ml ruiskulla ja 25 G:n neulan avulla 50 ml sentrifuugiputkeen(falcon). Ruiskuun otettiin ensin mediumia ja sitten ruiskutettiin se luun sisäosan läpi. Näin luuydin huuhtoutui pois luun sisältä. Falcon putkessa oleva solu- ja mediumseos suspensoitiin huolella käyttämällä 5 ml pipettiä. Soluja sentrifugoitiin 8 minuuttia 1000 rpm, jonka jälkeen erottunut supernatantti poistettiin imulla. Putkeen lisättiin tarkalleen 3 ml mediumia ja suspensoitiin huolella. Suspensiota pipetoitiin 10 µl eppendorf-putkeen, johon lisättiin 90 µl etikkahappoa solulaskua varten.

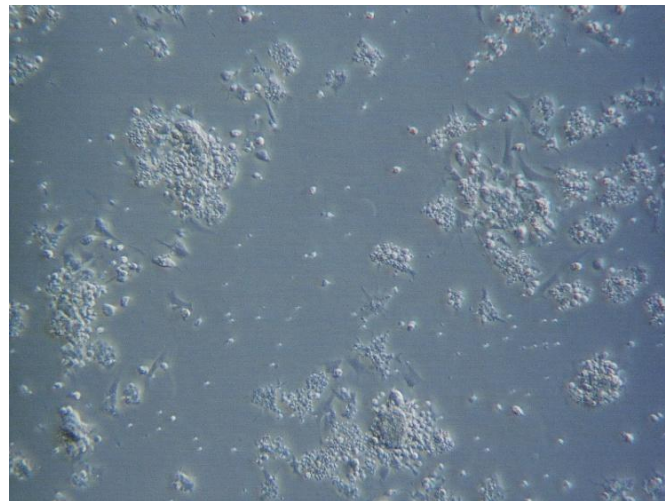
Solut laskettiin Bürkerin laskukammiossa. Solut laskettiin niin, että tiedettiin kuinka paljon 1 ml suspensiota sisältää soluja. Hiiren solut viljeltiin T25-pulloihin, joihin oli määritelty tulevan 5 ml suspensiota, joka sisältää  $25 \times 10^6$  solua. Näiden tietojen perusteella laskettiin kuinka paljon 2-3 ml:aan suspensiota lisättiin mediumia ja dexaa (10 ml mediumia kohti 1 µl dexaa), että saataisiin viljelypulloihin oikea määrä soluja 5 ml:ssa. Jokaisen kasvatuksen kohdalla tuli pulloihin saman verran soluja. 1. kasvatuksesta saatiin  $20,8 \times 10^6$  solua/ml ja T25-pulloja viljeltiin kaksi. 2. kasvatuksesta saatiin  $27,8 \times 10^6$  solua/ml ja T25-pulloja viljeltiin kolme. 3. kasvatuksen cre+ hiiristä  $38,5 \times 10^6$  solua/ml ja T25-pulloja viljeltiin kolme sekä cre- hiiristä  $43,5 \times 10^6$  solua/ml ja T25-pulloja viljeltiin kolme.

Viljelytulos tarkistettiin mikroskoopin alla ja pullot laitettiin kahdeksi vuorokaudeksi lämpökaappiin. Kantasolut kiinnittyivät pullojen pohjaan tässä ajassa, jonka jälkeen mediumit vaihdettiin. Ensin soluja tarkasteltiin mikroskoopin alla (kuva 3.). Jokaista pulloa vartentehtiin 5 ml normaalia mediumia, johon lisättiin 0,5 µl dexaa. Mediumien vaihto tapahtui steriilisti laminaarikaapissa. Ensin poistettiin vanha medium imulla ja tehtiin PBS-pesu pipetoimalla pulloille kaksi kertaa. Uusi medium lisättiin tilalle varovasti. Kuolleet solut huuhtoutuivat pois vaihdoin yhteydessä. Solujen viabiliteetti tarkistettiin

mikroskoopilla (kuva 4.). Solujen annettiin kasvaa vielä 5 vuorokautta lämpökaapissa ennen pleittausta.



Kuva 3. 1. kasvatus, pullo 1 ennen mediumin vaihtoa.



Kuva 4. 1. kasvatus, pullo 1 mediumin vaihdon jälkeen.

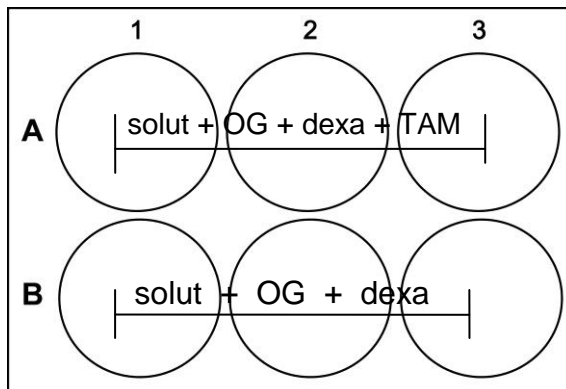
#### 4.3.2 Solujen jako kuoppalevyille

Työvaiheet suoritettiin laminaarikaapissa. Aluksi pullo tyhjennettiin imulla mediumista ja pestiin kaksi kertaa n. 5 ml PBS:ää. PBS imettiin pois ja pulloon laitettiin +37°C trypsiiniä n. 1 ml. Trypsiinin annettiin vaikuttaa 5-7 minuuttia, jonka aikana varmistettiin solujen irtoaminen pullon pohjasta mikroskoopin alla. Pulloon lisättiin n. 2 ml normaalia mediumia ja solut rapsutettiin lastan avulla irti pullon pohjasta. Solut siirrettiin falcon-pulloon pipetillä. Pulloja huuhdeltiin vielä mediumilla ja tarkastettiin mikroskoopilla, että kaikki solut oltiin saatu talteen pullosta.

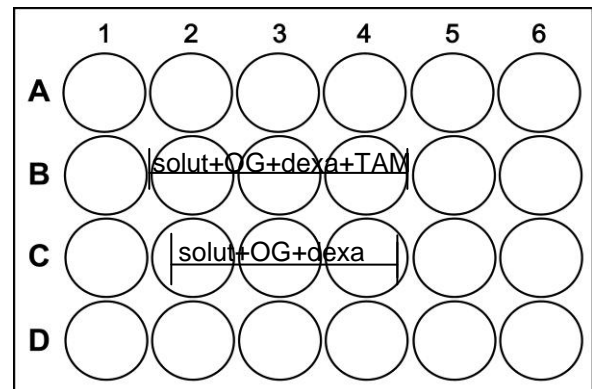
Falcon-pulloon saatu solususpensio sentrifugoitiin 5 minuuttia 800 rpm, jonka jälkeen supernatantti poistettiin imulla. Solupelletin päälle lisättiin tarkalleen 1 ml osteogeenistä mediumia (osteogenic medium, OG) (liite 2.) ilman dexaa ja suspensioitiin liuos homogeeniseksi pipetillä. Eppendorf-putkeen otettiin 10 µl suspensiota, johon lisättiin 40 µl trypan blueta. Solut laskettiin Bürkerin

laskukammiossa. Trypan blue värjää kuolleet solut tumman sinisiksi ja elävät vaalean sinisiksi. Solujen määrä laskettiin yhdessä millilitrassa. 1. kasvatuksen soluja oli 750 000 solua/ml, 2. kasvatuksen soluja  $2,49 \times 10^6$  solua/ml ja 3. kasvatuksen cre + soluja 340 000 solua/ml sekä cre- soluja  $2,47 \times 10^6$  solua/ml.

Työstä vastaava oli antanut ohjeet pleittaamisesta, jonka mukaan jokaisen kasvatuksen kohdalla päätettiin kuinka monta kuoppalevyä (eng. well plate, wp) viljeltiin. Solujen määrän mukaan laskettiin kuoppalevyjen määrä. 6-kuoppalevyn (kuva 5.) yhdelle kuopalle tuli saada 40 000 solua/kuoppa ja 24-kuoppalevylle (kuva 6.) 10 000 solua/kuoppa. Jokaisen kasvatuksen kohdalla tehtiin verrokkinäytteet tamoksifeenin vaikutuksella (TAM+) ja ilman tamoksifeenia (TAM-). Soluja viljeltiin kuopille 3 rinnakkain (triplikaatti) tai kaksi rinnakkain (duplikaatti). Yksi kuoppalevy vastasi aina yhtä aikapistettä (esim d3 = day 3 = 3. kasvatuspäivä), jolloin kuoppalevyn solut lopetettaisiin mittauksia varten (esim ALP).



Kuva 5. 6-kuoppalevy, pleittauskaavio.



Kuva 6. 24-kuoppalevy, pleittauskaavio.

1. kasvatukselta tehtiin kolme 6-kuoppalevyä duplikaattina ja kolme 24-kuoppalevyä triplikaattina. 2. kasvatukselta tehtiin seitsemän 6-kuoppalevyä triplikaattina ja 15 kappaletta 24-kuoppalevyä triplikaattina. 3. kasvatukselta cre+ :sta tehtiin kuusi 24-kuoppalevyä triplikaattina ja cre-:sta yhdeksän 6-kuoppalevyä triplikaattina ja kuusi 24-kuoppalevyä triplikaattina. Kuten kuvissa 5. ja 6. on nähtävissä, jokaiselle kuopalle pipetoitiin aina solut, osteogeeninen medium(OG) ja dexta. Tamoksifeeni lisättiin ylärivin soluille. Kuoppalevyille



vaihdettiin 3-4 päivän välein osteogeeniset mediumit ja tamoksifeenit. Dexaa ei lisätty ensimmäisten kolmen päivän jälkeen. Solut kasvoivat lämpökaapissa ja ne otettiin sieltä pois vain mediumin vaihtoa, lopetusta tai mikroskoopilla katsomista varten. Solujen kasvua tarkasteltiin mikroskoopin alla päivittäin ja taltioitiin kuvin mikroskooppikameralla. Kuopista arvioitiin solumääriä prosentuaalisesti, jotta pystyttiin arvioimaan solunjakautumisvauhtia.

Pleittausohjeet, jotka työstä vastaava ilmoitti, sisälsi myös kasvatuksien lopetuspäivät. Lopetuspäivät valittiin kolmen päivän välein, jotta voitiin seurata solumuutoksia sopivin aikaväleihin. Tähän vaikutti myös kuinka monta kuoppalevyä oltiin saatu pleitattua. Soluviljelyn loppua kohden solujen annettiin kasvaa kauemmin, jotta solut ehtisivät varmuudella erilaistua. Taulukosta 1. näkee eri kantojen lopetuspäivät ja mitä mittauksia varten solut lopetettiin kyseisenä päivänä. Lopetettavat kuoppalevyt valittiin aina kyseisenä päivänä, jolloin parhaiten kasvanut levy otettiin lopetettavaksi. Tällöin heikommin kasvaneet levyt saivat jäädä kasvamaan soluviljelykaappiin. Yleisesti 24-kuoppalevyt olivat ALP:ta varten ja 6-kuoppalevyt RNA:ta, DNA:ta ja von kossa-värjäystä varten. 2. kasvatuksen kohdalla ohjeesta poiketen kuoppalevyjä jaettiin, koska solujen kasvu 24-kuoppalevyillä ei ollut aluksi tarpeeksi hyvää.

