

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja kemiantekniikka

2025

Maarit Taralainen

Apoptoosin mittausmenetelmien
testaus ja kehittäminen
kilpirauhas- ja
diabetessairauksien mekanismien
tutkimiseksi

Opinnäytetyö (AMK) | Tiivistelmä

Turun ammattikorkeakoulu

Bio- ja kemiantekniikka

2025 | 61 sivua

Maarit Taralainen

Apoptoosin mittausmenetelmien testaus ja kehittäminen kilpirauhas- ja diabetessairauksien mekanismien tutkimiseksi

Opinnäytetyössä tutkittiin haiman beetasolujen ja kilpirauhassolujen endoplasmakalvoston (ER) stressin aiheuttamaa apoptoosia eli ohjelmoitua solukuolemaa. Tutkimus toteutettiin Turun yliopiston Kilpirauhas- ja diabetestutkimusryhmän toimeksiannosta osana laajempaa projektia, jossa tutkitaan kilpirauhassairauksien geneettisiä taustatekijöitä sekä tyypin 1 diabeteksen syntymekanismeja. Malliorganismeina käytettiin kilpirauhassolulinjoja sekä beetasoluja.

Työn tavoitteena oli optimoida apoptoosin mittausmenetelmiä solulinjoissa. Apoptoosia tutkittiin altistamalla solumallit thapsigargiinille, joka käynnistää solukuoleman ER-stressin välityksellä. Soluvasteita analysoitiin IncuCyte-kuvantamisella, Hoechst- ja PI-värjäyksellä sekä Western blot -menetelmällä.

Tulokset osoittivat thapsigargiinikäsittelyn toimivan herkästi ja inhihoivan solujen proliferaatiota todennäköisesti apoptoosin induktion kautta. Tätä havaintoa tukivat myös värjäykseen perustuvat laskennalliset apoptoosiarviot, vaikka menetelmä vaatii vielä lisäoptimointia. Jatkotutkimuksissa pyritään kehittämään värjäysprotokollaa ja edistämään reaaliaikaiseen soluviljelyseurantaan soveltuvan menetelmän käyttöönottoa apoptoosin mittaamiseksi.

Asiasanat:

diabetes, kilpirauhassairaudet, haiman beetasolu, kilpirauhassolu, apoptoosi, thapsigargiini

Bachelor's Thesis | Abstract

Turku University of Applied Sciences

Biotechnology and Chemical Engineering

2025 | 61 pages

Maarit Taralainen

Testing and development of apoptosis measurement methods for study the mechanisms of thyroid and diabetes diseases

This thesis investigated ER stress-induced apoptosis in pancreatic beta cells and thyroid cells, focusing on programmed cell death as a key process in the development of thyroid diseases and type 1 diabetes. The study was conducted by the Thyroid and Diabetes Research Group at the University of Turku as part of a broader project exploring the genetic causes of thyroid diseases and the mechanisms underlying type 1 diabetes. Thyroid cell lines and beta cells were used as model organisms.

The goal of this study was to optimize apoptosis measurement methods in cell lines. Apoptosis was investigated by exposing the cell models to thapsigargin, which induces cell death via ER stress. Cellular responses were analyzed using IncuCyte imaging, Hoechst and PI staining, and Western blot analysis.

The results demonstrated that thapsigargin treatment inhibited cell proliferation effectively, likely through apoptosis induction. This finding was further supported by computational apoptosis quantification based on staining, though the method still requires optimization. Future studies aim to refine the staining protocol and develop a high-throughput method for real-time monitoring of apoptosis in cell cultures.

Keywords:

diabetes, thyroid diseases, pancreatic beta cell, thyroid cell, apoptosis, thapsigargin

Sisältö

1 Johdanto	7
2 Kilpirauhassairaudet, diabetes ja apoptoosi	8
2.1 Apoptoosi osana kehon normaalia toimintaa	8
2.2 Kilpirauhanen ja hormonien erityys	9
2.2.1 Kilpirauhassairaudet	10
2.3 Beetasolut ja insuliinin erityys	12
2.3.1 Diabetes	13
2.4 Endoplasmakalvoston stressi	14
2.4.1 ER-stressin vaikutus beetasoluihin	15
2.4.2 ER-stressin vaikutus kilpirauhassoluihin	16
2.5 Kilpirauhassolumalli	16
2.6 Beetasolumalli	17
3 Materiaalit ja menetelmät	19
3.1 Soluviljelmien aloitus ja ylläpito	19
3.1.1 Solujen valmistelu thapsigargiinikäsittelyä varten	20
3.2 Thapsigargiinikäsittely	22
3.2.1 Apoptoosivärjäys	22
3.2.2 Proteiinien eristys	23
3.2.3 Kokonaisproteiinimääritys	24
3.3 Western blot –menetelmä	25
3.3.1 Proteiinien erottelu	25
3.3.2 Proteiinien siirto kalvolle	26
3.3.3 Vasta-ainekäsittely	27
3.3.4 Visualisointi	28
3.3.5 Vasta-aineiden irrotus	29
4 Tulokset ja päätelmät	32
4.1 Apoptoosin kuvantaminen	32
4.2 Apoptoosin mittaaminen värjäyksillä	35

4.3 Western blot -analyysi	37
----------------------------	----

5 Yhteenveto	43
---------------------	-----------

Lähteet	46
----------------	-----------

Liitteet

Liite 1. Protokolla FRTL-5-solujen ylläpitoon.

Liite 2. Protokolla EndoC- β H1-solujen ylläpitoon.

Liite 3. Thapsigarginikäsittelyn laimennoskaavio.

Liite 4. BCA:n standardisuora ja laskut.

Kuvat

Kuva 1. Kilpirauhashormonien negatiivinen palautemekanismi (Cancer Research UK. 2014), CC BY 4.0, muokattu. 10

Kuva 2. Haiman ja Langerhansin saarekkeiden rakenne (Colorado community college system, n.d.) CC BY 4.0, muokattu. 12

Kuva 3. Thapsigarginin rakennekaava. 15

Kuva 4. Poistogeenisen FRTL-5-solulinjan validointi. 17

Kuva 5. FRTL-5-solujen morfologia, A) WT-linja, B) KO-linja. 20

Kuva 6. EndoC- β H1-solujen morfologia. 20

Kuva 7. Wester blot -menetelmän vaiheet. 25

Kuva 8. Kemiluminesenssireaktio (Syngene, n.d) muokattu. 29

Kuva 9. WT-solujen morfologiset muutokset thapsigarginikäsittelyn aikana. 33

Kuva 10. KO-solujen morfologiset muutokset thapsigarginikäsittelyn aikana. 34

Kuva 11. WT-solujen apoptoosivärjäys thapsigarginikäsittelyn jälkeen. 36

Kuva 12. KO-solujen apoptoosivärjäys thapsigarginikäsittelyn jälkeen. 36

Kuva 13. WT-solujen apoptoosivärjäys 0,5 μ M thapsigarginikäsittelyn jälkeen. 37

Kuva 14. Thapsigarginikäsiteltyjen WT- ja KO-solujen Wester blot -analyysi. 39

Kuviot

Kuvio 1. Thapsigargiini-käsiteltyjen WT- ja KO-solujen proliferaatiokäyrä.	35
Kuvio 2. Ki-67-proteiinin ilmentyminen thapsigargiini-käsitellyissä soluissa.	40
Kuvio 3. Bcl/xL-proteiinin ilmentyminen thapsigargiini-käsitellyissä soluissa.	41

Taulukot

Taulukko 1. Western blot -menetelmän primääri vasta-aineet.	30
Taulukko 2. Ki-67-proteiinin varianssianalyysi Western blot -tuloksista.	42
Taulukko 3. Bcl-xL-proteiinin varianssianalyysi Western blot -tuloksista.	42

Kaavat

Kaava 1. Solujen viljelytilavuuden laskeminen.	21
--	----

1 Johdanto

Tämä opinnäytetyö tehtiin toimeksiantona Turun yliopiston kliinisen laitoksen Kilpirauhas- ja diabetestutkimusryhmän ohjauksessa. Ryhmä keskittyy kilpirauhassairauksien genetiikkaan ja tyypin 1 diabeteksen tautimekanismeihin. Opinnäytetyö jatkaa ryhmässä aloitettua tutkimusta, jonka tavoitteena on tutkia tyypin 1 diabeteksen ja beetasolujen tuhoutumiseen vaikuttavia tekijöitä ja esimerkiksi liikunnan suojavaikutuksia diabeteksen hoitokeinona.

Tyypin 1 diabetekselle on tyypillistä haiman beetasolujen asteittainen tuhoutuminen niihin kohdistuvan autoimmuunireaktion, solukuoleman ja apoptoosin välityksellä. Beetasolujen tuhoutuminen johtaa insuliinin puutteeseen ja sen seurauksena verensokeripitoisuuksien nousuun ja diabeteksen oireisiin. Tämänhetkiset hoitokeinot ovat insuliinin puutteen korvausta ja vaativat jatkuvaa insuliinin annostelua ja sokerin seuranta. Vaikka diabeteslääkkeet voivat hallita sairautta, ne eivät estä beetasolujen tuhoutumista tai apoptoosia. Tästä syystä beetasolujen menetyksen ehkäiseminen olisi keskeistä diabeteksen puhkeamisen ehkäisemiseksi.

Tutkimusten (Coomans de Brachène, A. ym., 2022) mukaan liikunta voi edistää beetasolujen apoptoosilta suojaavien tekijöiden kehittymistä. Tutkimuksissa selvitettiin liikunnan vaikutuksia ihmisen beetasolujen apoptoosiin vertaamalla liikuntaa harrastaneiden ja kontrolliryhmän seerumin vaikutuksia beetasolujen apoptoosiin. Tutkimusryhmä on aiemmin toistanut tutkimusta ja kehittänyt sen menetelmiä beetasolujen apoptoosin tarkasteluun.

Tässä opinnäytetyössä pyritään optimoimaan apoptoosin mittaus soluviljelyolosuhteissa, jotta menetelmällä voitaisiin vertailla apoptoosiin vaikuttavia tekijöitä kilpirauhassairauksissa ja diabeteksessä. Tutkimuksessa optimoidaan apoptoosin mittausmenetelmiä testaamalla aluksi positiivisena kontrollina toimivan thapsigarginin vaikutusta Fisher-rotan (FRTL-5) kilpirauhassolulinjoilla, ja myöhemmin ihmisen beetasolulinjalla (EndoC- β H1). Solujen proliferaatiota ja apoptoosia tutkitaan IncuCyte-kuvantamisen, Hoechst- ja PI-värjäyksen sekä Western blot -menetelmän avulla.

2 Kilpirauhassairaudet, diabetes ja apoptoosi

Tässä kirjallisuuskatsauksessa tarkastellaan biologisia ja solubiologisia ilmiöitä, jotka liittyvät apoptoosiin, kilpirauhasen ja haiman beetasolujen toimintaan sekä endoplasmakalvoston stressiin. Aluksi perehdytään apoptoosin rooliin elimistön normaalissa toiminnassa. Tämän jälkeen kuvataan kilpirauhasen ja haiman keskeisiä toimintoja sekä niihin liittyviä sairauksia. Lopuksi käsitellään endoplasmakalvoston stressin taustalla olevia mekanismeja ja vaikutuksia kilpirauhas- ja beetasoluihin sekä esitellään opinnäytetyön kokeellisen osuuden solumallit.

2.1 Apoptoosi osana kehon normaalia toimintaa

Apoptoosi on geneettisesti säädelty solukuoleman muoto, jonka avulla elimistö poistaa tarpeettomia tai vaurioituneita soluja hallitusti. Tätä prosessia kutsutaan ohjelmoiduksi solukuolemaksi, koska sen vaiheet etenevät tarkasti säädellyssä järjestyksessä. (Bray, A. ym., 2010, 639.) Apoptoosilla on merkittävä rooli elimistön kehityksessä ja homeostaasin ylläpidossa. Se on aktiivinen jo alkionkehityksen aikana, jolloin se mahdollistaa muun muassa sormien eriytymisen. Aikuisella yksilöllä apoptoosi osallistuu solujen uusiutumiseen, immuunipuolustuksen säätelyyn ja vaurioituneiden solujen poistamiseen. Apoptoosin estyminen voi mahdollistaa vaurioituneiden solujen kertymisen ja hallitsemattoman jakautumisen, mikä voi liittyä syövän syntyyn. (Renehan, A. G. ym., 2001.)