Taulukko 1. Kaikkien kasvatuksien kuoppalevyjen lopetuspäivät ja mittaukset.

|            | 1.kasvatus, Dicer-osx cre+, 3kk 6pv, urokset | 2.kasvatus, Dicer-osx cre+, 1kk, naaraat       | 3.kasvatus, Dicer-osx cre+, 1kk 15pv, urokset | 3.kasvatus, Dicer-osx cre-, 1 kk 15 pv, urokset |
|------------|--|--|---|---|
| <b>d3</b>  |  | 24-wp: ALP, 6-wp: RNA                          |   |   |
| <b>d6</b>  |  | 24-wp: ALP, 6-wp: RNA                          | 24-wp: ALP                                    | 24-wp: ALP, 6-wp: RNA+DNA                       |
| <b>d9</b>  | 24-wp: ALP-v, 6-wp: DNA                      | 2x24-wp: RNA, 6-wp: ALP+von kossa              | 24-wp: ALP                                    | 24-wp: ALP, 6-wp: ALP-v, von kossa, 6-wp: RNA   |
| <b>d12</b> |  | 2x24-wp: RNA, 6-wp: ALP+von kossa              | 24-wp: ALP                                    | 24-wp: ALP, 6-wp: RNA, 6-wp: von kossa          |
| <b>d15</b> | 24-wp: ALP-v+oil red, 6-wp: DNA              | 3x24-wp: RNA, 6-wp: ALP+von kossa              | 24-wp: ALP                                    | 24-wp: ALP, 6-wp: RNA, 6-wp: von kossa          |
| <b>d18</b> |  |  |   | 6-wp: von kossa                                 |
| <b>d21</b> |  | 2x24-wp: RNA, 4x24-wp: ALP 6-wp: ALP+von kossa | 24-wp: ALP                                    | 2x24-wp: ALP, 6-wp: RNA                         |
| <b>d24</b> | 24-wp: ALP-v, 6-wp: DNA                      |  |   |   |

### 4.3.3 Mittaukset ja värjäykset

Ennen mittauksia tuli solut lopettaa niille suunniteltuna aikapistepäivänä. Lopetuksia varten levyt vietiin steriilistä soluviljelylaboratoriosta toiseen laboratoriotilaan ja työskentely suoritettiin laminaarikaapissa. Fiksointia käytettiin lopetusmenetelmänä ALP-, von kossa- ja oil red-värjäyksien kohdalla. Fiksoinnissa kuoppien mediumit imettiin pois ja tilalle pipetoitiin 1 % PFA:ta(paraformaldehyde). PFA fiksoi solut n. 15 minuutissa, jonka jälkeen PFA imettiin pois ja soluja huuhdeltiin kolme kertaa PBS:llä. 1 ml PBS:ää jätettiin solujen päälle ja levyt siirrettiin kylmähuoneeseen +4°C.

Lyysausta käytettiin lopetusmenetelmänä DNA, RNA ja ALP-aktiivisuusmittauksiin. DNA:ta varten käytettiin kaupallista lysis puskuria(T1 lysis buffer, Macherey-Nagel, Saksa), jota pipetoitiin 200 µl per kuoppa mediumin poiston jälkeen. RNA:ta varten käytettiin kaupallista lysis puskuri(RA1 lysis buffer, Macherey-Nagel, Saksa), johon lisättiin β-merkaptotetanolia suhteessa 1/100. Valmistettua puskuria pipetoitiin 200 µl per kuoppa mediumin poiston jälkeen. ALP lysis puskuri valmistettiin itse laboratoriossa (liite 2.), jota pipetoitiin 200 µl per kuoppa mediumin poiston jälkeen.

ALP-värjäys tehtiin käyttämällä kaupallista kittiä(Alkaline phosphatase, Leukocyte Kit 86-R, Sigma). MilliQ-vesi lämmitettiin +37°C asteiseksi. FRV(fast red violet) alkaalinen liuos ja natriumnitraattiliuos yhdistettiin ja vortexoitiin 30 sekuntia. Seosta inkuboitiin huoneenlämmössä 2 minuuttia. Seos lisättiin esilämmitettyyn milliQ-veteen ja joukkoon pipetoitiin naftoli AS-BI alkaalinen liuos. Liuos vortexoitiin ja pipetoitiin fiksoitujen solujen päälle. Solujen annettiin inkuboitua pimeässä, huoneenlämmössä 15 minuuttia. Lopuksi solut pestiin kaksi kertaa milliQ-vedellä ja solujen päälle lisättiin 1 ml PBS:ää. Soluja tarkasteltiin mikroskoopilla.

Von Kossa värjäystä varten valmistettiin 2 % hopeanitraattia( $\text{AgNO}_3$ ) ja 2,5 % natriumtiosulfaattia( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) työohjeen mukaan (liite 2.). Värjäys aloitettiin pesemällä fiksoidut solut kerran PBS:llä ja kaksi kertaa milliQ-vedellä. Vesi

poistettiin ja solujen päälle lisättiin hopeanitraattiliuosta. Solujen annettiin inkuboitua 60 minuuttia 60 W lampun alla. Solut pestiin kolme kertaa milliQ-vedellä, niiden päälle lisättiin natriumtiosulfaattia ja inkuboitiin 5 minuuttia huoneenlämmössä. Lopuksi solut pestiin kaksi kertaa milliQ-vedellä ja solujen päälle pipetoitiin 1 ml PBS:ää. Soluja tarkasteltiin mikroskoopilla

Oil red värjäystä varten valmistettiin Oil red O vakioliuos ja työliuos ohjeen mukaan (liite 2.). Värjäys aloitettiin pesemällä solut kerran milliQ-vedellä. Vesi poistettiin ja tilalle pipetoitiin 60 % isopropanolia, joka oli laimennettu milliQ-veteen. Inkuboitiin 2-5 minuuttia huoneenlämmössä. Isopropanoli poistettiin ja solujen päälle pipetoitiin Oil red O työliuosta. Inkuboitiin 5 minuuttia huoneenlämmössä. Solut pestiin varoen milliQ-vedellä kunnes vesi oli kirkasta. Vesi jätettiin solujen päälle mikroskoopilla tarkastelua varten.

Bradford kokonaisproteiini määrittäminen aloitettiin tekemällä standardiliuokset suunnitellun ohjeen mukaan (liite 3.). Standardiliuoksena käytettiin 10mg/ml BSA(bovine serum albumin) kantaliuosta, jota liuotettiin milliQ-veteen yhdeksässä eri suhteessa. Näitä standardiliuoksia pipetoitiin 10µl/kuoppa 96-kuoppalevylle järjestyksessä. Solunäytteet pipetoitiin kolmena rinnakkaisena (10µl/kuoppa) samalla levylle. Levyn jokaiseen kuoppaan pipetoitiin ¼ milliQ-vedellä liuotettua reagenssia(Biorad's protein reagent) 200µl. Kaikki pipetoidut standardit ja näytteet merkattiin työvihkoon. Valmis levy mitattiin Hidex sense microplate reader koneella absorbanssi 595 nm. Tulokset tallennettiin muistitikulle Excel-muodossa.

ALP mittausta varten 96-kuoppalevylle pipetoitiin 15 µl/kuoppa 0,1 M pNPP:ta(p-nitrophenyl phosphate) ja 85 µl/kuoppa 0,1 M mittauspuskuria, joka oli valmistettu ohjeen (liite 2.) mukaan. Samoihin kuoppiin pipetoitiin solunäytteitä kolmena rinnakkaisena 10 µl/kuoppa. Inkuboitiin 30 minuuttia pimeässä, huoneenlämmössä. Kuoppiin pipetoitiin 100 µl/kuoppa 1,0 M NaOH:ia reaktion lopettamiseksi. Mitattiin hidexillä absorbanssi 405 nm ja tulokset otettiin muistitikulle Excel-tiedostona. Bradford- ja ALP-mittauksien tuloksien avulla laskettiin Excelillä ALP:n spesifinen aktiivisuus ja tulokset taulukoitiin.

## 5 TUTKIMUKSEN TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELO

Tässä tutkimuksessa oli tarkoituksena tutustua kantasolu/progenitori-solu tyyppisten soluviljelykasvatusten tekoon. Tarkoituksena oli myös tutkia tamoksifeenilla inaktivoitun mikro-RNA:n vaikutusta geenimuunnellun hiiren mesenkymaalisten strooman solujen erilaistuuessa osteoblastiksi. Tavoitteena oli saada vertailukelpoisia mittaus- ja havainnointituloksia soluilla, joiden erilaistumiseen oli vaikuttanut tamoksifeeni ja soluilla, jotka eivät erilaistuneet tamoksifeenin vaikutuksen alla. Tuloksissa kävi ilmi, että tamoksifeenilla oli suurin vaikutus 2. kasvatuksen soluihin, jotka olivat 4 viikon ikäisistä naarashiiristä, jolloin tamoksifeenin vaikutus saattaa olla suurempi naarashiirten kohdalla kuin uroshiirten kohdalla.

Soluviljelyn aikana monille kuopille muodostui luunoduleita, joita erilaistumassa olevat osteoblastit muodostivat. Solujen erilaistuminen alkoi solujen kiinnittymisellä viljelyalustojen pohjaan ja solujen määrän kasvulla. Pre-osteoblastien mineralisoituessa ne muodostivat ensin väliainetta ulkopuolelleen ja alkoivat muodostaa vesikkeleitä. Mineraalit vapautuivat lopulta solujen ulkoiseen tilaan ja kiteytyivät mineraalikristalleiksi. Mineraalien tiivistyessä lopputuloksena oli luunoduli.

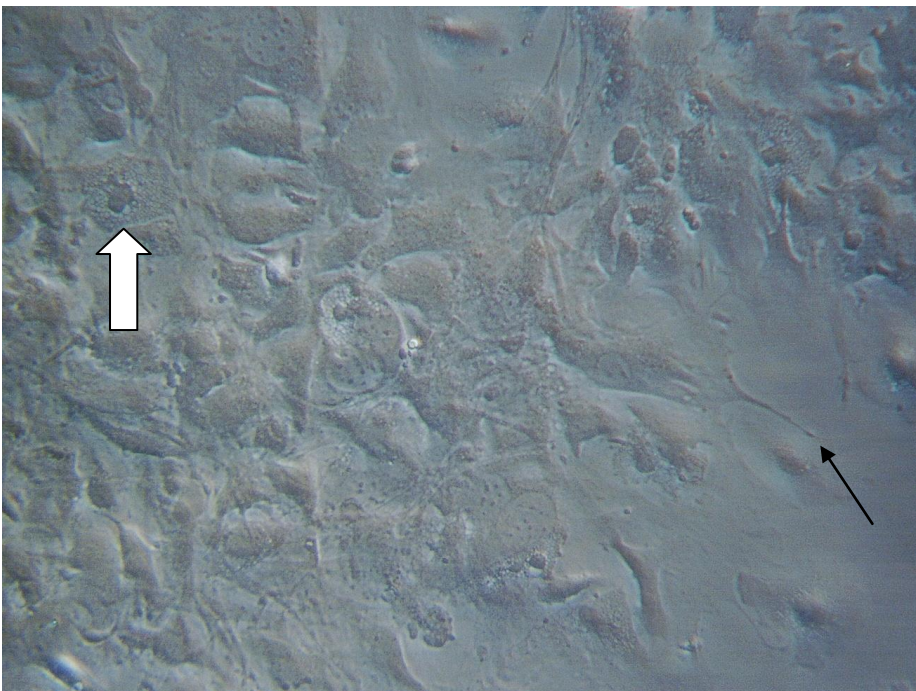
Tamoksifeenin vaikutuksen alaisilla soluilla (T+) ja soluilla, jotka eivät olleet tamoksifeenin vaikutuksen alla (T-) alkoi näkyä heti soluviljelyn alkuvaiheessa eroja. T+ solut jakaantuivat ja erilaistuivat nopeammin kuin T- solut. Varsinkin kasvatuksen 2. kohdalla ero oli huomattava. Ensimmäinen luunodulimuodostus näkyi 2.kasvatuksen T+ soluilla päivänä 8 (kuva 15).

Von Kossa-värijäyksillä osoitettiin kuopille muodostuneet osteoblastien muodostamat mineralisaatiot (kuva 16). ALP-mittauksissa 2.kasvatuksen T+ ja T- solujen välillä oli paljon eroa proteiinipitoisuuksissa, mutta 3. kasvatuksen kohdalla samanlaista eroa ei ollut (taulukot 2, 3 ja 4).



Kuva 7. 1. kasvatus, Dicer-osx, urokset, cre+, d1, T+ (tamoksifeeni).

Kuvassa 7 on 1. kasvatuksen, päivänä 1 pleittaamisesta otettu mikroskooppikuva. Solut alkoivat tarttua kuoppalevy pohjaan ja levittäytyä. Punaisella nuolella on osoitettu yksi pohjaan tarttunut solu. Valkoisella nuolella on osoitettu yksi soluista, joka ei ole tarttunut pohjaan. Solut, jotka eivät tarttuneet pohjaan olivat mediumissa vapaina kelluvia, kuolleita soluja. Ne lähtivät kuopilta pois mediumin vaihtojen yhteydessä.



Kuva 8. 1. kasvatus, Dicer-osx, urokset, cre+, d15, T- (ei tamoksifeenia).

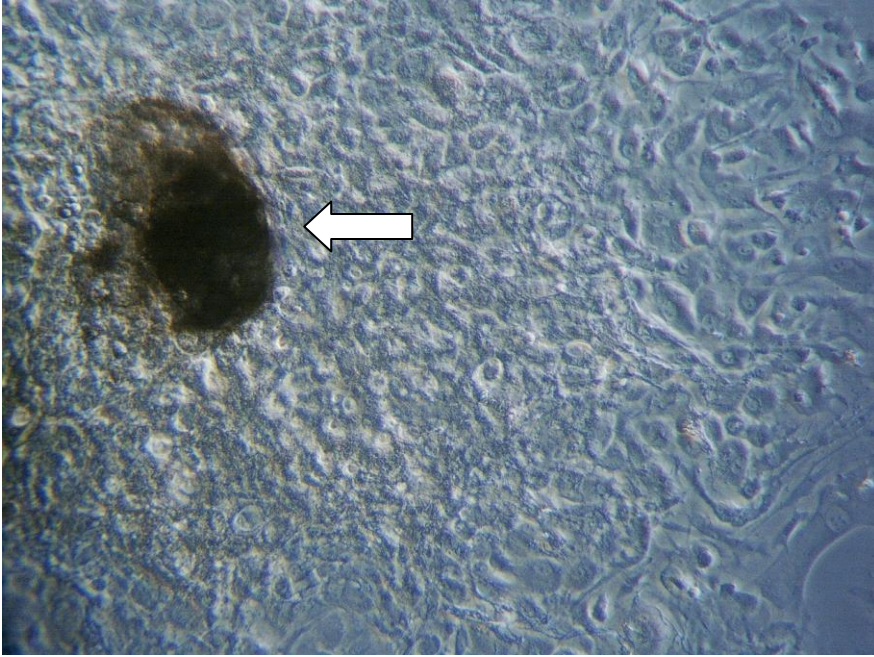


Kuva 8 on otettu 20-suurennoksella. Valkoinen nuoli kuvassa osoittaa pre-osteoblastin muodostamia vesikkeleitä. Vesikkelit näkyivät pieninä reikinä solun reunoilla ja ne muodostuivat ennen mineralisaation tapahtumista. Kuvassa 8 näkyy myös pitkiä ”jalkoja” (musta nuoli), joita solut muodostivat levittäytyessään alustalle. Ennen mineralisaation tapahtumista solut jakaantuivat ja järjestäytyivät alustalle limittäin.



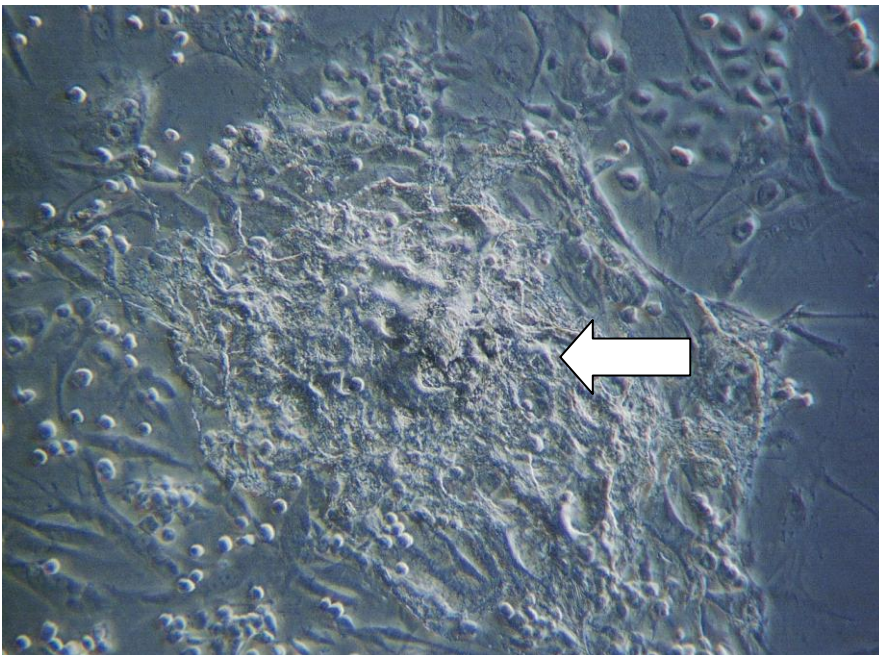
Kuva 9. 1. kasvatus, Dicer-osx, urokset, cre+, d15, T+.

Kuvassa 9 mineralisoituneita osteoblasteja. Solujen tuottamat mineraalikiteet muodostivat hunajakennomaisia rakennelmia solujen ympärille (valkoinen nuoli). Solut muodostivat mineralisaatiot monesti pitkittäismallisena muodostelmana. Verrattuna kuvaan 8 T-solut olivat paljon enemmän jäljessä erilaistumisessa kun T+ solut. Kasvatuspäivänä 15 (d15) T- solut vasta aloittivat mineralisaation, kun taas T+ solut olivat samana kasvatuspäivänä edenneet mineralisaatioissa paljon pidemmälle.



Kuva 10. 1. kasvatus, Dicer-osx, urokset, cre+, d15, T+.

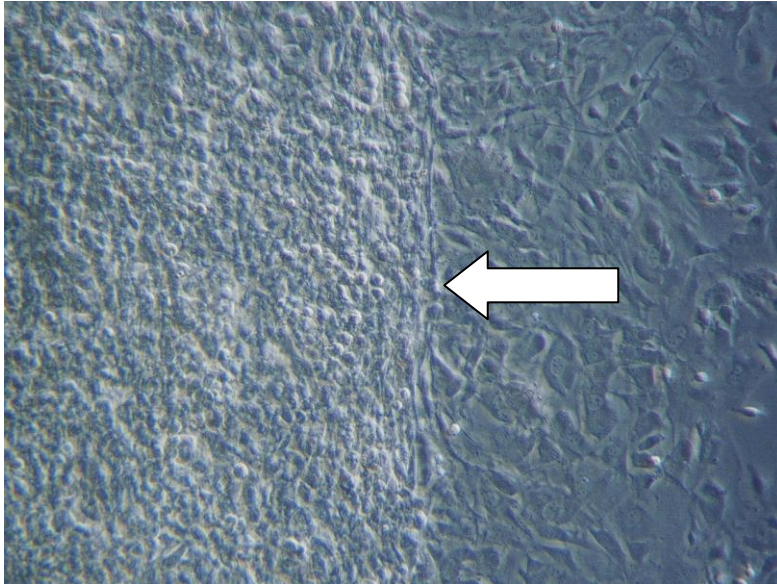
Kuvassa 10 näkyy osteoblastien muodostama luunoduli. Mineraalikiteet tiivistyivät luuta muistuttavaksi noduliksi kuoppalevyllä. Nodulin päällä olevat solut kuolivat pois (musta väri) , koska niille ei riittänyt ravinteita eikä kasvutilaa enään alustalla (valkoinen nuoli).



Kuva 11. 1.kasvatus, Dicer-osx, urokset, cre +, d24, T-.

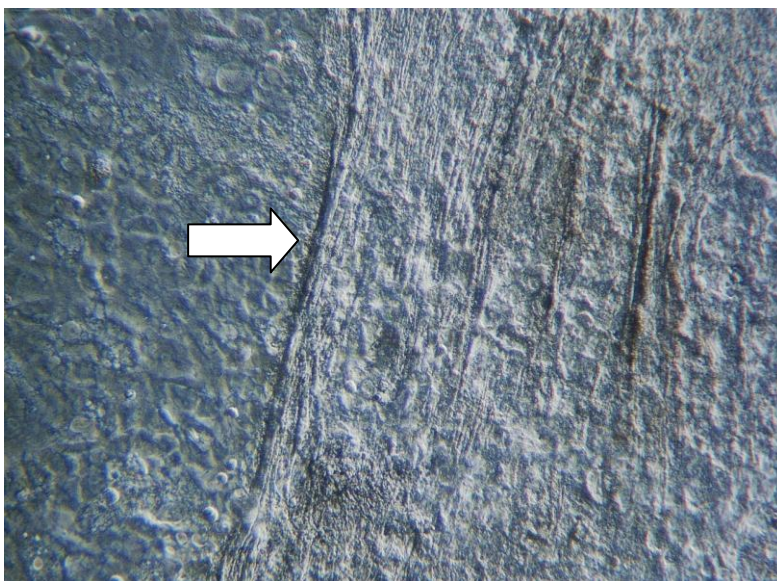


Kuvassa 11 on 1. kasvatuksen T- solujen luunodulimuodostumaa päivänä 24 (valkoinen nuoli). T- solut aloittivat mineralisaation päivän 15 aikoihin, jolloin T+ solut olivat jo muodostaneet ensimmäisen luunodulin. T- muodostivat ensimmäisen luunodulinsa vasta päivän 24 tienoilla.