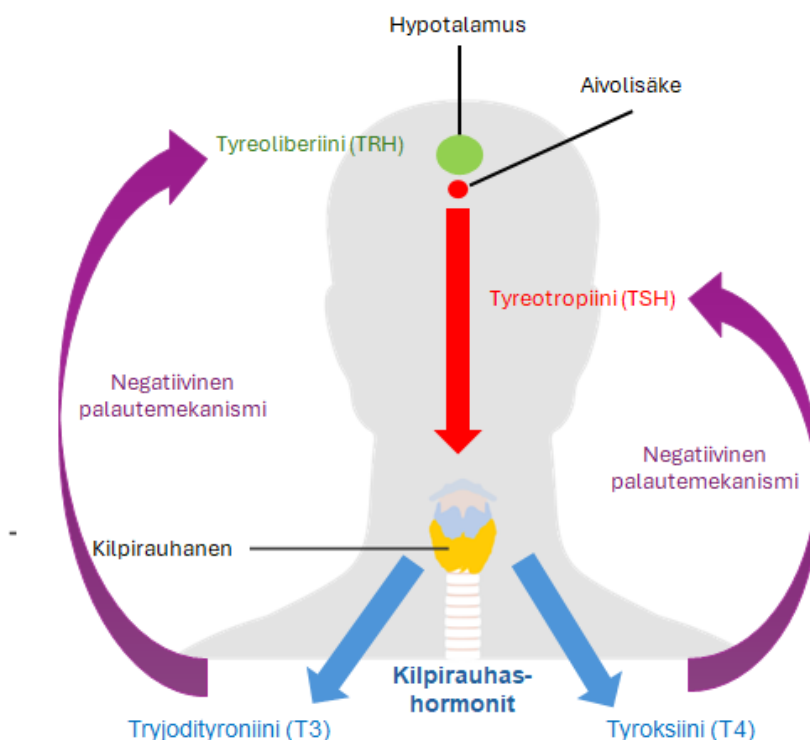
Apoptoosi käynnistyy useiden solunsisäisten ja -ulkoisten ärsykkeiden seurauksena. Keskeisiä säätelytekijöitä ovat Bcl-2-geeniperheen jäsenet, joista osa edistää ja osa estää apoptoosin käynnistymistä. Tärkeä säätelytekijä on myös p53-proteiini, jota kutsutaan kasvainten estäjäproteiiniksi. Se valvoo DNA:n eheyttä ja pyrkii korjaamaan mahdolliset vauriot. Mikäli vaurioita ei voida korjata, p53-proteiini estää solun jakautumisen ja käynnistää apoptoosin. (Renehan, A. G. ym., 2001.)

Apoptoosille on tunnusomaista tietyt solubiologiset muutokset, kuten solukalvon kuplautuminen, solun kutistuminen, kromatiinin tiivistyminen sekä DNA:n pilkkoutuminen. Lopulta solu hajoaa pieniksi osiksi, jotka immuunisolut eli fagosyytit poistavat kudoksesta ilman tulehdusreaktiota. Tämä erottaa apoptoosin nekroosista, jossa solun hajoaminen tapahtuu hallitsemattomasti ja solun sisältö pääsee kudoksiin aiheuttaen tulehdusta. (Bray, A. ym., 2010, 639.)

2.2 Kilpirauhanen ja hormonien erityys

Kilpirauhanen on perhosen muotoinen endokriininen rauhanen, joka sijaitsee kaulalla kurkunpään alapuolella. Sen tehtävänä on valmistaa, varastoida ja erittää kilpirauhashormoneja, jotka säätelevät koko elimistön aineenvaihduntaa. Kilpirauhashormonit vaikuttavat merkittävästi glukoosiaineenvaihduntaan eri elimissä, kuten haimassa, maksassa, suolistossa, lihaksissa, rasvakudoksessa ja keskushermostossa. (Young, S. E. ym., 2022.)

Kilpirauhanen tuottaa kahta hormonia: tryjodityroniinia (T3) ja sen varastomuotoa tyroksiinia (T4). Näiden hormonien tuotantoa stimuloi aivolisäkkeen erittämä tyreotropiini (TSH) joka stimuloi tai hillitsee T3- ja T4-hormoneja aivolisäkkeeseen kohdistuvan negatiivisen palautemekanismin kautta. Tyreotropiinia vapauttavaa tyreoliberiiniä (TRH) valmistuu hypotalamuksessa. TRH kulkeutuu aivolisäkkeen etulohkoon veren mukana porttilaskimojärjestelmää pitkin ja saa aikaan TSH:n erityksen. TSH kulkeutuu edelleen kilpirauhaseen, jossa se stimuloi TSH reseptorin välityksellä kilpirauhassoluja ja niiden muodostamia soluryppäitä tuottamaan ja vapauttamaan kilpirauhashormoneja verenkiertoon. Kun veren T3- ja T4-hormonipitoisuudet nousevat, ne vähentävät TRH:n tuotantoa hypotalamuksessa ja TSH:n eritystä aivolisäkkeessä. (Feldt-Rasmussen, U. ym., 2021.) Palautemekanismi on esitettyä visuaalisesti kuvassa 1.



Kuva 1. Kilpirauhashormonien negatiivinen palautemekanismi (Cancer Research UK. 2014), CC BY 4.0, muokattu.

2.2.1 Kilpirauhassairaudet

Hypertyreoosi on kilpirauhasen liikatoimintaan liittyvä sairaus, jossa kilpirauhanen tuottaa liikaa T3- ja T4-hormoneja. Yleisin hypertyreoosin aiheuttaja on Basedowin tauti, mutta harvinaisemmissa tapauksissa taustalla voi olla myös monikyhmystruuma. (Vitti, P. & Hegedüs, L., 2018, 218.)

Struumalla tarkoitetaan hyvänlaatuista, suurentunutta kilpirauhasta, jonka yleisin syy on liian vähäinen jodin saanti ravinnosta. Struuma koostuu usein erikokoisista kyhmyistä, jotka voivat olla myös nestettytteisiä.

Monikyhmystruumassa osa näistä kyhmyistä alkaa tuottaa liiallisesti kilpirauhashormoneja, mikä voi johtaa hypertyreoosiin. (Peltari, H., 2024.)

Hypertyreoosin tyypillisiä oireita ovat sydämen tiheälyöntisyys, kiihtynyt aineenvaihdunta ja painonlasku. Hoitomenetelminä käytetään lääkehoitoa,

radiojodihoitoa tai leikkausta tilanteen ja potilaan yksilöllisten tarpeiden mukaan. (Vitti, P. & Hegedüs, L., 2018, 343.)

Basedowin tauti (Gravesin tauti) on yleisin hypertyreoosin aiheuttaja ja kuuluu autoimmuunisairauksiin. Autoimmuunisairaus on tila, jossa kehon immuunijärjestelmä erehtyy tunnistamaan omia soluja tai kudoksia vieraisiksi ja hyökkää niitä vastaan. Taudissa elimistö tuottaa TSH-reseptorivasta-aineita (TSHRAb), jotka sitoutuvat kilpirauhassolujen TSH-reseptoreihin ja stimuloivat kilpirauhasen liikatoimintaa. Samalla potilaalla voi kehittyä silmäkuopan alueen autoimmuunisairaus, Basedowin silmäoireyhtymä. Tautiprosessi käynnistyy, kun T-solut tunnistavat silmien takaisten kudosten ja kilpirauhassolujen yhteisiä antigeenejä. Seurauksena on silmälihasten tulehdus ja turvotus, mikä voi vaurioittaa silmäkuopan kaikkia kudoksia. (Schalin-Jäntti, 2021.)

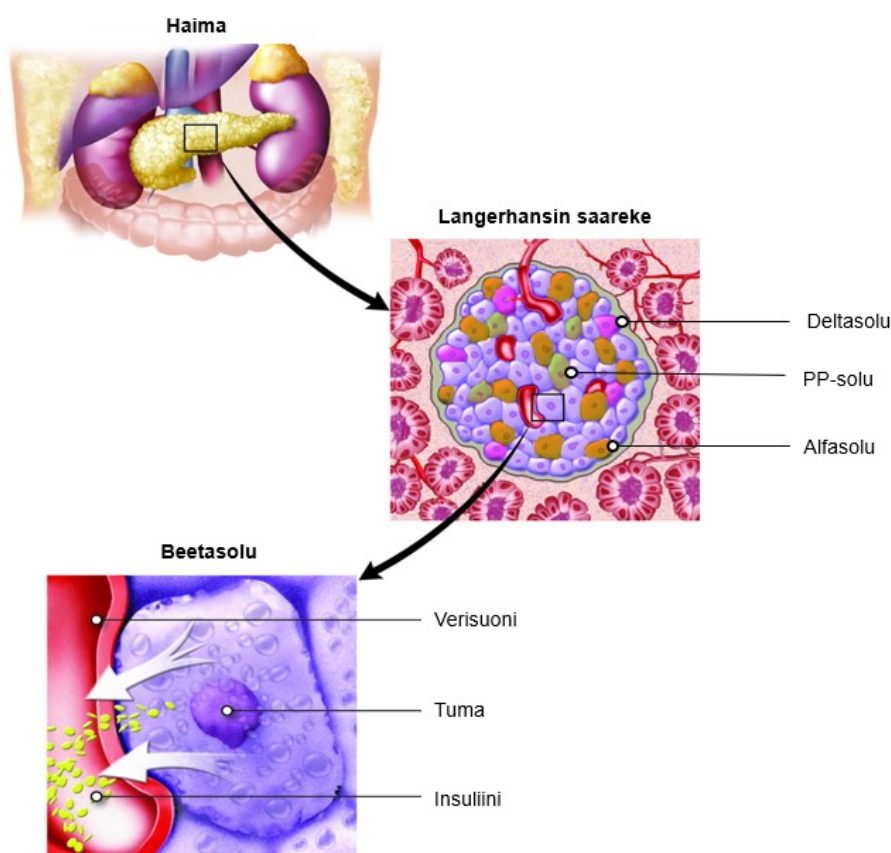
Kilpirauhasen vajaatoiminta, hypotyreoosi, syntyy, kun kilpirauhanen ei pysty tuottamaan normaalia määrää T₄-hormonia. Yleisin syy vajaatoimintaan on kilpirauhasen autoimmuunitulehdus (autoimmuunityreoidiitti). Muita syitä ovat kilpirauhasen liikatoiminnan radiojodihoito, kilpirauhasen poisto leikkauksella ja hyvin harvinaisessa tapauksessa aivolisäkkeen vajaatoiminta.

Kilpirauhashormonien puute hidastaa aineenvaihduntaa, mistä seuraa väsymystä, paleluherkkyyttä, painonnousua, ummetusta ja sydämen sykkeen hidastumista. Hypotyreoosin hoitona käytetään useimmiten synteettistä tyroksiinia, joka otetaan tabletteina kerran päivässä. (Vitti, P. & Hegedüs, L., 2018, 383.)

Autoimmuunityreoidiitti on kilpirauhasen tulehdustila, jolle on ominaista T- ja B-lymfosyyttien kertyminen kilpirauhaskudokseen. Tulehdus käynnistyy, kun T-lymfosyytit aktivoituvat tunnistessaan kilpirauhasen omia antigeenejä. Aktivoituneet T-solut tunkeutuvat kilpirauhaskudokseen ja vapauttavat sytokiineja, jotka laukaisevat kilpirauhassoluissa tulehdusreaktion ja apoptoosin. Tämän seurauksena kilpirauhanen voi joko surkastua tai suurentua struumaksi, jota kutsutaan Hashimoton tyreoidiitiksi. (Vitti, P. & Hegedüs, L., 2018, 208.)

2.3 Beetasolut ja insuliinin erityys

Beetasolut ovat yksi neljästä haiman Langerhansin saarekkeen solutyypistä, joista kukin erittää omaa hormoniaan verenkiertoon. Alfasolut tuottavat glukagonia, deltasolut somatostatiinia ja PP-solut haiman polypeptidiä. Beetasolujen osuus saarekkeen solumassasta on noin 60–80 % ja ne sijaitsevat kuvan 2 mukaisesti saarekkeen keskiosassa. (Otonkoski, T., 1998.) Beetasolujen päätehtävä on tunnistaa verensokerin muutokset ja vapauttaa insuliinia verenkiertoon (Barrett, K. E. ym., 2016).



Kuva 2. Haiman ja Langerhansin saarekkeiden rakenne (Colorado community college system, n.d.) CC BY 4.0, muokattu.