Kuva 12. 2. kasvatus, Dicer-osx, naaraat, cre+ d9, T+

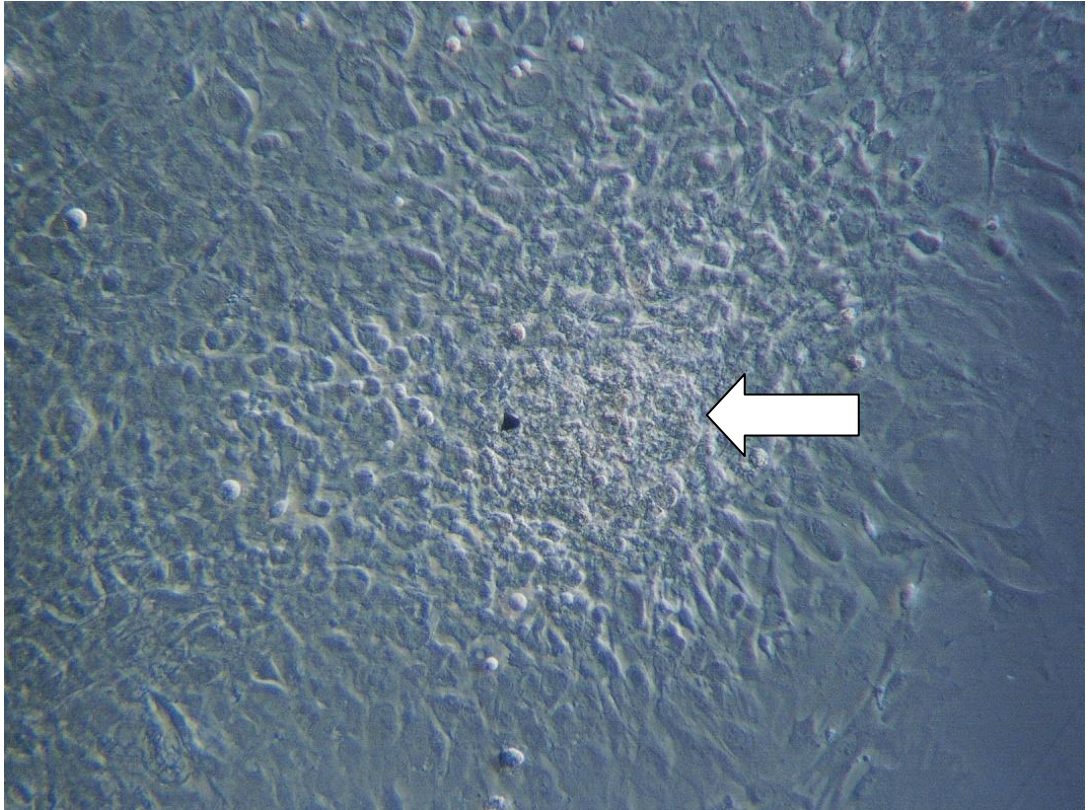
Kuvassa 12 on alkavaa mineralisaation muodostusta kasvatuksen 2. T+ soluilla. Naarashiirisolut alkavat järjestäytymään limittäin (valkoinen nuoli) aloittaessaan mineralin muodostuksen.



Kuva 13. 2. kasvatus, Dicer-osx, naaraat, cre +, d15, T+

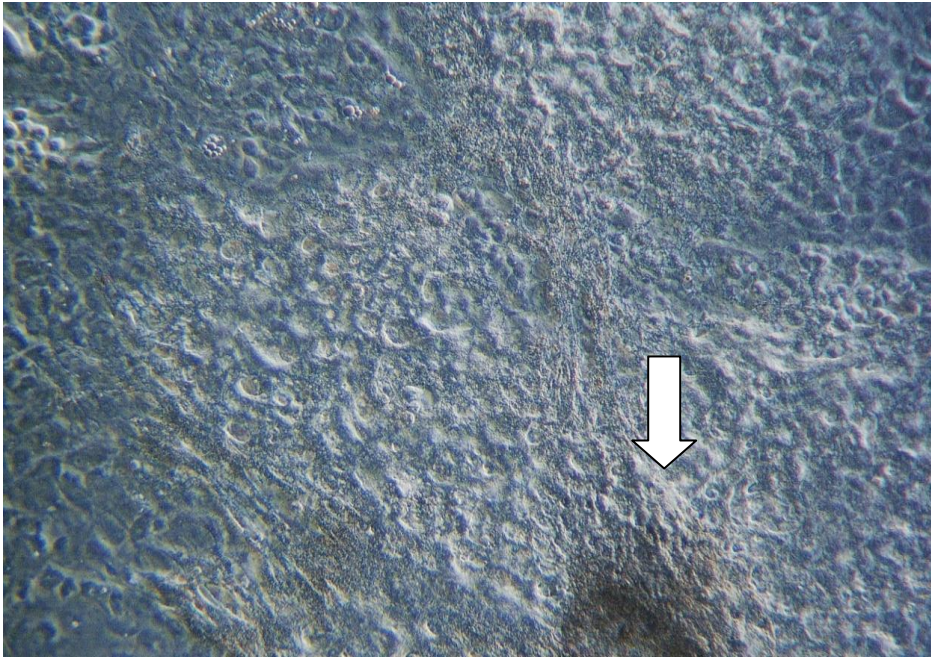


Kuvassa 13 2. kasvatuksen T+ naarashiirisoluilla mineralisaatio on jo edennyt pitkälle ja se näkyy pitkittäismallisena luunodulin muodostuksena (valkoinen nuoli). Kuitenkin 2. kasvatuksen T+ solut olivat muodostaneet ensimmäisen luunodulin jo päivänä 8 (kuva 16.)



Kuva 14. 2. kasvatus, Dicer-osx, naaraat, cre+, d9, T-

Kuvassa 14 on 2. kasvatuksen T-solut päivänä 9, jolloin ne myös aloittelivat mineralisaatiota järjestäytymällä kuopilla (valkoinen nuoli). Verrattuna T+ soluihin, T- solujen mineralisaatioiden aloittaminen oli pienempää kuin kuvassa 12 T+ soluilla.



Kuva 15. 2. kasvatus, Dicer-osx, naaraat, cre+, d15, T-

Kuvissa 15 ja 16 on 2. kasvatuksen luunodulit T- soluilla ja T+ soluilla (valkoiset nuolet). 2. kasvatuksen kohdalla T+ solut muodostivat ensimmäisen luunodulin jo päivänä 8., kun taas T- solut muodostivat ensimmäisen luunodulin vasta päivänä 15.

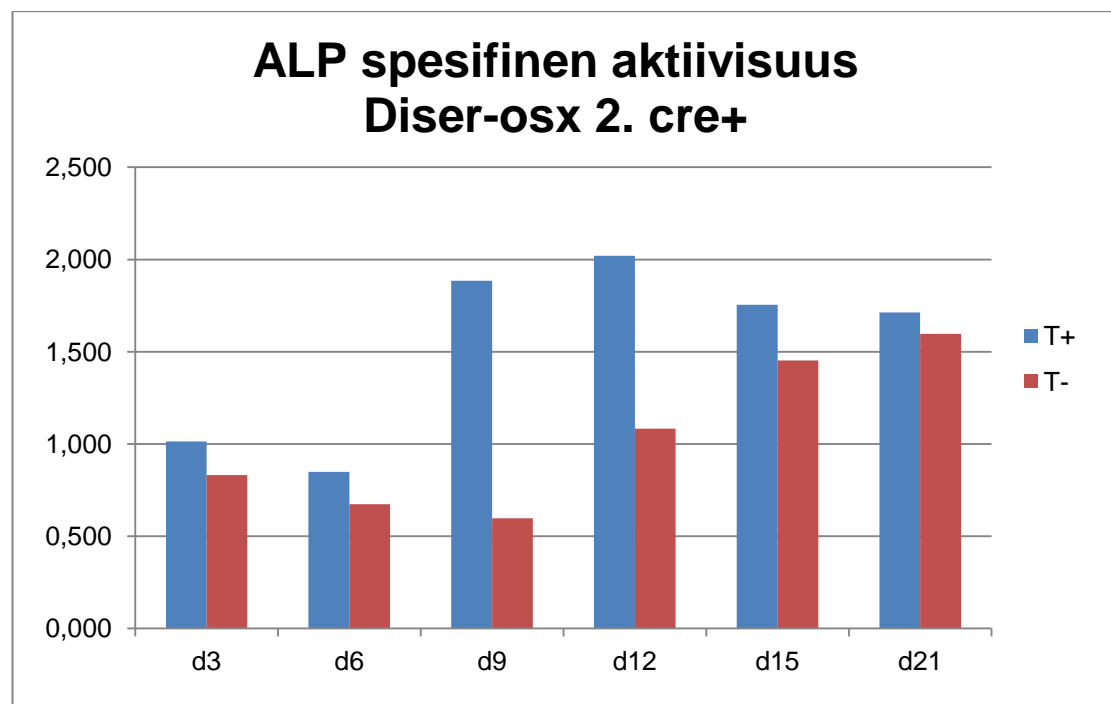


Kuva 16. 2. kasvatus, Dicer-osx, naaraat, cre+, d8, T+



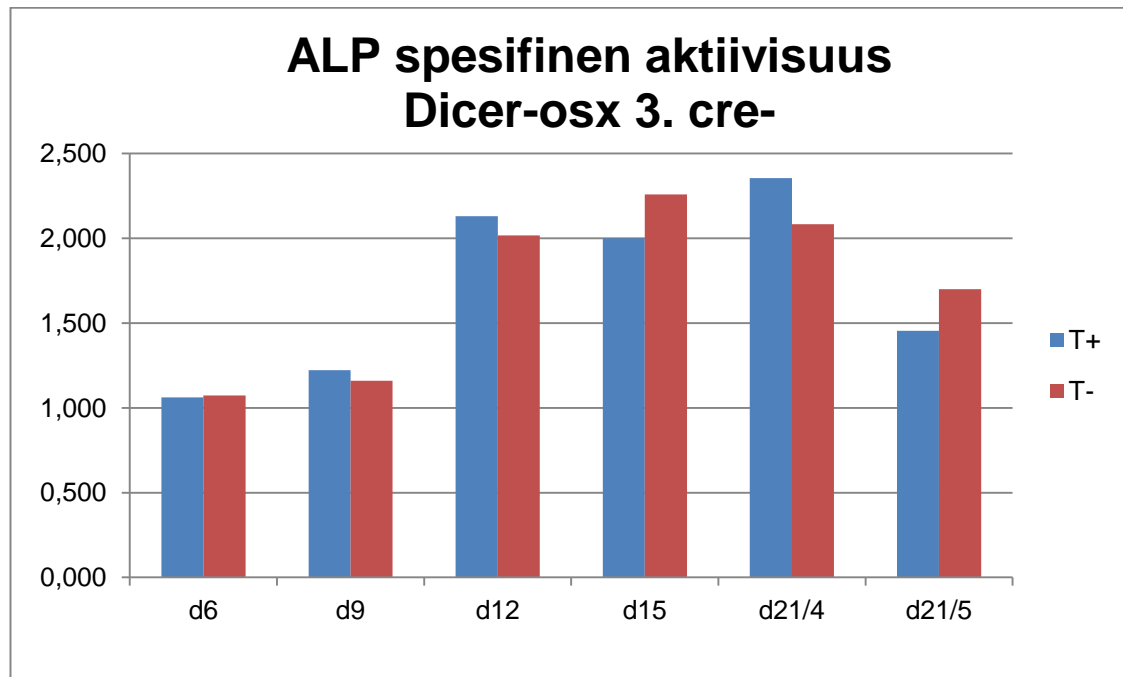
ALP-mittaukset tehtiin 2. ja 3. kasvatuksille. 2.kasvatus eristettiin cre+ hiiristä ja 3.kasvatukseen otettiin cre+ ja cre- hiiriä. 3. kasvatuksen avulla pystyttiin vertailemaan, onko cre+ ja cre- hiirikannoista eristettyjen solujen ALP-pitoisuuksissa eroa.

Taulukko 2. 2.kasvatus, Dicer-osx, cre+ (naarashiiret), T+/T-, ALP-mittaus.



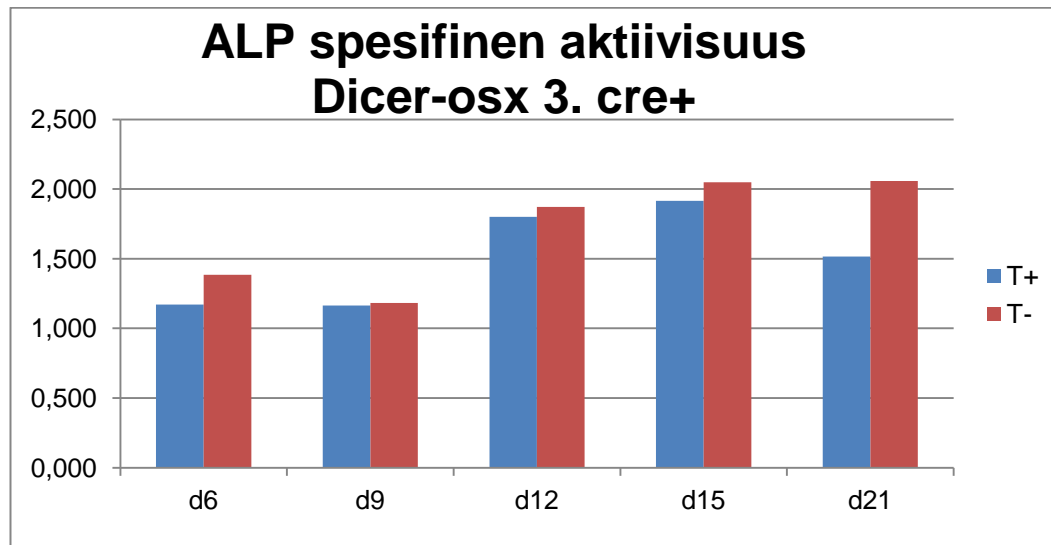
Taulukossa 2 oli nähtävissä 2. kasvatuksen proteiiniarvot. Ero oli huomattava T+ ja T- solujen välillä. Päivästä 3 lähtien T+ solut erittivät enemmän ALP-pitoisuutta ja päivässä 9 ero T- soluihin oli selkeä. T- solut erilaistuvat hitaammin kuin T+ solut. Ero kuroutui kiinni päivään 15 mennessä, jolloin ALP-pitoisuus rupeaa hiljalleen katoamaan soluista mineralisaation ollessa jo pitkällä.

Taulukko 3. 3. kasvatus, Dicer-osx, cre- (uroshiiret), T+/T-, ALP-mittaus.



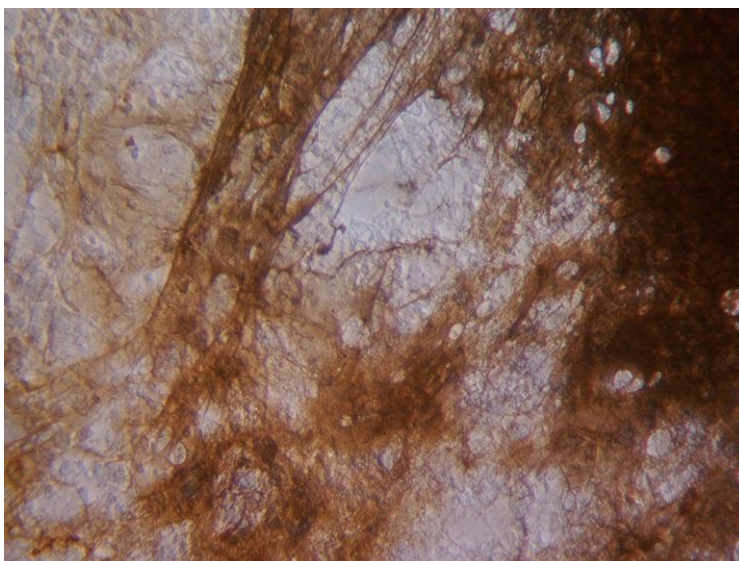
Taulukossa 3 on esitetty 3. kasvatuksen cre- ALP-pitoisuudet. Niitä tarkasteltaessa ei huomattu selvää eroa T+ ja T- solujen välillä. 3.kasvatuksen cre- soluja saatiin eristettyä niin paljon, että levyä oli ylimäärin, joten 24-kuoppalevyjä oli jäljellä päivänä 21 kaksi kappaletta. Näin ollen taulukossa näkyy d21/4 (kuoppalevy numero 4) ja d21/5 (kuoppalevy numero 5), joista molemmista mitattiin ALP. Näiden kahden kuoppalevyn välillä oli selkeä ero solujen ALP-pitoisuuksissa. Tämä johtuu siitä, että kuoppalevy 4:n mineralisaatio alkoi myöhemmin ja kesti pidempään kuin kuoppalevy 5:en, jolloin myös ALP pitoisuudet soluissa olivat vielä korkeammat kuoppalevyssä 4 kuin kuoppalevyssä 5 päivänä 21.

Taulukko 4. 3. kasvatus, Dicer.osx, cre+(uroshiiret), T+/T-, ALP-mittaus.



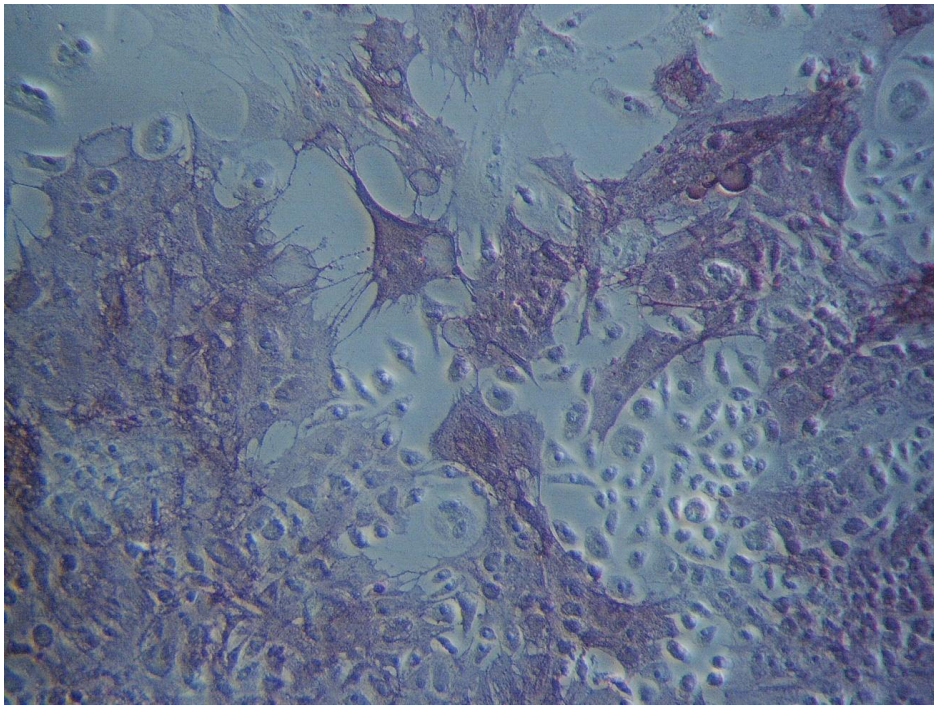
Taulukossa 4. on esitetty 3. kasvatuksen cre+ ALP-pitoisuudet. Ainoastaan päivänä 21 on ero suurempi T+ ja T- solujen välillä, jolloin T+ solujen erilaistuminen loppui aiemmin.

Von Kossa värjäystä tehtiin 2. ja 3. kasvatuksen kohdalla. Kuvassa 17 on von Kossa värjäyksellä osoitettu kasvatuksen 2. T+ d15 mineralisaatio. Von Kossa värjäyksessä mineralisaatiot värjäytyvät ruskean värisiksi. Kuvassa 13 oli saman kasvatuksen, saman päivän solujen mineralisaatio.



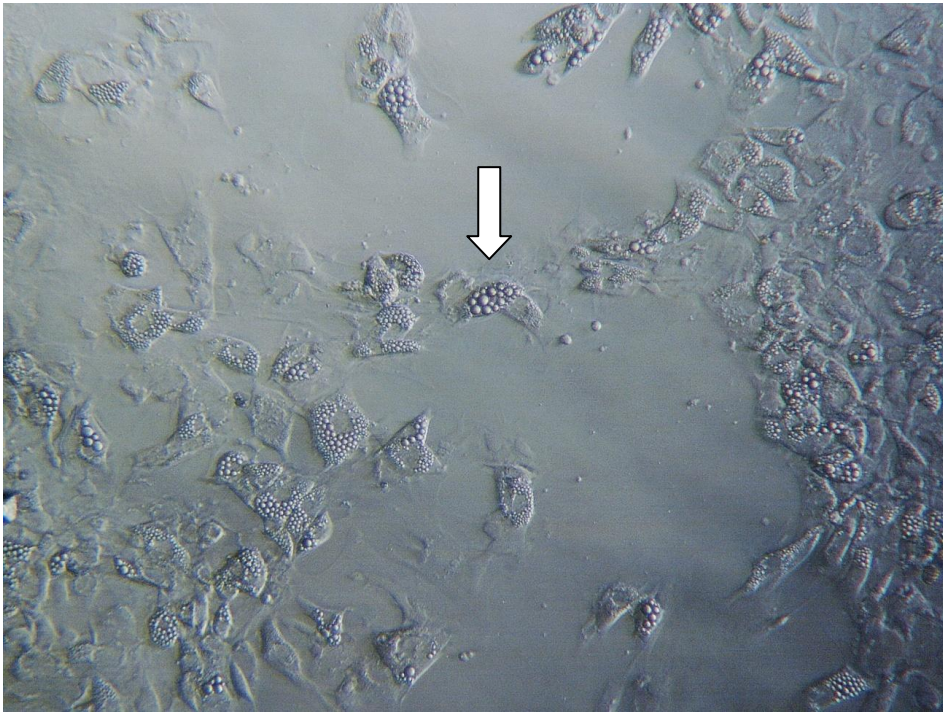
Kuva 17. 2. kasvatus, Dicer-osx, naaraat, cre+, d15, T+, von Kossa värjäys.