Insuliini on aminohapoista koostuva hormoni, joka laskee verensokeria lisäämällä glukoosin siirtymistä verestä solujen sisään. Lihas- ja rasvakudoksessa insuliini stimuloi glukoosinkuljettajien, erityisesti GLUT-4-proteiinien (engl. glucose transporter type 4) siirtymistä solukalvolle. Normaalisti

GLUT-4-proteiinit sijaitsevat solun sisäisissä rakkuloissa. Kun insuliini sitoutuu solun insuliinireseptoriin, fosfatidyli-inositoli 3-kinaasi (engl. phosphoinositide 3-kinase, PI3K) entsyymi aktivoituu ja saa GLUT-4-proteiinit siirtymään solukalvolle. Tämä mahdollistaa glukoosin kulkeutumisen solujen sisään helpotetun diffuusion avulla. Verensokeri laskee, kun glukoosi poistuu verenkierrosta ja siirtyy solujen käyttöön tai varastoitavaksi glykokeenina lihaksiin ja maksaan. Verensokerin laskiessa beetasolujen insuliinin eritysvähenee ja alfasolut erittävät verensokeria nostavaa glukagonia, joka vapauttaa varastosokeria maksasta verenkiertoon. (Barrett, K. E. ym., 2016.)

2.3.1 Diabetes

Diabetes on joukko sairauksia, joita yhdistää insuliinin puutteesta tai sen vaikutuksen puutteesta johtuva korkea verensokeripitoisuus. Tyypin 1 diabeteksessa kyse on absoluuttisen insuliinin puutteen tilasta, joka aiheutuu kehon autoimmuunihyökkäyksestä haiman beetasoluja vastaan (Szegezdi, E. ym., 2006). Sairaus diagnosoidaan yleisimmin lapsilla ja nuorilla aikuisilla, ja diagnoosihetkellä potilailla on yleensä hyvin vähän insuliinin tuotantoa jäljellä. Tämän vuoksi tyypin 1 diabeteksessa insuliini korvataan säännöllisillä ihonalaisilla injektioilla, minkä lisäksi verensokeritasoja on seurattava säännöllisesti. (King Aileen JF, 2012.)

Tyypin 2 diabeteksessa on kyse suhteellisen insuliinin puutteesta, joka johtuu beetasolujen toimintahäiriöstä ja apoptoosista sekä insuliinin vaikutuksen heikentymisestä lisääntyneen glukoosin ja tyydyttyneiden rasvahappojen yhteisvaikutuksen vuoksi (Szegezdi, E. ym., 2006). Tyypin 2 diabetesta diagnosoidaan yleisimmin keski-ikäisillä aikuisilla, mutta alkamisikä on laskussa liikalihavuuden lisääntyessä. Vaikka sairauden kehittyminen on osittain perinnöllistä, sairastumisen riski kasvaa kuitenkin suhteessa painoaineksiin. Sairauteen liittyvää heikentynyttä insuliinivastetta on mahdollista parantaa laihduttamalla ja liikkumalla. Jos tämä ei onnistu, on tyypin 2 diabeteksen hoitoon saatavilla myös useita eri insuliinin vaikutusta, insuliiniresistenssiä tai sokerin poistumista lisääviä lääkkeitä. (King Aileen JF, 2012.) Nämä eivät

kuitenkaan pääsääntöisesti ehkäise sairauteen liittyvää beetasolujen apoptoosia.

2.4 Endoplasmakalvoston stressi

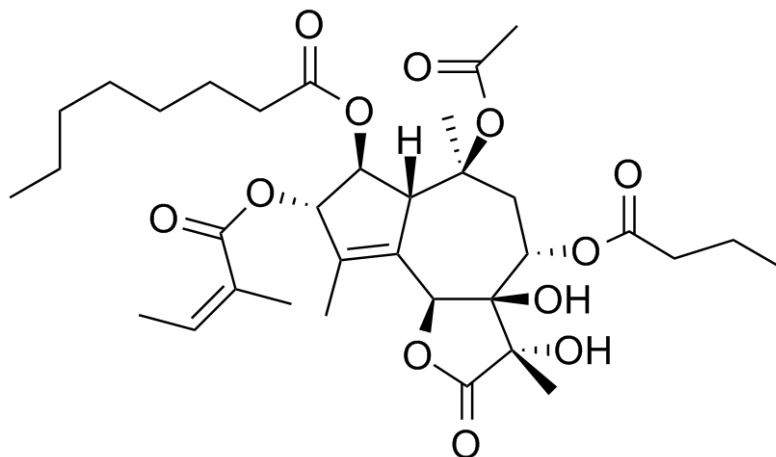
Endoplasmakalvosto (engl. endoplasmic reticulum, ER) on erittyneiden ja kalvoon sitoutuneiden proteiinien synteesi- ja laskostumispaikka ja sen laadunvalvontamekanismit ylläpitävät homeostaasia proteiinisynteesin tarpeen ja laskostumiskapasiteetin välillä. Proteiinien oikea laskostuminen ja disulfididostosten muodostuminen edellyttävät tarkkaa ATP:n, kalsiumionien sekä hapetus-pelkistysreaktioiden hallintaa. Näiden vaatimusten vuoksi endoplasmakalvoston sisäinen ympäristö on poikkeuksellisen herkkä häiriöille. Kun tämä tasapaino järkkyy, proteiinien laskostumiskyky heikkenee ja johtaa laskostumattomien proteiinien kertymiseen endoplasmakalvostoon. Tätä kutsutaan ER-stressiksi. (Szegezdi, E. ym., 2006.)

Endoplasmakalvoston reseptorit havaitsevat ER-stressin alkamisen ja käynnistävät laskostumattoman proteiinivasteen (engl. unfolded protein response, UPR) palauttaakseen endoplasmakalvoston normaalin toiminnan (Szegezdi, E. ym., 2006). Aluksi laskostumaton proteiinivaste saa aikaan adaptiivisen vasteen, joka tehostaa laskostumista avustavien proteiinien eli kaperonien sekä proteiineja prosessoivien entsyymien toimintaa. Tätä seuraa proteiinisynteesin väheneminen, johon liittyy translaation heikkeneminen ja mRNA:n hajottaminen. Viimeisenä laskostumaton proteiinivaste pyrkii parantamaan virheellisesti laskostuneiden proteiinien hajotusta ja poistoa. (Fonseca, S. G. ym., 2012.) Jos stressi pitkittyy tai adaptiivinen vaste epäonnistuu, seurauksena on apoptoosi (Szegezdi, E. ym., 2006).

ER-stressin voivat laukaista myös ulkoiset kemialliset ärsykkeet. Yksi tunnetuimmista on thapsigargiini ($C_{34}H_{50}O_{12}$), joka estää endoplasmakalvoston kalsium-ATPaasipumpun (engl. sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase, SERCA) toimintaa. Tämän seurauksena kalsiumia vapautuu ER:n sisäontelosta, mikä häiritsee kalsiumriippuvaisten

laskostumisavustajaproteiinien toimintaa. Tuloksena virheellisesti laskostuneita proteiineja alkaa kertyä ER:ään, mikä käynnistää ER-stressireaktion.

(Chidawanyika, T. ym., 2018.) Thapsigarginin rakennekaava on esitettyinä kuvassa 3.



Kuva 3. Thapsigarginin rakennekaava.

2.4.1 ER-stressin vaikutus beetasoluihin

Beetasoluissa ER-stressin aiheuttaman apoptoosin on havaittu olevan merkittävä tekijä tyyppin 1 ja 2 diabetekseen sairastumisessa. Haiman beetasoluissa endoplasmakalvosto on erityisen tärkeä insuliinin kokoamisessa ja prosessoinnissa, minkä vuoksi beetasolut ovat alttiita insuliinituotannon aiheuttamille häiriöille. (Fonseca, S. G. ym., 2012.) Normaalisti beetasolut reagoivat veren glukoositasojen muutoksiin suhteellisella insuliinin synteesillä ja erityksellä. Kuitenkin lisääntynyt insuliinin tarve insuliiniresistenssin aikana tai solumassan menetys autoimmuunihiyökkäyksen seurauksena aiheuttaa lisääntynyttä synteettistä tarvetta jäljellä oleville beetasoluille, mikä laukaisee ER-stressin. (Kulkarni, A., 2022.) Tämä voi johtaa laskostumattoman tai virheellisesti laskostuneen insuliinin esiasteen, proinsuliinin, kertymiseen endoplasmakalvostoon ja ER-stressiin (Fonseca, S. G. ym., 2012).

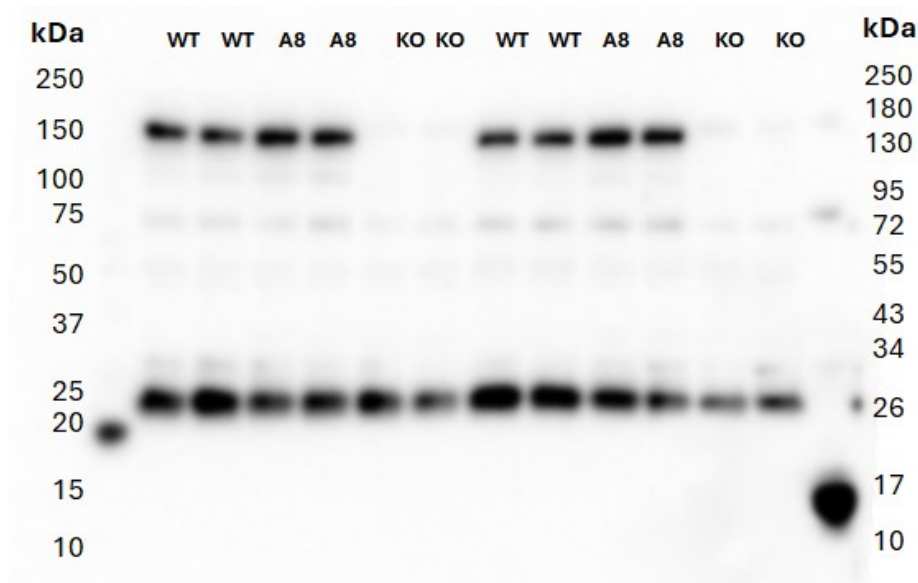
2.4.2 ER-stressin vaikutus kilpirauhassoluihin

Kilpirauhasen solut ovat erikoistuneet tuottamaan ja erittämään tyreoglobuliinia, joka on kilpirauhashormonien esiaste. Tyreoglobuliini on vaikeasti laskostuva proteiini ja siten herkkä rakenteellisille muutoksille. Tämä voi estää tyreoglobuliinin etenemisen solussa ja johtaa sen kertymiseen endoplasmakalvostoon ja aiheuttaa ER-stressiä. Mekanismi on tunnettu syy synnyntäiseen kilpirauhasen vajaatoimintaan, jolle on tunnusomaista krooninen ER-stressi kilpirauhassoluissa. Toisin kuin diabeteksessä, stressi ei yleensä ole haitallista kilpirauhassoluille itsessään. Väärinlaskostunut tyreoglobuliini aiheuttaa kilpirauhasen vajaatoimintaa, mikä puolestaan lisää TSH-hormonin määrää. Tämä hormoni stimuloi kilpirauhassolujen kasvua, ja seurauksena voi olla struuma. Jos ER-stressi kuitenkin jatkuu pitkään, solut voivat mennä apoptoosiin. Jos uusia soluja ei synny riittävästi korvaamaan kuolleita, kudoksen toiminta heikkenee, kuten haiman beetasolut diabeteksessä. (Morishita, Y. ym., 2020.)

2.5 Kilpirauhassolumalli

Tässä opinnäytetyössä kilpirauhasmallina käytettiin tutkimusryhmän aiemmissa projekteissa hyödynnettyjä FRTL-5-solulinjoja, jotka on alun perin eristetty kuuden viikon ikäisten Fisher-rottien kilpirauhasesta. FRTL-5-solut ovat vakiintunut ja laajasti hyväksytty malli kilpirauhasen toiminnan tutkimuksessa, sillä ne ovat stabiileja ja säilyttävät hyvin erilaistuneiden kilpirauhassolujen ominaisuudet, kuten tyreoglobuliinin erityksen ja kyvyn ottaa jodia. (Ambesi-Impiombato, F. S. ym., 1980.) Tässä työssä viljeltiin kahta FRTL-5-solulinjaa: villityypistä (WT) ja poistogeenistä (KO) linjaa. Poistogeenisestä linjasta on poistettu USP47-entsyymiä (engl. ubiquitin-specific peptidase 47) koodaava geeni, joka osallistuu kasvainsolujen proliferaatioon, etäpesäkkeiden muodostumiseen sekä lääkeresistenssin syntyyn (Kailing ym., 2021).