ALP-värjäystä tehtiin kaikkien kantojen kohdalla. 1. ja 2. kasvatuksen kohdalla soluja ei kuitenkaan saatu värjättyä, sillä värjäyskitti oli vanhentunut ja solut mahdollisesti kärsivät väriaineista eivätkä värjäytyneet enään uudella kitillä. 3. kasvatuksen kohdalla saatiin kuitenkin onnistuneita ALP-värjäyksiä (kuva 18. vaalenpunainen väri soluissa).



Kuva 18. 3. kasvatus, Dicer-osx, urokset, cre-, d10, T+ ALP-värjäys.

Oil Red värjäys tehtiin 1. kasvatuksen d15 T+ ja T- soluille. Näissä kuopissa oli huomattu aikaisemmin mikroskoopilla tarkasteltaessa adiposyyttien kaltaisia soluja ja värjäys tehtiin, jotta epäily osoitettaisiin oikeaksi. Värjäys ei kuitenkaan onnistunut kannan soluille ja syy jäi epäselväksi.



Kuva 19. 1.kasvatus, Dicer-osx, urokset, cre+, d24, T- adiposyyttejä.

Epäiltyjä rasvasoluja eli adiposyyttejä löydettiin myös muilta kuopilta jokaisen kasvatuksen kohdalla (kuva 19. valkoinen nuoli). T+ ja T- solujen välillä ei ollut eroa. Soluviljelylaboratoriossa tehtiin myöhemmin samoilla oil red väriaineilla samantapaisille osteoblastiviljelmille värjäys, joka onnistui värjäämään rasvasolut.



## 6 POHDINNAT

### 6.1 Tutkimuksen yleinen pohdinta

Tutkimuksen aihe oli opinnäytetyön tekijälle ennen tutkimuksen aloittamista täysin vieras. Tutkimuksen teoreettinen pohja perustui lähestulkoon kokonaan englanninkieliseen lähdemateriaaliin, joka toi omat haasteensa tutkimuksen aloittamiseen. Opinnäytetyön tekijälle perehdyttiin suurin osa soluviljelylaboratoriossa työskentelystä alusta alkaen. Ainoastaan pipettien ja mikroskoopin käyttö oli aiemmin tuttua. Koeläinhiirien kanssa opinnäytetyön tekijä ei ollut työskennellyt koskaan. Tutkimusryhmään kuului myös eri kulttuurin edustaja, jolloin englanninkielen käyttöä harjoitettiin myös puhumalla. Vieraskieliset materiaalit ja vieraalla kielellä kommunikointi olivat kuitenkin lopulta osa arvokasta kokemusta ja ainoastaan hyödyksi tulevaisuutta ajatellen.

Teoriatiedon kirjoittamisen opinnäytetyön tekijä koki ajoittain haastavaksi vieraskielisen lähdemateriaalin ja vieraan aiheen vuoksi. Tämän opinnäytetyön tekijä kuitenkin koki loppua kohden kasvattavan hänen kykyään tuottaa tieteellistä tekstiä ja vieraan kielen ymmärrystä. Valmis tuotos tarkistutettiin kahdella ohjaajalla, mikä auttoi mahdollisten asiavirheiden korjaamisessa.

### 6.2 Tutkimustulosten pohdinta

Tutkimuksessa käsiteltiin yhteensä 10 geenimuunnellun hiiren luuydinsoluja. Solut viljeltiin ja niille tehtiin von Kossa värjäystä, oil red värjäystä ja ALP-värjäystä sekä mittausta. RNA- ja DNA-mittauksia oli alkuperäisessä tutkimussuunnitelmassa tarkoituksena tehdä, mutta soluviljelylaboratoriolla ei ollut käytössä mittaukselle optimoitua PCR-menetelmää.

Tulokset osoittivat, että mikro-RNA:n inaktivoinnilla osterix positiivissa soluissa (cre+) saattaa olla vaikutusta mesenkymaalisen strooman solun erilaistumisessa luuta muodostavaksi soluksi. Vaikutus saattaa olla



huomattavampi naarashiirten soluissa kuin uroshiirten soluissa. Tutkimus oli pilottitutkimus aiheesta ja se vaatii toistoa, jotta tutkimustulokset olisivat tilastollisesti merkitseviä.

Soluja saatiin eristettyä luuytimistä hyvin ja solujen kasvu oli suurilta osin runsasta. Ainoastaan 3. kasvatuksen cre+ uroshiirien solujen kasvu ja jakautuminen oli oletettua hitaampaa. Syy ei tullut selville. Eroa ei ollut T+ ja T- solujen välillä. Jokaisen kasvatuksen soluja kasvatettiin soluviljelylaboratoriossa käyttäen samoja menetelmiä, joten jäi epäselväksi miksi 3. kasvatuksen cre+ uroshiirisolut eivät kasvaneet yhtä hyvin kuin 1. kannan cre + uroshiirisolut, jotka olivat 2 kuukautta vanhemmista uroshiiristä eristettyjä.

Jos verrataan 3. kasvatuksen cre- uroshiirten solujen kasvua cre+ uroshiirten solujen kasvuun 1. ja 3. kasvatuksessa, oli cre- solujen jakautuminen ja erilaistuminen huomattavasti runsaampaa. Osterix negatiivisten (cre-) solujen mikro-RNA:n tuotanto ei inaktivoidu tamoksifeenilla. Tästä johtuen cre- soluilla ei myöskään huomattu eroa T+ ja T- solujen välillä, koska tamoksifeenilla ei tässä tapauksessa ole vaikutusta solujen erilaistumiseen ja jakautumiseen. 3.kasvatuksen solut olivat myös noin 2 kuukautta nuoremmista uroshiiristä kuin 1. kasvatuksen uroshiiristä eristetyt solut, jolloin luuydin oli mahdollisesti solurikkaampaa nuoremmilla hiirillä.

Eri kasvatuksia vertailtaessa, oli selvästi huomattavissa 2. kasvatuksen naarashiirten solujen jakautumisen nopeus ja solujen runsaus. 2. kasvatuksen solut olivat 4 viikkoa vanhoista naarashiiristä. Kuten aikaisemmin pääteltiin, nuorilla hiirillä on mahdollisesti hyvin solurikas luuydin. 4 viikkoa vanhojen naarashiirten solut muodostivat mineralisaatioita jo päivänä kahdeksan ja 1. ja 3. kasvatuksien uroshiirten solut vasta päivinä 15 ja 12. Tällöin myös solujen erilaistuminen oli nopeampaa kasvatuksella kaksi. Ero myös sukupuolen kannalta tulee esille. On mahdollista, että cre+ hiirikannan naarashiiristä eristetyt solut jakaantuvat ja erilaistuvat nopeammin kuin saman kannan uroshiiret.

Tamoksifeenin vaikutus T+ solujen ja T- solujen välillä oli huomattavissa 1. ja 2.kasvatuksen välillä. 1. kasvatuksen kohdalla solujen kasvu ja erilaistuminen oli nopeampaa T+ soluilla kuin T- soluilla. Tämä huomattiin tarkastelemalla eri kuoppia mikroskoopilla päivittäin. Päiväkirjaan merkattiin soluprosentit näkökentistä ja tästä pystyi päättelemään T+ solujen suuremman lukumäärän. Varsinkin viljelyiden alkupuolella T+ solujen jakaantuminen oli huomattavasti nopeampaa. Vasta soluviljelyn loppupuolella T- solut ja T+ solut olivat erilaistumisessa samassa kohtaa.

Sama tapahtui 2. kasvatuksen naarashiirisolujen kohdalla. T+ soluja oli enemmän kuopilla T- soluihin verrattuna kasvatuksen alusta lähtien ja kasvatuksen T+ erilaistuivat kaikista kasvatuksista nopeimmin. Tähän mahdollisesti vaikutti asia, että solut oli eristetty naarashiiristä, joiden mikro-RNA:n tuotanto oli inaktivoitu tamoksifeenilla. Tamoksifeenilla voi mahdollisesti olla enemmän vaikutusta naarashiiriin kuin uroshiiriin, sillä naarashiiret saattavat ilmentää enemmän estrogeenireseptoreita kuin uroshiiret. Tamoksifeeni saattaa myös vaikuttaa naarashiirien luonnollisiin estrogeenireseptoreihin geenimuunneltujen lisäksi.

3.kasvatuksen kohdalla T+ ja T- solujen välillä ei kuitenkaan nähty samanlaista eroa. Cre- uroshiirisolut, joihin ei tamoksifeenin kuulunutkaan vaikuttaa, kasvoivat T+ ja T- kuopilla yhtä nopeasti ja mineralisaatiot alkoivat suunnilleen samaan aikaan. Cre+ solut kasvoivat huonosti molemmilla T+ ja T- kuopilla, joka heikensi vertailukelpoisuutta muihin cre+ kantoihin.

ALP-mittauksista saatiin eniten merkitseviä tuloksia . 1. kasvatuksen kohdalla ei tehty ALP-mittauksia, joten tämän kasvatuksen T+ ja T- solujen erot jäivät arveluttamaan. Mittaustuloksissa oli eniten eroa 2. kasvatuksen kohdalla. Ero T+ ja T- solujen välillä oli merkitsevä. Tämä tulos oli suoraan verrattavissa T+ ja T- solujen jakautumiseen ja erilaistumiseen.

3. kasvatuksen kohdalla ALP-tuloksissa ei ollut eroa cre- solujen kohdalla T+ ja T- soluissa, joka selittyy mahdollisesti mikro-RNA:n tuotannon toimimisella. 3. kasvatuksen cre+ soluilla ei myöskään ollut eroa T+ ja T- välillä, paitsi päivänä

21, jolloin T- solujen proteiinintuotanto oli vielä paljon korkeampi verrattuna T+ soluihin. T- siis jatkoivat erilaistumista pidempään.

### 6.3 Tutkimuksen onnistuminen

Tutkimus kokonaisvaltaisesti oli onnistunut. Solut saatiin kasvamaan suurimmalta osin hyvin soluviljelylaboratoriossa ja tulokset olivat mielenkiintoisia. Värjäykset ja mittaukset onnistuivat suurimmalta osin hyvin, lukuunottamatta ALP-värjäystä vanhentuneen kitin vuoksi.