Opinnäytetyön aluksi suoritettiin poistogeenisen solulinjan validointi Western blot -menetelmällä. Validointi on tärkeää tehdä säännöllisesti, koska solulinjoja viljellään usein rinnakkain, jolloin erityisesti poistogeeninen linja voi olla altis kontaminaatiolle. Western blot -kalvo käsiteltiin validointia varten USP47-proteiinin tunnistavalla primäärivasta-aineella (Genetex, Cat. GTX106253, 1:2000, 157 kDa), joka on esitettyä kuvassa 4. Kalvolla ovat rinnakkaisina näytteinä villityyppinen (WT), poistogeeninen (KO) sekä kontrollisolulinja (A8). Kuvasta havaitaan USP47-proteiinille tyypillinen vyöhyke noin 157 kDa:n WT- ja A8-näytteissä, mutta ei KO-näytteissä. Koska USP47:tä tunnistavalla vasta-aineella ei havaita proteiinin ilmentymistä KO-linjassa, voidaan todeta, että kyseinen linja on poistogeeninen USP47-geenin suhteen. A8- ja WT-linjat ilmensivät USP47-proteiinia samankaltaisesti, joten kokeellinen osuus päätettiin toteuttaa ainoastaan WT- ja KO-solulinjoilla.



Kuva 4. Poistogeenisen FRTL-5-solulinjan validointi.

2.6 Beetasolumalli

Perinteisin ja biologisesti merkityksellisin beetasolujen tutkimusmalli on ihmisen primääriset saarekkeet, jotka eristetään aivokuolleilta elinluovuttajilta. Tämän lisäksi on kehitetty kantasoluista johdettuja saarekkeitä, joita voidaan tuottaa

ihmisen alkion kantasoluista (engl. human embryonic stem cells, hESC) tai indusoitavista pluripotenteista kantasoluista (engl. human induced pluripotent stem cells, hiPSC). (Halliez ym. 2023.)

Tämän opinnäytetyön beetasolumallina käytettiin tutkimusryhmän EndoC- β H1-soluja, jotka ovat Human Cell Designin kehittämiä. EndoC- β H1 on yksi ensimmäisistä ihmisen sikiön haimakudoksesta johdetuista beetasolulinjoista. Soluja on geneettisesti muokattu siirtämällä niihin peräkkäin SV40LT-onkogeeni (engl. simian vacuolating virus 40 large T antigen) ja ihmisen telomeraasin käänteiskopioijaentsyymi (engl. human telomerase reverse transcriptase, hTERT) käyttäen lentivirusvektoreita, jotka ovat retrovirusten alaryhmään kuuluvia viruksia. Näiden geenien ilmentymistä säätelee rotalta peräisin oleva insuliinigeenin promoottori, mikä varmistaa, että geenit aktivoituvat ainoastaan insuliinia tuottavissa soluissa. (Halliez, C. ym., 2023.)

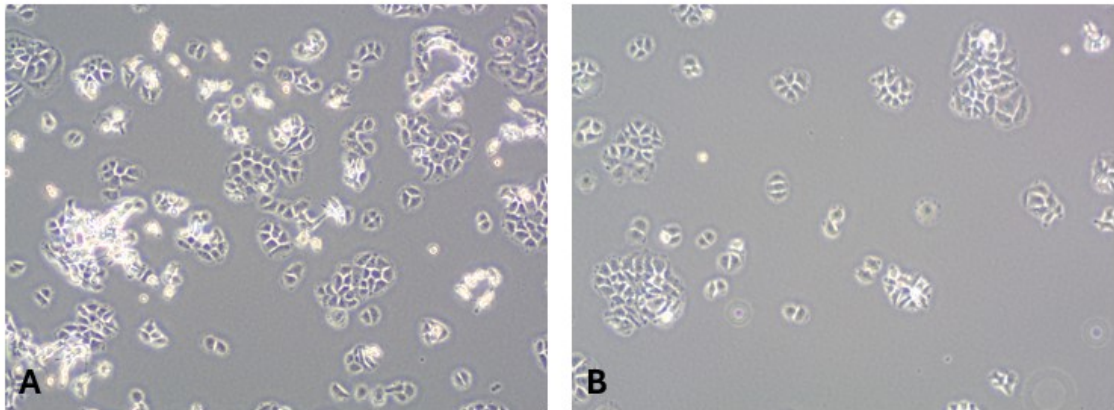
3 Materiaalit ja menetelmät

Luvussa kuvataan työn käytännön toteutus, jonka tavoitteena oli tutkia thapsigargiinin aiheuttamaa apoptoosia. Thapsigargiinin pitoisuuden optimointi toteutettiin FRTL-5-solulinjoilla, jotka ovat nopeakasvuisempia ja käsittelyltään yksinkertaisempia kuin beetasolut. Beetasolut sisällytettiin työhön kuitenkin solujen ylläpidon muodossa. Thapsigargiinin vaikutuksia tutkittiin eri pitoisuuksilla, ja vasteita seurattiin IncuCyte-kvantamisjärjestelmän avulla. Tulosten arviointiin käytettiin Hoechst- ja PI-värjäystä sekä Western blot -analyysiä valituilla apoptoosimarkkereilla.

3.1 Soluviljelmien aloitus ja ylläpito

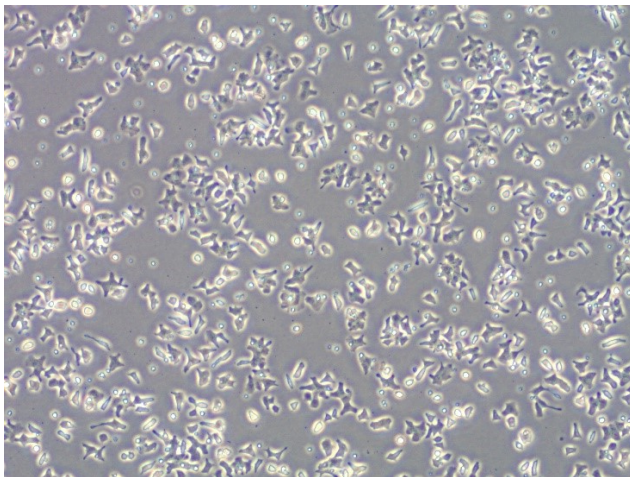
FRTL-5- ja beetasolujen viljely aloitettiin nestetyössä säilötyistä solukannoista. Solujen sulattamisen jälkeen viljelmiä ylläpidettiin viikoittaisella alaviljelyllä ja elatusaineen säännöllisellä vaihdolla. Viljelmien aktiivinen ylläpito ehkäisee ravinteiden ehtymistä, pH:n vaihtelua sekä aineenvaihduntatuotteiden ja kuolleiden solujen kertymistä kasvualustaan, mikä tukee solujen optimaalista kasvua ja elinkelpoisuutta (Cell culture company, 2025). Tarkemmat protokollat solulinjojen aloituksesta ja ylläpidosta on esitetty liitteissä 1 (FRTL-5-solut) ja 2 (beetasolut).

FRTL-solut ovat morfologialtaan pyöreitä ja kooltaan pienempiä kuin useimmat viljellyt solut. Viljelyssä solut muodostavat usein pesäkkeitä, jotka voivat kasvaa ja sulautua toisiinsa muodostaen suurempia solurykelmiä. Pitkäaikaisessa viljelyssä ja korkealla solutiheydellä FRTL-solut eivät enää laajene yksikerroksisesti täyttäen tyhjiä alueita, vaan alkavat kasvaa päällekkäin muodostaen kolmiulotteisia rakenteita. (Ambesi-Impimbato, F. S. ym., 1980.) FRTL-5-solulinjat on esitetty kuvassa 5, jossa näkyvät 4× -suurennoksella otetut mikroskooppikuvat.



Kuva 5. FRTL-5-solujen morfologia, A) WT-linja, B) KO-linja.

EndoC- β H1-solut eroavat kasvutavaltaan FRTL-5-soluista. Ne muodostavat monikerroksisia viljelmiä, joissa solut ovat tiiviisti yhteydessä toisiinsa. Solujen muoto on tyypillisesti epiteelimäinen, ja ne järjestäytyvät muodostaen yhtenäisiä solumattoja (Human Cell Design, 2021). 4 \times -suurennoksella otettu mikroskooppikuva EndoC- β H1-soluista on esitettyä kuvassa 6.



Kuva 6. EndoC- β H1-solujen morfologia.

3.1.1 Solujen valmistelu thapsigargiinikäsittelyä varten

Solut viljeltiin thapsigargiinikäsittelyä varten 48-kuoppalevyllä (Thermo Fisher, Cat: 152640), mikä mahdollisti useiden rinnakkaisten käsittelyiden ja kontrollien toteuttamisen samanaikaisesti. FRTL-5-solujen viljely aloitettiin liitteessä 1

mainitulla alaviljelyllä. Tämän jälkeen solut kerättiin falcon-putkeen ja konsentroidiin sentrifugoimalla 200 x g nopeudella kolmen minuutin ajan. Supernatantit poistettiin, ja solupelletit resuspendoitiin 1 ml:aan tuoretta elatusainetta. Solujen laskentaa varten valmistettiin 1:1-laimennos sekoittamalla 10 µl trypan blue -liuosta (Bio-Rad, Cat: #1450021) ja 10 µl solususpensiota. Seos sekoitettiin varovasti, ja siitä pipetoitiin 10 µl solulaskentalevyille (Bio-Rad TC10, Cat: #1450011).

Trypan blue on synteettinen solujen ja kudosten värjäysaine. Se ei läpäise ehjää solukalvoa, mutta pääsee sisään kuolleen tai vaurioituneen solun makromolekyyleihin, värjäten solun siniseksi. (Patsnap Synapse, 2024.) Laskemiseen käytettiin automaattista solulaskuria (TC20, Bio-Rad), joka hyödyntää mikroskopjaa ja automaattitarkennusta solujen laskemiseen (Bio-Rad, n.d.). Algoritmi tunnistaa ja laskee erikseen elävät värittömät solut sekä kuolleet siniset solut, jolloin se pystyy laskemaan sekä kokonaissolumäärän että elävien solujen osuuden. Laite antaa tulokset yksikössä soluja/ml, jota käytetään kaavassa 1 solujen siirtotilavuuden laskemiseen. 48-Kuoppalevyllä siirtotilavuus laskettiin 30 000 solua kohti.

$$V = \frac{N}{C}$$

Kaava 1. Solujen viljelytilavuuden laskeminen.

jossa

V on tarvittava siirtotilavuus (ml)

N on haluttu kokonaismäärä (soluja)

C on solujen pitoisuus alkuperäisessä suspensiossa (soluja/ml)

WT- ja KO-solulinjat viljeltiin lasketussa siirtotilavuudessa neljänä rinnakkaisena näytteenä kolmea käsittelypitoisuutta varten. Tämän jälkeen solujen annettiin kiinnittyä inkubaattorissa (+ 37 °C, 5 % CO₂) 48 tunnin ajan.

3.2 Thapsigargiinikäsittely

Thapsigargiinikäsittely tehtiin soluille 48 tunnin kiinnittymisen jälkeen.

Käsittelyliuokset (0 μM , 0,5 μM ja 2 μM) valmistettiin liitteen 3 mukaisesti laimentamalla thapsigargiini (Sigma-Aldrich, Cat: T9033-5MG, 10 mM) ja dimetyylisulfoksidi eli DMSO (Sigma-Aldrich, Cat: 200-664-3, 100 %) FRTL-5-solujen elatusaineeseen. Soluviljelmien vanha elatusaine poistettiin ja korvattiin tuoreella käsittelyliuoksella. Lisäyksessä käytettiin sähköistä yksikanavapipettiä (Sartorius, 10–300 μl) multi dispense asetuksella; ejection 1, suction 4. Kuoppalevyä pidettiin solujen irtoamisen välttämiseksi vaakatasossa koko käsittelyn ajan.

Thapsigargiinin vaikutuksia seurattiin reaaliaikaisella kuvantamislaitteella (IncuCyte S3, Sartorius), joka on inkubaattoriin sijoitettava reaaliaikaiseen elävien solujen kuvantamiseen tarkoitettu järjestelmä. Laite ottaa ajastettuja kuvia, joiden avulla voidaan tuottaa kvantitatiivista tietoa solujen käyttäytymisestä (Najid, M., 2025). Laite mahdollistaa myös solujen proliferaatio- eli jakaantumiskäyrien tekemisen, joiden avulla pystytään tarkastelemaan eri muuttujien vasteita kuvantamisen aikana. Solut asetettiin inkubaattorissa (+ 37 °C, 5 % CO₂) IncuCyte-laitteeseen välittömästi thapsigargiinin lisäämisen jälkeen. Kuvantamista tehtiin 24 tunnin ajan standardiskannauksella, jossa otettiin neljä kuvaa kuoppaa kohden kuuden tunnin välein 10 \times -suurennoksella.

3.2.1 Apoptoosivärjäys

Solut värjättiin 24 tuntia thapsigargiinin lisäämisen jälkeen käyttäen Hoechst- ja propidiumjodidivärjäystä (engl. propidium iodide, PI), joka on yleisesti käytetty menetelmä apoptoosin tunnistamiseen. Menetelmä mahdollistaa elävien solujen sekä varhaisessa että myöhäisessä apoptoosissa olevien solujen erottamisen, mikä oli oleellista thapsigargiinin vasteen arvioimisessa. Propidiumjodidi on punainen fluoresoiva DNA-väri, joka ei läpäise elävien solujen ehjää solukalvoa.

Se värjää ainoastaan solut, joiden solukalvon läpäisevyys on lisääntynyt, kuten apoptoottiset ja nekroottiset solut. Hoechst 33342 on sininen fluoresoiva tumaväri, joka pystyy läpäisemään myös elävien solujen solukalvon. Näin ollen Hoechst värjää sekä elävät että apoptoottiset solut, kun taas PI sitoutuu vain niihin, joiden solukalvo on vaurioitunut. Varhaisessa apoptoosissa solukalvo säilyy vielä ehjänä, mikä estää PI:n pääsyn soluun. Kuitenkin DNA:n kondensoitumisen vuoksi nämä solut fluoresoivat Hoechst-värjäyksessä kirkkaammin kuin terveet solut. (Warnes, G., 2016.)

Värjäysliuos valmistettiin sekoittamalla FRTL-5-solujen elatusaineeseen Hoechst-väriä (Invitrogen, Cat: H3570, 10 mg/ml) laimennussuhteessa 1:1000 sekä propidiumjodidia (Sigma-Aldrich, Cat: 81845-25MG, 1 mg/ml) suhteessa 1:200. Kuoppalevyiltä poistettiin käsittelyliuokset ja korvattiin valmistetulla värjäysliuoksella. Liuoksen lisäyksessä käytettiin sähköistä yksikanavapipettiä (Sartorius, 10–300 µl), jossa oli käytössä multi dispense asetukset; ejection 1, suction 4. Kuoppalevyä pidettiin koko käsittelyn ajan vaakatasossa. Värjäyksen annettiin vaikuttaa 15 minuutin ajan valolta suojattuna. Inkuboinnin jälkeen värjäysliuos poistettiin, ja kuopat huuhdeltiin kahdesti fosfaattipuskuroidulla suolaliuoksella (engl. phosphate-buffered saline, PBS). Lopuksi kuoppiin lisättiin tuoretta elatusainetta ja solut kuvattiin fluoresenssimikroskoopilla 10× -suurennoksella (EVOS M5000, Thermo Scientific) käyttäen seuraavia eksitaatio- ja emissioaallonpituuksia: 365 nm ja 461 nm Hoechstile sekä 546 nm ja 617 nm propidiumjodidille.

3.2.2 Proteiinien eristys

Western blot -menetelmää varten 24 tunnin ajan thapsigarginilla käsitellyt FRTL-5-solut hajotettiin, ja soluproteiinit eristettiin kemiallisella hajotuksella. Eristyksessä käytettiin RIPA-puskuria, johon oli lisätty PI-puskuria sisältävä proteaasineestäjätabletti (Roche, Cat: 04693159001). RIPA-puskuri (engl. radioimmunoprecipitation assay buffer) on hajotusliuos, joka on suunniteltu nisäkässolujen hajotukseen ja proteiinien liuottamiseen. PI-puskuri (engl. protease inhibitor buffer) puolestaan sisältää proteaasien estäjiä, jotka estävät

proteiinien peptidisidosten pilkkoutumista. käytetyssä liuoksessa estäjät kohdistuivat erityisesti seriini- ja kysteiiniproteaaseihin. Kuoppalevy asetettiin jäälle, minkä jälkeen elatusaine poistettiin. Kuopat huuhdeltiin PBS:llä ja korvattiin RIPA+PI-puskurilla Solut irrotettiin mekaanisesti solukaapimella, ja lysaatit kerättiin automaattipipetillä eppendorf-putkiin. Lysaatteja sekoitettiin ja homogenisoitiin + 4 °C:ssa jääkaapissa 30 minuutin ajan. Tämän jälkeen näytteitä sekoitettiin uudelleen ja sentrifugoitiin + 4 °C:ssa 16000 x g nopeudella 20 minuutin ajan. Sentifugoinnin jälkeen supernatantit kerättiin kokonaisproteiini määrittystä varten.

3.2.3 Kokonaisproteiinimääritys

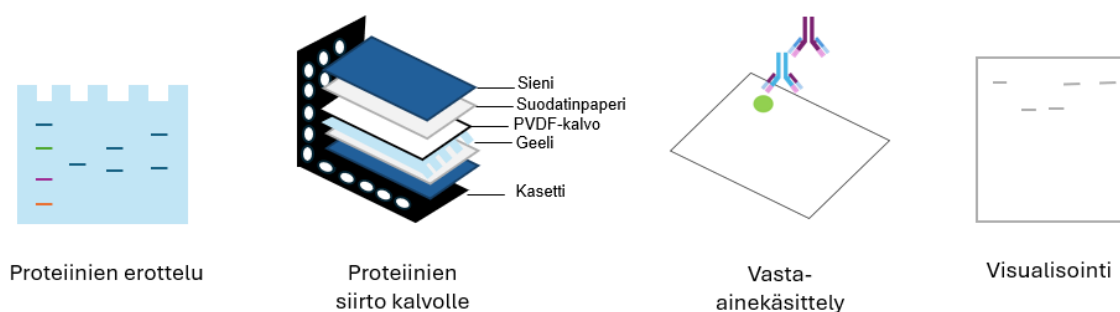
Näytteiden kokonaisproteiinipitoisuudet määritetään Western blot -analyysiä varten, jotta näytteiden proteiinimäärät voidaan tasata ennen geelin lataamista. Tasaus on olennainen vaihe, sillä se varmistaa, että näytteiden väliset erot proteiinien ilmentymistasoissa johtuvat biologisista tekijöistä eivätkä satunnaisista vaihteluista proteiinipitoisuuksissa. (Mahmood, T. & Yang, P., 2012.) Tässä työssä kokonaisproteiinipitoisuus määritettiin BCA-menetelmällä (engl. bicinchoninic acid assay), joka perustuu biureettireaktioon. Reaktiossa proteiinien peptidisidokset pelkistävät kupari(II)ionit (Cu^{2+}) kupari(I)ioneiksi (Cu^+), jotka muodostavat BCA-reagenssin kanssa voimakkaan purppuranvärisen kompleksin. Kompleksin absorbanssi mitataan 562 nm aallonpituudella. (Thermo Fisher Scientific, n.d.-a.)

Näytteet laimennettiin 96-kuoppalevyllä (Thermo Scientific, Pierce BCA-RAC Assay, Cat: 10166393) 1:4-suhteessa lisäämällä 6,25 μl proteiininäytettä ja 18,75 μl RIPA+PI-puskuria kahtena rinnakkaisena näytteenä. Standardisuora valmistettiin BCA-kitin (Thermo Scientific, Pierce BCA Protein Assay Kit, Cat: 10741395) ohjeiden mukaisesti 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ naudan seerumialbumiinin kantaliuoksesta (engl. bovine serum albumin, BSA). Nollanäytteenä käytettiin 25 μl RIPA+PI-puskuria. Sekä näytteisiin että standardeihin lisättiin 200 μl värireagenssia, minkä jälkeen liuokset sekoitettiin pipetoimalla ylös ja alas automaattipipetillä. Valmisteltua kuoppalevyä pidettiin ravistelijassa 30 sekunnin

ajan ja inkuboitii valolta suojattuna 37 °C:ssa 30 minuutin ajan. Absorbanssit mitattiin monileimalukijalla (Victor X4, Perkin Elmer) käyttäen 570 nm aallonpituutta ja 1 sekunnin mittausaika. Standardisuora ja taustakorjatut tulokset on esitetty liitteessä 4.

3.3 Western blot –menetelmä

Western blot -menetelmää hyödynnetään spesifisten kalvoon sitoutuneiden proteiinien tunnistamiseen. Menetelmä perustuu vasta-aineen ja antigeenin väliseen spesifiseen vuorovaikutukseen, mikä mahdollistaa kohdeproteiinien tunnistamisen monimutkaisista proteiiniseoksista ja solulysaateista. (Thermo Fisher Scientific, 2014, 2.) Menetelmä koostuu kuvan 7 mukaisista päävaiheista: proteiinien erotuksesta koon perusteella, siirrosta kiinteälle kalvolle ja kohdeproteiinin visualisoinnista primaaristen ja sekundaaristen vasta-aineiden avulla (Abcam, n.d.).



Kuva 7. Wester blot -menetelmän vaiheet.

3.3.1 Proteiinien erottelu

Western blot -menetelmän ensimmäinen vaihe on erotusvaihe, jossa proteiinit erotellaan kokonsa mukaan denaturoivalla geielektroforeesilla (Thermo Fisher Scientific, 2014, 6). Yleisimmin käytetty menetelmä on SDS-PAGE (engl. sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis), jossa proteiinit erottuvat sähkökentän vaikutuksesta molekyylikokonsa perusteella. Pienemmät proteiinit pääsevät kulkeutumaan geelin huokosissa suurempia proteiineja

helpommin, jolloin pienemmät proteiinit etenevät geelillä suurempia pidemmälle. (Azure biosystems, n.d.)

Ennen geielektroforeesia proteiininäytteet valmisteltiin sekoittamalla ne näytepuskuriin ja 6XSDS-liuokseen (Thermo Scientific, Cat: R1151). Natriumdodekyylisulfaatti (engl. sodium dodecyl sulfate, SDS) sitoutuu proteiineihin ja päällystää ne negatiivisesti varautuneilla molekyyleillä, peittäen niiden luonnollisen varauksen. Käytetty 6XSDS-liuos sisältää myös pelkistävää β -merkaptetoetanolia, joka katkaisee disulfididokset proteiinien rakenteista. Näytteet kuumennetaan + 95 °C:ssa, mikä tehostaa SDS:n vaikutusta ja hajottaa proteiinien sekundääri- ja tertiäärirakenteet lineaarisiksi ketjuiksi. Tämä on oleellista proteiinien tunnistamisen kannalta, sillä vasta-aineet sitoutuvat tyypillisesti proteiinin spesifiseen osaan eli epitooppiin. Kun proteiinit denaturoidaan, epitooppi paljastuu, mikä mahdollistaa kohdeproteiinin tehokkaan tunnistamisen. (Abcam, n.d.)

Näytteet valmisteltiin liitteen 4 kokonaisproteiinimäärityksen tulosten ja laskujen perusteella 28 μ l:n kokonaistilavuuteen, ottaen huomioon käytetyn geelin (Bio-Rad, 4–20 % TGX, Cat: #3450033) kaivojen 30 μ l enimmäistilavuus. Proteiinimääräksi valittiin 18 μ g, koska se on yleisesti käytetty määrä, joka tarjoaa riittävän herkkyuden proteiinien havaitsemiseksi ilman, että signaali ylittyy tai geelin erotuskyky heikkenee (Mahmood, T. & Yang, P., 2012). Näytteet ja proteiinimarkkeri ladattiin geelille liitteessä esitetyn järjestyksen mukaisesti. Elektroforeesi aloitettiin 80 V jännitteellä, kunnes näytteet ja markkerit olivat siirtyneet pois kaivoista. Tämän jälkeen jännitettä nostettiin 120 V:iin ja ajoa jatkettiin, kunnes näyterintama ja markkerit saavuttivat geelin alareunan.

3.3.2 Proteiinien siirto kalvolle

Elektroforeesin jälkeen seuraa siirtovaihe, jonka tavoitteena on siirtää geelissä erotellut proteiinit kiinteälle tukimatriksille. Tässä työssä siirto toteutettiin märkäsiirtomenetelmällä polyvinylideenidifluoridi (engl. polyvinylidene difluoride, PVDF) kalvolle (Merck Millipore, 0,45 μ m, Cat: IPVH00005). Märkäsiirtoa

suositellaan erityisesti suurikokoisten proteiinien siirtämiseen, sillä se on vähemmän altis kalvon kuivumisesta johtuvalle epäonnistumiselle (Abcam, n.d.). Geeli, PVDF-kalvo ja suodatinpaperit leikataan sopivan kokoisiksi, tasapainotetaan ja puristetaan siirtopuskurissa (1×Tris-glysiinipuskuri) niin kutsutuksi ”voileiväksi” sienten väliin. Voileipä asetetaan kasetissa siirtopuskurissa täytettyyn ajoaltaaseen, johon kohdistetaan sähkökenttä. (Thermo Fisher Scientific, 2014, 11.) SDS:n vaikutuksesta negatiivisesti varautuneet proteiinit liikkuvat kohti positiivista elektroodia, mutta sitoutuvat matkallaan PVDF-kalvoon (Abcam, n.d.). Geeliä ajettiin kalvolle 80 V jännitteellä huoneen lämmössä kahden tunnin ajan. Siirron jälkeen kalvo huuhdeltiin MilliQ-vedellä ravistelijassa viiden minuutin ajan ja värjättiin Ponceau Red -liuoksella kahden minuutin ajan proteiinivyöhykkeiden havaitsemiseksi. Värjäyksen jälkeen kalvo pestiin ensin MilliQ-vedellä kahden minuutin ajan, ja tämän jälkeen kahdesti viiden minuutin ajan 1×TBST (0,05 % Tween 20) liuoksella ravistelijassa.