Mikro-RNA:n inaktivoinnilla saattaa olla erilaistumista nopeuttavaa vaikutusta osterix positiivisilla soluilla mesenkymaalisen strooman solun erilaistuessa osteoblastiksi. Vaikutus on mahdollisesti nopeampi naarashiirestä eristetyillä soluilla kuin uroshiirten soluilla. Tutkimus oli kuitenkin pilottitutkimus aiheesta, joten vasta toistojen jälkeen voidaan tuloksia pitää merkitsevinä.

### 6.4 Jatkotutkimusaiheet

Jatkotutkimuksia varten tutkimus tarvitsee toistaa naarashiirillä cre- ja cre+ kantoja vertailemalla. Myös erilaistumista säätelevien transkriptionaalisten tekijöiden ilmeneminen täytyy määrittää kvantitatiivisella PCR:llä.

## LÄHTEET

Abdallah, B. & Kassem, M. 2011. New factors controlling the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis. *Bone*. Vol. 50, Issue 2, 540-545.

American Cancer Society 2013. Tamoxifen and raloxifene. Viitattu 12.2.2014.

<http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/moreinformation/medicinesstoreducebreastcancer/medicines-to-reduce-breast-cancer-risk-tamoxifen>.

Applichem 2014. Bradford – Solution for protein determination. Viitattu 6.3.2014.

[http://www.applichem.com/fileadmin/produktinfo/a6932\\_en.pdf](http://www.applichem.com/fileadmin/produktinfo/a6932_en.pdf)

Baglio, S.; Devescovi, V.; Granchi, D. & Baldini, N. 2013. MicroRNA expression profiling of human bone marrow mesenchymal stem cells during osteogenic differentiation reveals Osterix regulation by miR-31. *Gene*. Vol. 527, Issue 1, 321-331.

Beloti, M. & Rosa, A. 2005. Osteoblast differentiation of human bone marrow cells under continuous and discontinuous treatment with dexamethasone. *Brazilian dental journal*. Vol 16. Issue 2, 156-161.

Bjälle, J.; Haug, E.; Sand, O.; Sjaastad, Ø. & Toverud, K. 1999. *Ihminen – Fysiologia ja anatomia*. 1., painos. Helsinki: WSOY.

Cao, Y.; Zhou, Z.; Crombrughe, B.; Nakashima, K.; Guan, H.; Duan, X.; Jia, SF. & Kleinerman, E. 2005. Osterix, a transcription factor for osteoblast differentiation, mediates antitumor activity in murine osteosarcoma. *Cancer research*. Vol. 65, Issue 4, 1124-1128.

CSIRO 2011. What is genetic modification (GM)?. Viitattu 23.4.2014.

<http://www.csiro.au/Outcomes/Food-and-Agriculture/WhatIsGM.aspx#a2>

Eijken, M. 2007. Human osteoblast differentiation and bone formation: growth factors, hormones and regulatory networks. The department of internal medicine of the Erasmus MC. Viitattu 14.2.2014.

[https://www.google.fi/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&ved=0CCsQFjAA&url=http%3A%2F%2Frepub.eur.nl%2Fpub%2F10597%2F070905\\_Eijken\\_HJM.pdf&ei=zeP9Uu2kBeTnygP\\_7oDgCw&usq=AFQjCNExaQCRC8WGjc8XBrzW6PpwptiCMQ&bvm=bv.61190604,d.bGQ](https://www.google.fi/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&ved=0CCsQFjAA&url=http%3A%2F%2Frepub.eur.nl%2Fpub%2F10597%2F070905_Eijken_HJM.pdf&ei=zeP9Uu2kBeTnygP_7oDgCw&usq=AFQjCNExaQCRC8WGjc8XBrzW6PpwptiCMQ&bvm=bv.61190604,d.bGQ)

Finnish bioindustries 2014. Biotekniikan sanasto. Viitattu 10.4.2014.

<http://www.finbio.net/sanasto/>

Gaur, T.; Hussain, S.; Mudhasani, R.; Parulkar, I.; Colby, J.L.; Frederick, D.; Kream, B.E.; Van Wijnen, A.J.; Stein, J.L.; Stein, G.S.; Jones, S.N. & Lian, J.B. 2010. Dicer inactivation in osteoprogenitor cells compromises fetal survival and bone formation, while excision in differentiated osteoblasts increases bone mass in the adult mouse. *Developmental biology*. Vol 340. Issue 1, 10-21.

Geenitekniikkalaki 17.3.1995/377.

Golub, E. & Boesze-Battaglia, K. 2007. The role of alkaline phosphatase in mineralization. *Current opinion on orthopaedics*. Vol 18. Issue 5, 444-448.

Harfe, B.; McManus, M.; Mansfield, J.; Hornstein, E. & Tabin, C. 2005. The RNaseIII enzyme Dicer is required for morphogenesis but not patterning of the vertebrate limb. *PNAS*. Vol.102, Issue 31, 10898-10903.

Heino, T. & Hentunen, T. 2008. Differentiation of osteoblasts and osteocytes from mesenchymal stem cells. *Current stem cell research & therapy*. Vol. 3, Issue 2, 131-145.

Heino, J. & Vuento, M. 2010. *Biokemian ja solubiologian perusteet. 2., uudistettu painos*. Helsinki: WSOY.

Hirsjärvi, S.; Remes, P. & Sajavaara, P. 2009. *Tutki ja kirjoita. 15., uudistettu painos*. Helsinki: Tammi.

Hirsjärvi, S.; Remes, P. & Sajavaara, P. 2000. *Tutki ja kirjoita. 6., uudistettu painos*. Helsinki: Tammi.

IHCWorld 2011. Oil red o staining protocol. Viitattu 17.3.2014.

[http://www.ihcworld.com/\\_protocols/special\\_stains/oil\\_red\\_o\\_ellis.htm](http://www.ihcworld.com/_protocols/special_stains/oil_red_o_ellis.htm)

Karjalainen, S.; Launis, V.; Pelkonen, R. & Pietarinen, J. 2002. *Tutkijan eettiset valinnat*. Gaudeamus kirja. Tampere: Tammer-paino.

Kawase-Koga, Y.; Otaegi, G. & Sun, T. 2010. Different timings of dicer deletion affect neurogenesis and gliogenesis in the developing mouse central nervous system. *Developmental dynamics*. Volume 238. Issue 11, 2800-2812.

KEK. 2009. *Koe-eläin keskus*. Turun yliopisto. Viitattu 13.2.2014.

<http://www.animalcenter.utu.fi/lainsaadanto/elaimet/>

KEK. 2013. *Koe-eläin keskus*. Turun yliopisto. Viitattu 13.2.2014.

<http://www.animalcenter.utu.fi/kek/laatu/>

KEK. 2014. Koe-eläin keskus. Turun yliopisto. Viitattu 13.2.2014.

<http://www.animalcenter.utu.fi/lainsaadanto/>

Kotti, E. 2011. Ihmisen rasvakudoksesta eristettyjen kantasolujen erilaistumiskyvyn vertailu luusolujen suuntaan. Opinnäytetyö. Laboratorioalan koulutusohjelma. Helsinki: Metropolia ammattikorkeakoulu.

Laine, S.; Alm, J.; Virtanen, S.; Aro, H. & Laitala-Leinonen, T. 2012. MicroRNAs miR-96, miR-124, and miR-199a regulate gene expression in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Journal of cellular biochemistry*. Vol. 113, Issue 8, 2687-2695.

Laki tieteellisiin tai opetustarkoituksiin käytettävien eläinten suojelusta 28.6.2013/497.

Lakshmi pathy, U.; Love, B.; Goff, L.; Jörnsten, R.; Graichen, R.; Hart, R. & Chesnut, J. 2007. Micro RNA expression pattern of undifferentiated and differentiated human embryonic stem cells. *Stem cells development*. Vol 16. Issue 6, 1003-1016.

Lynch, M.; Capparelli, C.; Stein, J.; Stein, G. & Lian, J. 1998. Apoptosis during bone-like tissue development in vitro. *Journal of Cellular Biochemistry*. Vol. 68, Issue 1, 31-49.

Maes, C.; Kobayashi, T. & Kronenberg, H. 2007. A novel transgenic mouse model to study the osteoblast lineage in vivo. *Annals of the New York Academy of sciences*. Vol. 1116, 149-164.

Moore, KJ.; Rayner, KJ.; Suárez, Y. & Fernández-Hernando, C. 2010. MicroRNAs and cholesterol metabolism. *Trends endocrinol metabolism*. Vol 21. Issue 12, 699-706.

Neagu, M.; Suci, E.; Ordodj, V. & Păunescu, V. 2005. Human mesenchymal stem cells as basic tools for tissue engineering: isolation and culture. *Romanian j. Biophys*. Vol. 15, Issue 1-4, 29-34.

Parra-Torres, A.; Valdés-Flores, M.; Orozco, L. & Velázquez-Cruz, R. 2013. Molecular Aspects of Bone Remodeling. *Topics in Osteoporosis*. Viitattu 25.9.2013

<http://www.intechopen.com/books/topics-in-osteoporosis/molecular-aspects-of-bone-remodeling>

Promocell 2008. Osteoblast differentiation and mineralization. Viitattu 14.2.2014.

<http://www.promocell.com/fileadmin/promocell/PDF/Osteoblast%20Differentiation%20and%20Mineralization.pdf>

SCQ 2006. Cell Culture. Viitattu 6.2.2014. <http://www.scq.ubc.ca/cell-culture/>

Solunetti 2006a. Apoptoosi. Viitattu 10.4.2014. <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/apoptoosi/>

Solunetti 2006b. Reseptorit ja viestimolekyylit. Viitattu 25.3.2014.