3.3.3 Vasta-ainekäsittely

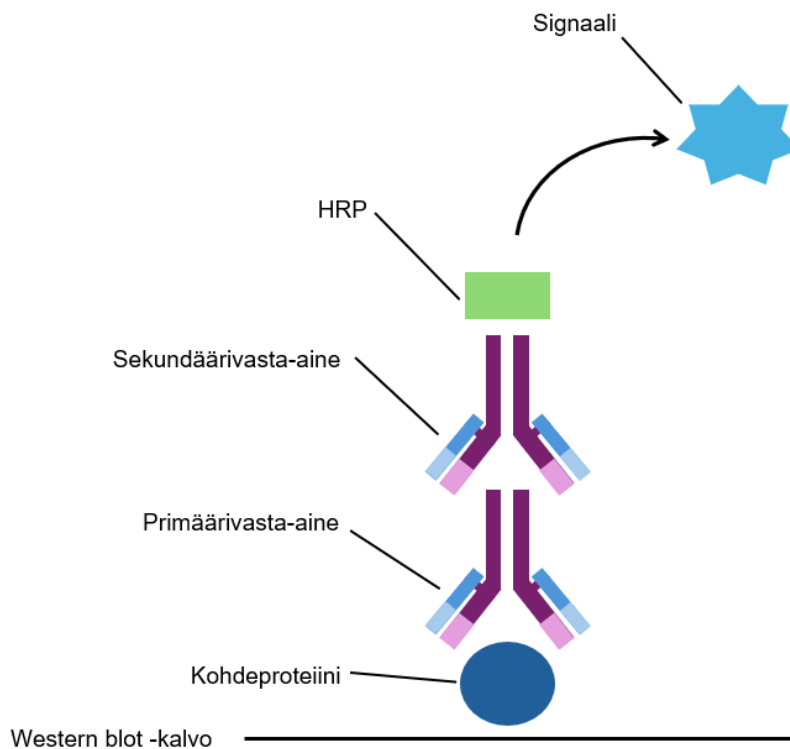
Vasta-ainekäsittely alkaa estovaiheella. Tällä estetään ei-toivottujen molekyylien sitoutuminen kalvolle, jotta vasta-aineet voivat tunnistaa kohdeproteiinin tarkasti (Azure Biosystems, n.d.). Kalvoa käsiteltiin 1 tunti 15 minuuttia ravistelijassa estopuskurissa (5 % rasvaton maito 1×TBST-liuoksessa). Estovaiheen jälkeen kalvolle lisättiin primäärivasta-aine, joka tunnistaa kohdeproteiinin selektiivisesti ja sitoutuu siihen. Primäärivasta-aine laimennettiin estopuskuriin ja inkuboitiiin + 4 °C:ssa rullakeinuttajassa yön yli.

Primäärivasta-ainekäsittelyn jälkeen ylimääräinen ja sitoutumaton vasta-aine poistettiin huuhtelemalla kalvoa kolme kertaa viiden minuutin ajan 1×TBST-liuoksessa ravistelijassa. Tämän jälkeen kalvolle lisättiin entsyymillä merkattu sekundäärinen vasta-aine, joka tunnistaa primäärivasta-aineen. Käytössä oli kanin IgG -sekundäärivasta-aine, joka oli konjugoitu HRP:llä (Cell Signaling technology, Cat: 7074S) 1:3000 laimennoksena estopuskurissa. Vasta-ainetta inkuboitiiin rullakeinuttajassa tunnin ajan huoneenlämmössä. Inkubaation

jälkeen ylimääräinen vasta-aine poistettiin huuhtelemalla kalvoa neljä kertaa viiden minuutin ajan 1×TBST-liuoksessa ravistelijassa.

3.3.4 Visualisointi

Konjugoitujen vasta-aineiden visualisoinnissa hyödynnettiin vahvistettua kemiluminesenssireaktiota (engl. enhanced chemiluminescence, ECL). ECL-liuos valmistettiin Western Lightning Plus ECL -reagenssisarjasta (PerkinElmer, Cat: NEL104001EA), joka sisältää piparjuuriperoksidaasin (engl. horseradish peroxidase, HRP) substraatteja ja luminolia. HRP katalysoi luminolin hapettumisen, jolloin syntyy viritystilassa oleva yhdiste 3-aminoftalaatti. Tämä yhdiste emittoi valoa noin 425 nm aallonpituudella palatessaan perustilaansa. Valon emissio tapahtuu kuvan 8 mukaisesti entsyymi-substraattireaktion aikana ja lakkaa, kun substraatti on kulunut loppuun. (Sino Biological, n.d.) Kalvolle lisättiin ECL-reagenssia ja annettiin vaikuttaa ravistelijassa minuutin ajan. Kemiluminesenssisignaalin havaitsemiseen ja kalvojen kuvantamiseen käytettiin biomolekyylikuvantamislaitetta (Sapphire Imager FL, Azure biosystems) yksittäisellä automaattivalotusasetuksella ja alasäädetyllä valotusasetuksella.



Kuva 8. Kemiluminesenssireaktio (Syngene, n.d) muokattu.

3.3.5 Vasta-aineiden irrotus

Primääri- ja sekundäärivasta-aineet irrotetaan Western blot -kalvolta poistokäsittelyllä, mikä mahdollistaa saman kalvon käytön eri proteiinien tunnistamiseen. Poistokäsittely voidaan suorittaa joko miedolla tai voimakkaalla menetelmällä. Miedot menetelmät, kuten tässä työssä käytetty, perustuvat usein glysiini-SDS-puskuriin. Menetelmää voidaan toistaa useita kertoja, mutta jokainen poistokäsittelykierros voi heikentää signaalin voimakkuutta ja lisätä taustasignaalia. (Abcam, n.d.) Vasta-aineet poistettiin kalvosta 1 % SDS:ää sisältävällä poistopuskurilla ravistellen kaksi kertaa seitsemän minuutin ajan. Tämän jälkeen kalvo huuhdeltiin kaksi kertaa kymmenen minuutin ajan 1×PBS-liuoksella ja lopuksi kaksi kertaa viiden minuutin ajan 1×TBST-liuoksella. Tämän jälkeen kalvolle inkuboitiin uusia primäärivasta-aineita, ja aiemmin mainitut vaiheet toistettiin, alkaen estovaiheesta.

Western blot -menetelmän primäärivasta-aineet

Työssä käytettiin kolmea primäärivasta-ainetta, joista yksi toimi latauskontrollina. Käytetyt vasta-aineet ja niiden tiedot ovat lueteltuna taulukossa 1.

Taulukko 1. Western blot -menetelmän primäärivasta-aineet.

Vasta-aine	Klooni	Valmistaja ja kataloginumero	Laimennos
Ki-67	Mouse/rat	eBioscience (14-5698-82)	1:1000
Bcl/xL	Rabbit	Santa Cruz Biotechnology (7195)	1:200
Beta-tubulin	Rabbit	Cell Signaling Technology (2128S)	1:1000

Ki-67 on solusykliin liittyvä tumaproteiini, jonka molekyylipaino on 300 kDa. Ki-67 esiintyy kaikissa aktiivisen solusyklin vaiheissa, mutta puuttuu lepäävistä soluista. Solusyklistä riippuva ilmentyminen tekee siitä käyttökelpoisen erityisesti kasvaintutkimuksessa, jossa Ki-67-leimausindeksi toimii indikaattorina solupopulaation proliferaatioaktiivisuudesta. (Thermo Fisher Scientific, n.d.-c.)

Bcl-xL on Bcl-2-proteiiniperheeseen kuuluva mitokondrion kalvoproteiini, joka säätelee solunsisäistä apoptoosireittiä. Bcl-xL estää apoptoosin etenemistä sitoutumalla proapoptoottisiin proteiineihin, kuten Badiin ja Baxiin, ja estämällä niiden toiminnan. Bad voi dimerisoitumalla Bcl-xL:n kanssa vapauttaa Baxin, mikä edistää apoptoosia. Baxin sitoutuessa Bcl-xL:n kanssa Baxin apoptoosia edistävä aktiivisuus estyy, mikä edistää solun selviytymistä stressitilanteissa.

Bcl-xL:n teoreettinen molekyylipaino on 30 kDa. (Stevens, M. & Oltean, S., 2019.)

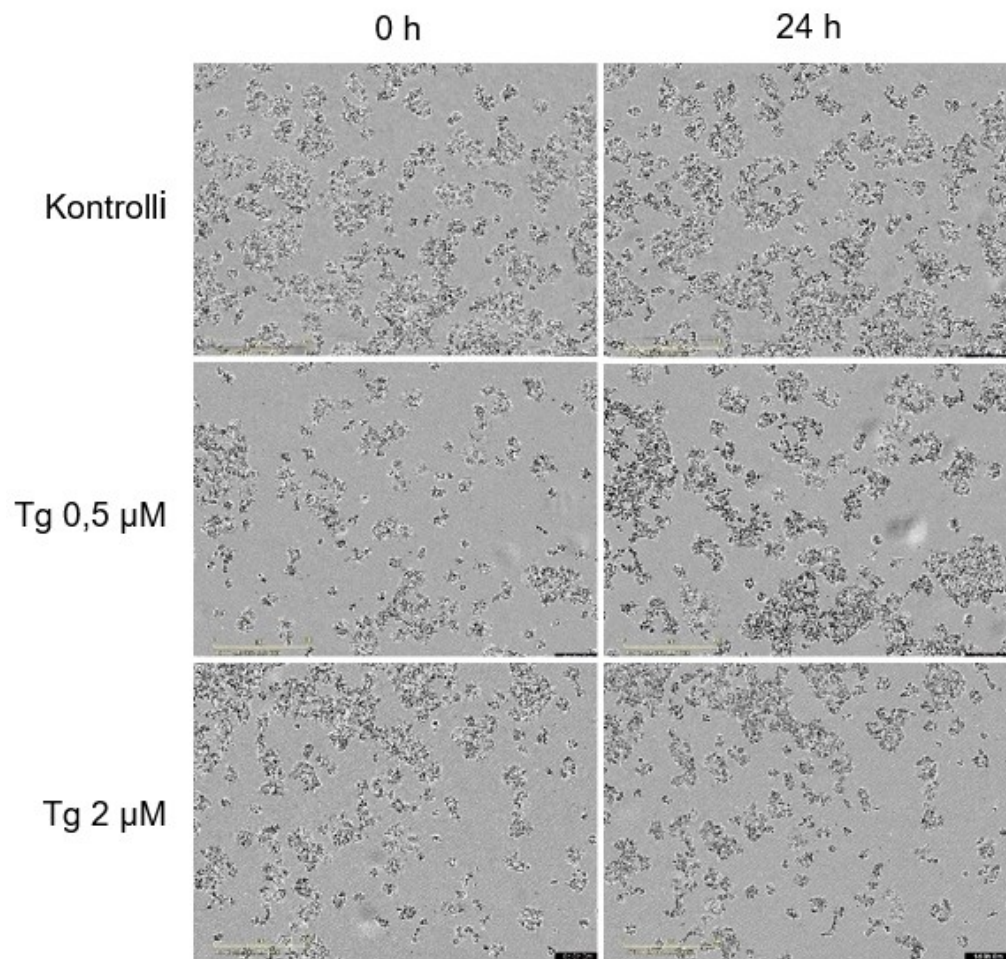
Beta-tubulin on 55 kDa:n kokoinen proteiini, joka muodostaa Alfa-tubuliinin kanssa tubuliinidimeerin eli mikrotubulusten perusrakenteen. Koska Beta-tubuliinia esiintyy runsaasti useimmissa eukaryoottisoluissa, sitä käytetään Western blot -analyseissä sisäisenä kontrollina. Sen avulla voidaan varmistaa, että kaikkiin näytteisiin on ladattu yhtä paljon kokonaisproteiinia ja niiden ilmentymistä voidaan verrata luotettavasti. (Thermo Fisher Scientific, n.d.-b.)

4 Tulokset ja päätelmät

Luvussa esitetään kokeellisin menetelmin saadut tulokset FRTL-5-solujen thapsigargiinikäsittelystä. Tulokset kerättiin reaaliaikaisen IncuCyte-kuvantamisen, Hoechst- ja PI-värjäyksen sekä Western blot -analyysin avulla. Tulosten perusteella pyrittiin selvittämään thapsigargiinin sopiva käsittelypitoisuus sekä tunnistamaan mahdollisia eroja villityypin ja poistogeenisen solulinjan apoptoosivasteissa.

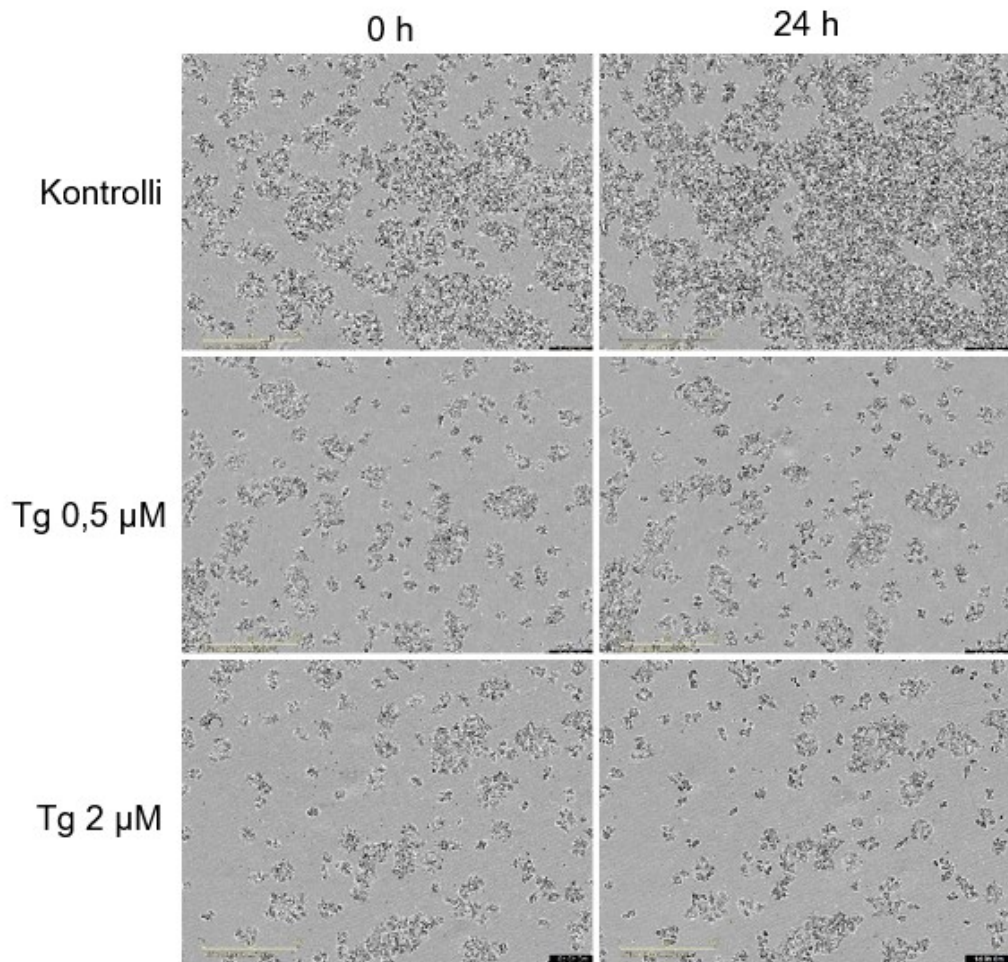
4.1 Apoptoosin kuvantaminen

Thapsigargiinin aiheuttamaa apoptoosivastetta seurattiin IncuCyte-kuvantamisella. WT-solulinjan kuvantamistulokset 0 ja 24 tunnin aikapisteistä thapsigargiinikäsittelyn ajalta on esitetty kuvassa 9. Kontrollisoluissa havaitaan normaalia solunjakautumista koko seuranta-ajan. Sen sijaan thapsigargiinilla (Tg) käsitellyissä soluissa esiintyy lisääntyntä apoptoosia, mikä ilmenee tummina pisteinä 24 tunnin kuvassa.



Kuva 9. WT-solujen morfologiset muutokset thapsigargiinikäsittelyn aikana.

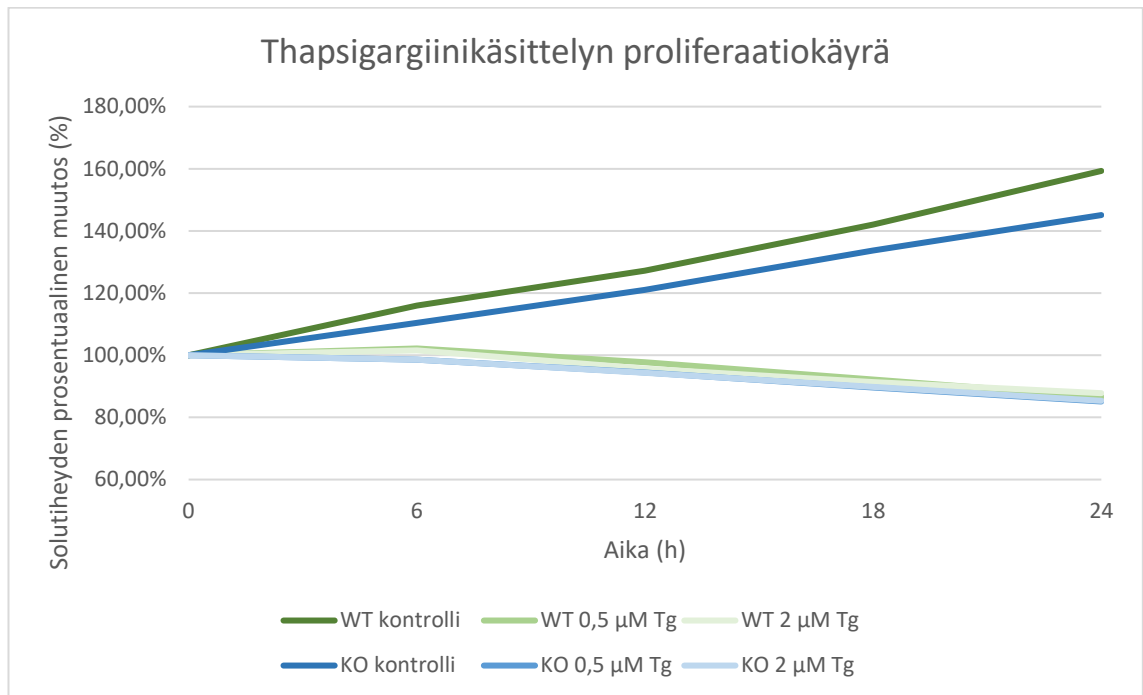
Myös poistogeenisessä solulinjassa kontrollisolut jakautuivat normaalisti, mikä on nähtävissä kuvasta 10. Thapsigargiinikäsittellyissä soluissa havaitaan jonkin verran apoptoosia 24 tunnin kohdalla, mutta vaste on lievempi kuin villityypin solulinjassa.



Kuva 10. KO-solujen morfologiset muutokset thapsigargiinikäsittelyn aikana.

IncuCyte-kvantamisen perusteella laadittiin kuvion 1 mukainen proliferaatiokäyrä, jossa esitetään solutiheyden prosentuaalinen muutos ajan funktiona. Sekä villityypin että poistogeenisen solulinjan kontrollikäyrissä havaitaan lähes lineaarinen kasvu koko mittausjakson ajan. Tämä osoittaa, että kontrollisoluiissa ei esiinny merkittävää stressiä ja että solut ovat säilyttäneet normaalin jakaantumiskapasiteettinsa kokeen aikana. Thapsigargiinilla käsitellyissä soluissa sen sijaan havaitaan voimakas proliferaation väheneminen kuuden tunnin kohdalla, minkä jälkeen solutiheys laskee lähes lineaarisesti. Tämä viittaa siihen, että thapsigargiini on tehokkaasti estänyt solujen jakautumisen ja indusoinut apoptoosia molemmissa solulinjoissa 0,5 μM ja 2 μM pitoisuuksilla. Thapsigargiinikäsittelyjen tai solulinjojen välillä ei havaita merkittävää eroa. Tämä viittaa siihen, että thapsigargiini on saavuttanut

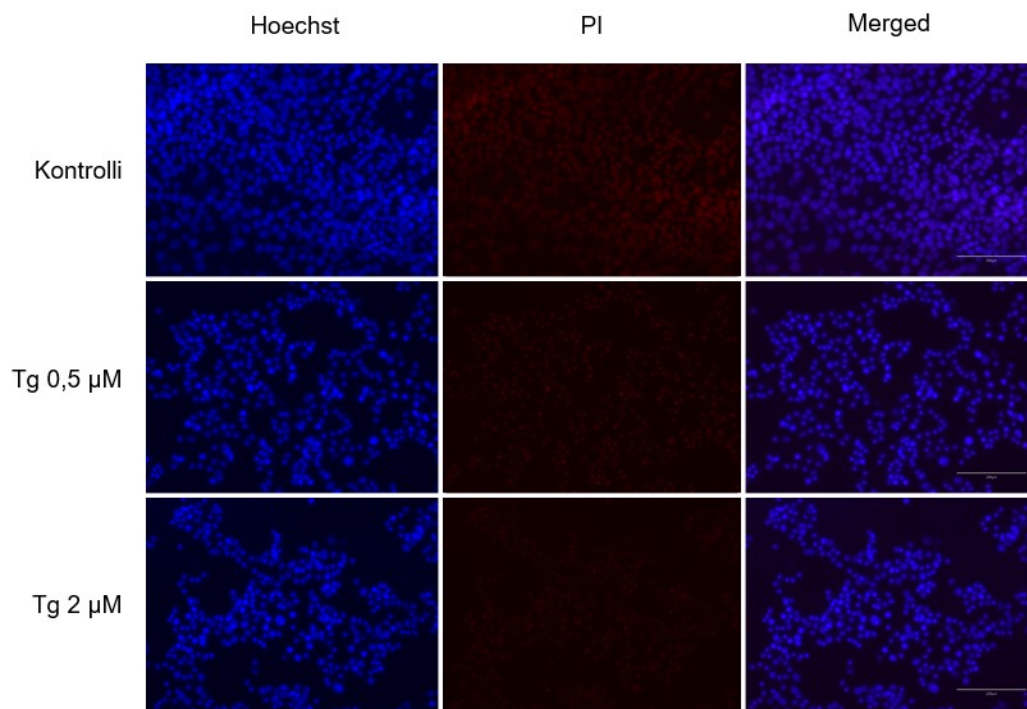
maksimaalisen vaikutuksensa jo matalammalla pitoisuudella, eikä suurempi annos enää lisää vaikutusta kummassakaan solulinjassa.



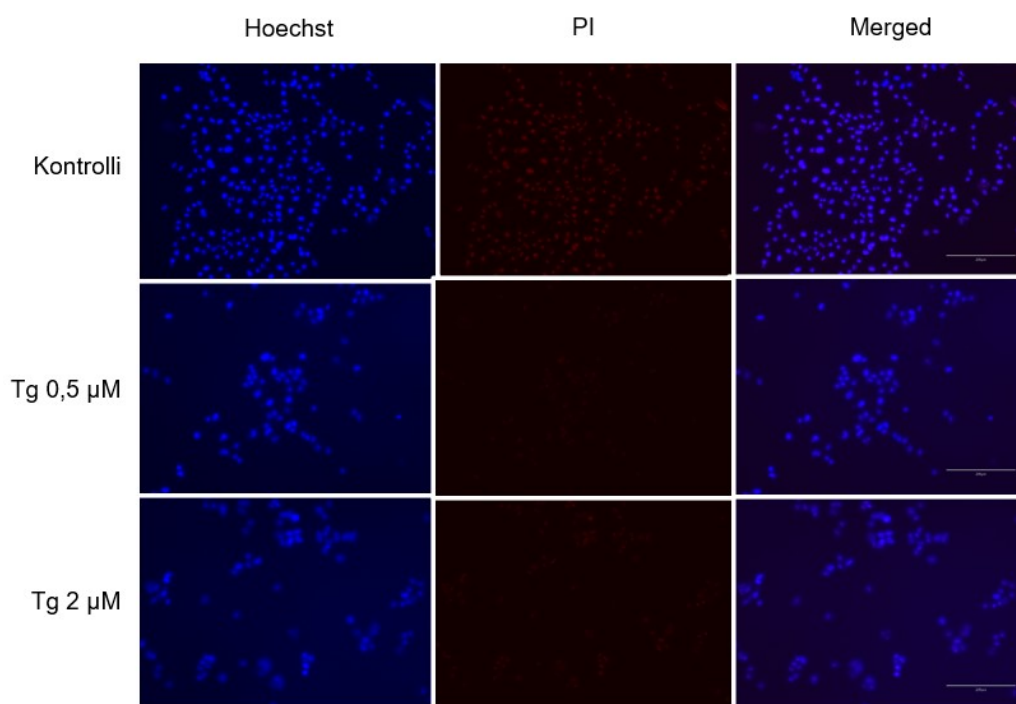
Kuvio 1. Thapsigargiinikäsitellyjen WT- ja KO-solujen proliferaatiokäyrä.