[http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/yleista\\_valitysmekanismista/](http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/yleista_valitysmekanismista/)

- Solunetti 2006c. Soluviljely. Viitattu 6.2.2014. [http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/soluviljely\\_1/](http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/soluviljely_1/)
- Terveyskirjasto 2014a. Glukokortikoidi. Viitattu 26.4.2014.  
[http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=Ilt00973](http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=Ilt00973)
- Terveyskirjasto 2014b. Homeostaasi. Viitattu 10.4.2014.  
[http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=Ilt01170](http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=Ilt01170)
- Terveyskirjasto 2014c. Osteoklasti. Viitattu 26.4.2014.  
[http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=Ilt02444](http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=Ilt02444)
- Terveyskirjasto 2014d. Strooma. Viitattu 10.4.2014.  
[http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=Ilt03261](http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=Ilt03261)
- The Anatomy of the Laboratory Mouse 1965. Skeleton. Viitattu 7.5.2014.  
<http://www.informatics.jax.org/cookbook/figures/figure41.shtml>
- Turan, S.; Galla, M.; Ernst, E.; Qiao, J.; Voelkel, C.; Schiedmeier, B.; Zehe, C. & Bode, J. 2011. Recombinase-mediated cassette exchange (RMCE): Traditional concepts and current challenges. *Journal of molecular biology*. Vol 407. Issue 2, 193-221.
- U.S. Department of Health and Human Services. 2004. *Bone Health and Osteoporosis: A Report of the Surgeon General*. Rockville. Viitattu 24.09.2013  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK45504/#ch2.s3>
- Vehmanen, L.; Elomaa, I.; Blomqvist, C. & Saarto, T. 2006. Tamoxifen treatment after adjuvant chemotherapy has opposite effects on bone mineral density in premenopausal patients depending on menstrual status. *American society of clinical oncology*. Vol 24. Issue 4, 675-680.
- Vilkka, H. 2005. Tutki ja kehitä. Keuruu: Tammi.
- Wang, YH.; Liu, Y.; Maye, P. & Rowe, D. 2006. Examination of Mineralized Nodule Formation in Living Osteoblastic Cultures Using Fluorescent Dyes. *Biotechnology progress*. Volume 22. Issue 6, 1697-1701.
- Wang, Q.; Cai, J.; Cai, XH. & Chen, L. 2013. Mir-346 regulates osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells by targeting the wnt/ $\beta$ -catenin pathway. *Plos ONE*. Vol. 8, Issue 9.
- Warwick, R.; Brubaker, S. & Minger, S. 2012. Tissue and cell clinical use: an essential guide. Viitattu 24.09.2013.  
<http://site.ebrary.com.ezproxy.turkuamk.fi/lib/turkuamk/docDetail.action?docID=10580268&p00=tissue%20cell%20clinical>

# Toimeksiantosopimus



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU  
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

## OPINNÄYTETYÖN TOIMEKSIANTOSOPIMUS

1

### OPISKELIJAN TIEDOT

Nimi Anni-Mari Tuori  
 Osoite Kivikarttonhe 5 C 82 20720 TURKU  
 Puhelin koti 040 5562190 Puhelin työ \_\_\_\_\_  
 Sähköposti Anni-Mari.Tuori@students.turkuamk.fi  
 Koulutusohjelma Bioanalyyttikan koulutusohjelma

### OPINNÄYTETYÖ

Aihe/työnimi Mikro-RNA:t luuta muodostavan solun säätelyssä  
 Aikataulu 21.10. - 5.12. 2013

### TOIMEKSIANTAJA

Organisaatio Turun yliopisto, lääket. tiete., biokem. ts., solubiologia ja kasvotomien  
 Työn ohjaaja / yhteyshenkilö Jorma Mänttä  
 Osoite Kiinamyllykatu 10, 20520 Turku  
 Puhelin 02 333 7356 Sähköposti jmaatta@utu.fi

### OHJAAVAN OPETTAJAN YHTEYSTIEDOT

Ohjaava opettaja Nina Johansson  
 Puhelin 044-0752452 Sähköposti nina.johansson@utuamk.fi

Turun ammattikorkeakoulu  
 Joukahaisenkatu 3 A, 20520 Turku  
 puh. 02 263 350 faksi 02 2633 5791  
 sposti etunimi.sukunimi@turkuamk.fi



### OPINNÄYTETYÖN SOPIMUSEHDOT\*

#### OHJAUS JA VASTUUT

Vastuu opinnäytetyön tekemisestä ja tuloksista on opiskelijalla. Turun ammattikorkeakoulu vastaa opinnäytetyön ohjauksesta. Toimeksiantaja sitoutuu antamaan opiskelijan käyttöön kaikki opinnäytetyön tekemisessä tarvittavat tiedot ja aineistot sekä ohjaamaan opinnäytetyötä toimeksiantajaorganisaation näkökulmasta.

#### OIKEUDET

Opinnäytetyön tekijänoikeus kuuluu tekijälle eli opiskelijalle. Tekijänoikeuden lisäksi myös muiden immateriaalioikeuksien osalta noudatetaan kulloinkin voimassa olevaa kyseessä olevaa oikeutta koskevaa lainsäädäntöä.

#### TYÖSUHDE JA KUSTANNUKSET

Mahdollisesta työsuhteesta, työstä maksettavasta palkki-osta ja työstä mahdollisesti aiheutuvien kustannusten korvaamisesta toimeksiantaja ja opinnäytetyön tekijä sopivat erikseen.

#### TULOSTEN JULKISTAMINEN JA LUOTTAMUKSELLISUUS

Opinnäytetyöstä laaditaan Turun ammattikorkeakoulun ohjeen mukainen kirjallinen raportti.

Kirjallinen raportti luovutetaan toimeksiantajalle ja asetetaan kirjaston kokoelmiin tai julkaistaan elektronisessa muodossa verkkokirjastossa.

Julkaistava opinnäytetyöraportti on laadittava niin, ettei se sisällä liike- tai ammattisalaisuuksia tai muita julkisuuslaissa (laki viranomaisten toiminnan julkisuudesta) salassa pidettäväksi määrättyjä tietoja, vaan ne jätetään työn tausta-aineistoon. Opinnäytetyön arvioinnissa otetaan huomioon sekä julkaistava että salassa pidettävä osa.

Opinnäytetyön toimeksiantaja ja opiskelija sitoutuvat pitämään salassa kaikki opinnäytetyön tekemisessä ja sitä edeltävissä tai sen jälkeisissä neuvotteluissa esiin tulevat luottamukselliset tiedot ja asiakirjat.

Toimeksiantajan edustajalle varataan mahdollisuus tutustua opinnäytetyöraporttiin viimeistään neljätoista (14) päivää ennen aiottua julkaisemista. Toimeksiantaja antaa työstä ennen edellä mainittua julkaisemisajankohtaa lausunnon, jossa voidaan määritellä opinnäytetyöraporttiin mahdollisesti sisältyvät liike- tai ammattisalaisuudet, joita ei julkaista.

Mitä liike- tai ammattisalaisuuksiin liittyviä asioita ei esitetä opinnäytetyöraportissa?

—

### OLEMME YHTEISESTI SOPINEET OPINNÄYTETYÖN TOTEUTUKSESTA YLLÄ ESITETYLLE TAVALLA

11/10 2013

11/10 2013

Opiskelija

Toimeksiantaja

### LIITE : OPINNÄYTETYÖSUUNNITELMA

\* Turun ammattikorkeakoulun toiminnan yhtiöittämistä vuoden 2014 alusta valmistellaan. Osakeyhtiön toiminnan allettua tämä sopimus siirtyy Turun AMK:n toiminnan vastaanottavalle yhtiölle.

## Mediumit ja reagenssit

### Normaali medium (100ml)

|  |                                |
|--|--------------------------------|
| 15 ml iFBS (fetal bovine serum, Gibco)   | final conc = lopullinen        |
| konsentraatio 15 %   |                                |
| 1 ml PS (penicillin streptomycin, stock 100 x, Gibco)                            | lopullinen konsentraatio 1x    |
| 1 ml glutamax (stock 100x, Gibco)  | lopullinen konsentraatio 1x    |
| 1 ml HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, stock 1M, Gibco) | lopullinen konsentraatio 10 mM |
| 82 ml $\alpha$ MEM (minimum essential medium, Gibco)                             |                                |

### Osteogeeninen medium (50 ml)

|   |  |
|---|--|
| 50 ml normal medium   |  |
| 500 $\mu$ l Na- $\beta$ -glycerophosphate (stock 1M, Sigma) | lopullinen konsentraatio 10mM          |
| 70 $\mu$ l ascorbic acid (stock 50 mg/ml, Sigma)            | lopullinen konsentraatio 70 $\mu$ g/ml |
| 50 $\mu$ l dexamethasone (stock $10^{-5}$ M, Sigma)         | lopullinen konsentraatio $10^{-8}$ M   |

### ALP- lyysispuskuri, pH 7.6 (300 ml milli-Q:ta)

|   |             |
|---|-------------|
| 50 mM Tris-HCl (Mw 157.6, Sigma)                  | 2.364 g     |
| 0, 9 % NaCl (Mw 58.44, J.T Baker)                 | 2.7 g       |
| 0,1 % Triton X-100 (Sigma)                        | 300 $\mu$ l |
| Säädä ensin pH ja lisää vasta sitten Triton X-100 |             |

### ALP assay-puskuri, pH 9.7-10.0 (500 ml milli-Q:ta)

|  |          |
|--|----------|
| 0, 1 M Trizma base (Mw 121.14, Sigma)              | 6, 055 g |
| 1 mM $MgCl_2 \times 6 H_2O$ (Mw 203.30, J.T Baker) | 0, 102 g |

### **Von Kossa – liuokset**

2 % hopeanitraatti: 2 g  $\text{AgNO}_3$  (Mw 169.9 Sigma) 100 ml:aan milli-Q vettä, pimeään huoneenlämpöön

2,5 % natrium-tiosulfaatti: 3,9 g  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$  (Mw 248.18 Merck) 100 ml:aan milliQ-vettä, huoneenlämpöön

### **Oil Red O – liuokset**

Vakioliuos: 0,3 g Oil Red O pulveria ( $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}$ , Sigma) 100 ml:aan isopropanolia ( $(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$ , 2-propanol, J.T.Baker), pimeään huoneenlämpöön

Työliuos: 3 osaa Oil Red O vakioliuosta ja 2 osaa milliQ-vettä sekoita ja inkuboi huoneenlämmössä, filteröi ja käytä 2 h sisällä

## Bradford standardit

BSA standardiliuokset Bradfordin totaaliproteiini määrittelyä varten

Stock 10 mg/ml BSA:ta (Biorad) milli-Q veteen

| tehtävä standardi | standardi, jota käytetään liuotuksessa |            |   | milliQ-vesi |
|-------------------|--|------------|---|-------------|
| 10,0 mg/ml        | 10,0 mg/ml                             |            |   | -           |
| 2,0 mg/ml         | 0,2 ml                                 | 10,0 mg/ml | + | 0,8 ml      |
| 1,0 mg/ml         | 0,5 ml                                 | 2,0 mg/ml  | + | 0,5 ml      |
| 0,9 mg/ml         | 0,09 ml                                | 10,0 mg/ml | + | 0,91 ml     |
| 0,8 mg/ml         | 0,08 ml                                | 10,0 mg/ml | + | 0,92 ml     |
| 0,7 mg/ml         | 0,07 ml                                | 10,0 mg/ml | + | 0,93 ml     |
| 0,6 mg/ml         | 0,3 ml                                 | 2,0 mg/ml  | + | 0,7 ml      |
| 0,5 mg/ml         | 0,5 ml                                 | 2,0 mg/ml  | + | 0,5 ml      |
| 0,4 mg/ml         | 0,8 ml                                 | 0,5 mg/ml  | + | 0,2 ml      |
| 0,3 mg/ml         | 0,5 ml                                 | 0,6 mg/ml  | + | 0,5 ml      |
| 0,2 mg/ml         | 0,5 ml                                 | 0,4 mg/ml  | + | 0,5 ml      |
| 0,1 mg/ml         | 0,5 ml                                 | 0,2 mg/ml  | + | 0,5 ml      |
| 0,0 mg/ml         | -                                      |            |   |             |