4.2 Apoptoosin mittaus värjäyksillä

Soluille tehtiin apoptoosivärjäys 24 tunnin thapsigargiinikäsittelyn jälkeen. WT-solulinjan Hoechst- ja PI-värjäysten tulokset on esitettyä kuvassa 11. Thapsigargiinilla käsitellyissä Merged-kuvissa tulisi näkyä punaista PI-värjäytymistä apoptoosin merkinä. Kuitenkin selkeästi erottuvia punaisia pisteitä ei juuri havaita. Samankaltainen tulos havaitaan myös poistogeenisessä solulinjassa, kuten kuvassa 12 esitetään. Hoechst-värjäys toimii hyvin ja tumat erottuvat sinisinä, mutta propidiumjodidin värjäysteho vaikuttaa jäävän heikoksi.

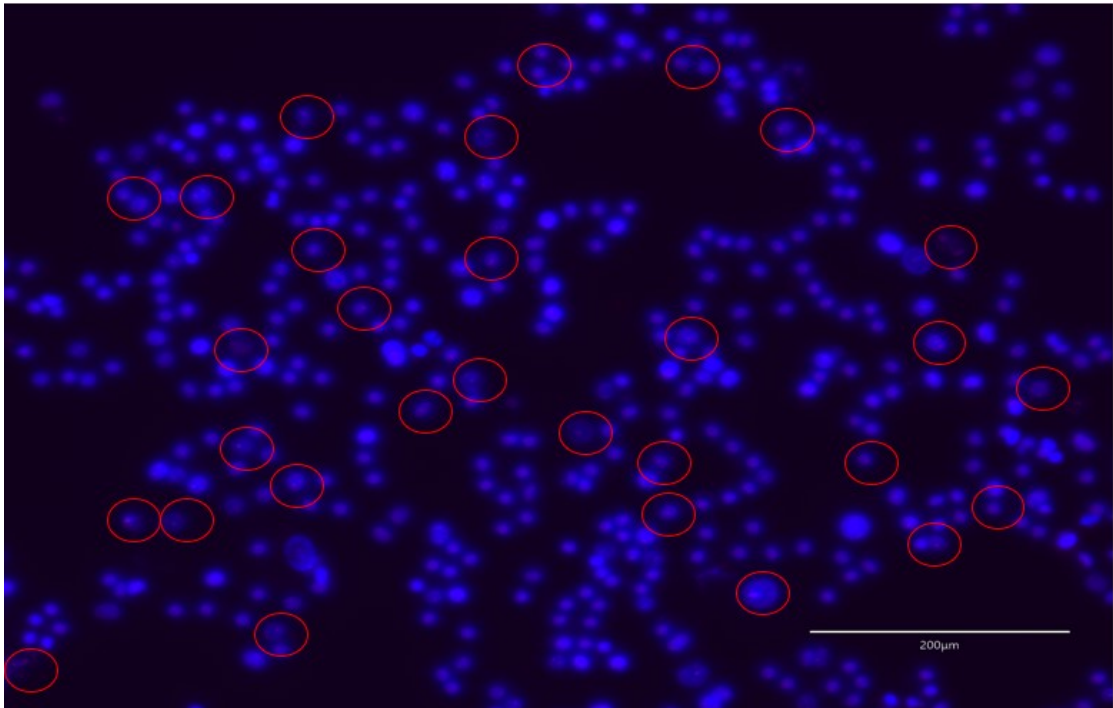


Kuva 11. WT-solujen apoptoosivärjäys thapsigargiinikäsittelyn jälkeen.



Kuva 12. KO-solujen apoptoosivärjäys thapsigargiinikäsittelyn jälkeen.

Myöhäisen apoptoosin vaiheita oli havaittavissa suurennetusta WT-linjan Merged-kuvasta 0,5 μM thapsigargiinikäsittelyssä. Tätä havainnollistaa kuva 13, jossa apoptoottiset solut on merkitty ympyröimällä. Vaikka värjäyksen kontrasti on heikko ja PI-signaali erottuu huonosti, yksittäisiä apoptoottisia soluja on silti havaittavissa. Kontrastin puutteen vuoksi tulkinta on haasteellista, eikä havainto ole yhtä selkeä kuin IncuCyte-analyysissä. Varhaista apoptoosia ilmentäviä kirkkaansinisiä tumafragmenteja on jonkin verran, mutta niiden erottaminen elävien solujen sinisistä tumista on vaikeaa.



Kuva 13. WT-solujen apoptoosivärjäys 0,5 μM thapsigargiinikäsittelyn jälkeen.

4.3 Western blot -analyysi

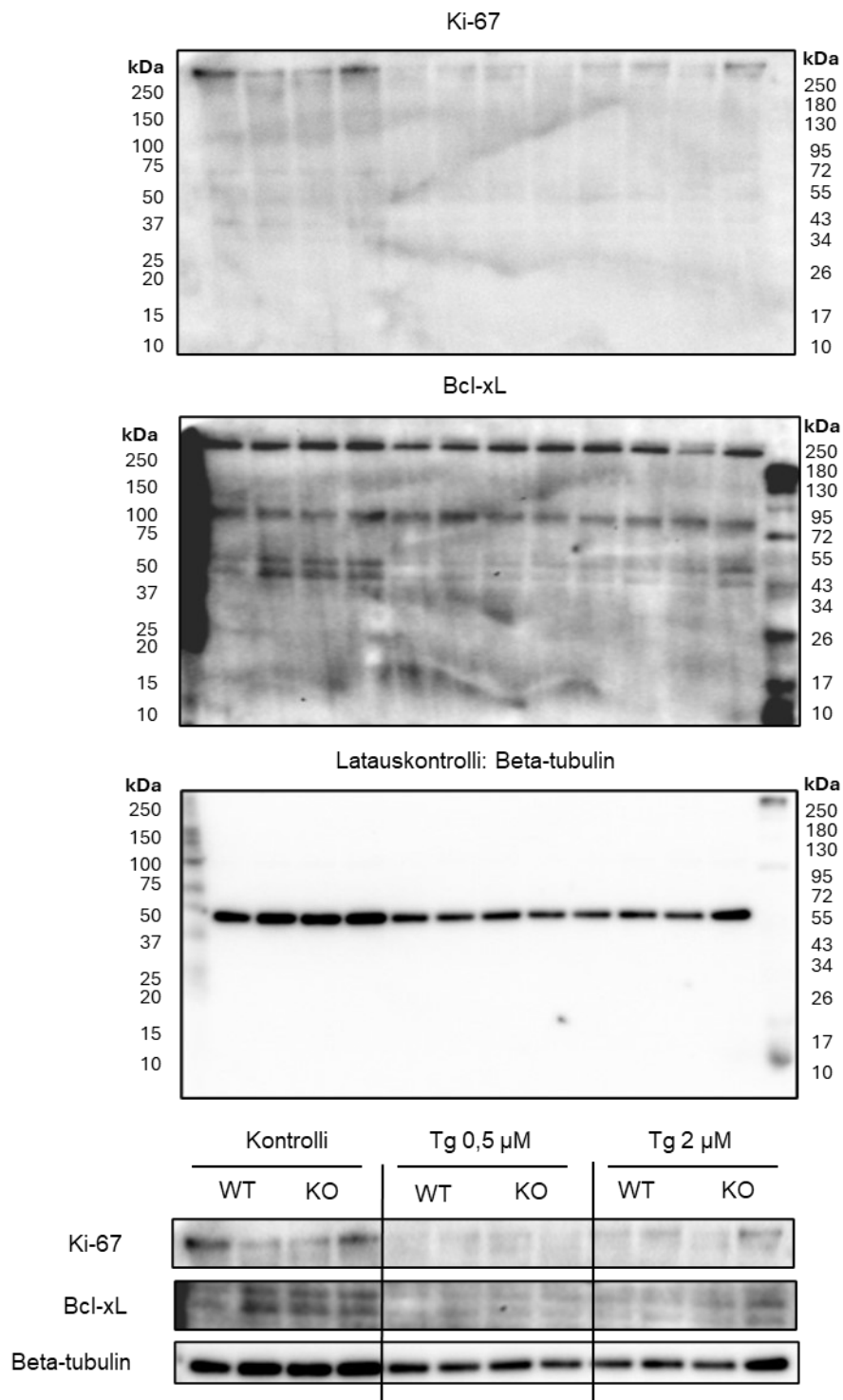
Solut kerättiin 24 tunnin thapsigargiinikäsittelyn jälkeen, hajotettiin ja analysoitiin Western blot -menetelmällä. Kunkin vasta-ainekäsittelyn tulokset on esitettyinä kuvassa 14. Ki-67-vasta-aineella käsitellyssä kalvossa havaitaan selkeät vyöhykkeet kontrollinäytteissä 250 kDa:n yläpuolella. Koska kokomarkkeri ulottuu vain 250 kDa:iin saakka, vyöhykkeiden tarkkaa kokoa ei voida määrittää. Kuitenkin vahva oletus on, että kyseessä on Ki-67-proteiinille ominainen 300

kDa:n vyöhyke. Ki-67 toimii soluproliferaation merkkinä, ja sen ilmentyminen viittaa aktiiviseen solusykliin sekä normaalisti jakaantuviin soluihin.

Thapsigarginilla käsitellyissä näytteissä kyseinen vyöhyke puuttuu, mikä viittaa solusykliin siirtymisen estymiseen ja mahdollisesti lisääntyneeseen apoptoosiin.

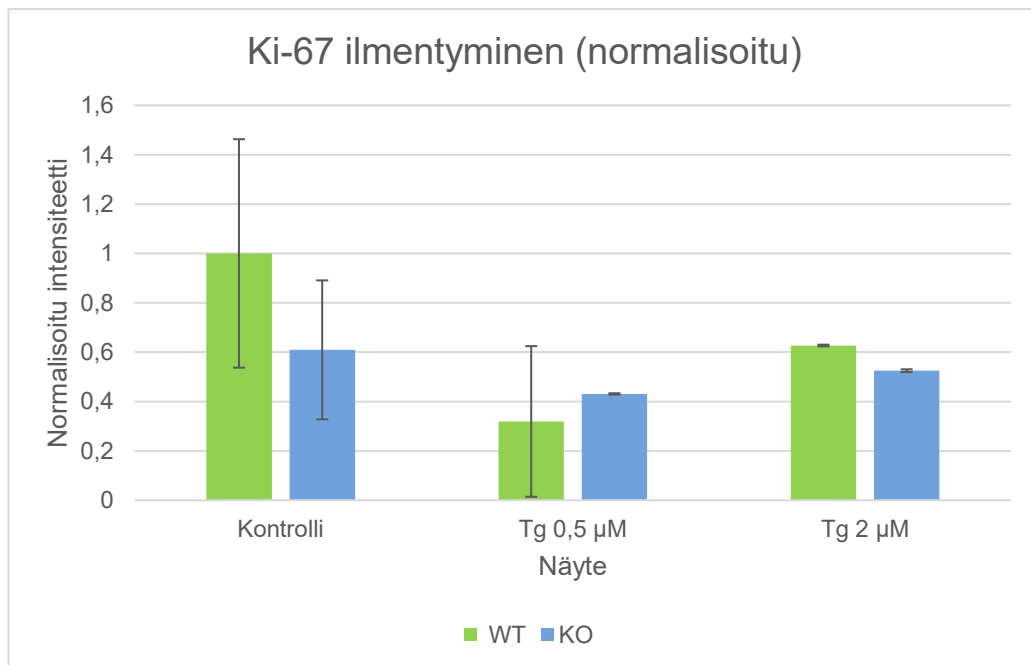
Bcl-xL-vasta-aineella käsitellyssä kalvossa havaitaan vyöhykkeet noin 50 kDa:n kohdalla molempien solulinjojen kontrollinäytteissä. Tämä vyöhyke viittaa Bcl-xL- ja Bax-proteiinien muodostamaan heterodimeeriin, joka vaikuttaa anti-apoptoottisesti eli apoptoosia estävästi. Bcl-xL:n ja Baxin teoreettiset molekyylipainot ovat 30 kDa ja 21 kDa, ja niiden yhteispaino on 51 kDa. Bcl-xL sitoutuu Baxiin, estäen sen apoptoosia edistävän toiminnan. Tämän seurauksena soluja suojaava signaali ilmenee vain kontrollinäytteissä, joissa solut jakautuvat normaalisti ja voivat paremmin kuin käsitellyissä näytteissä. Heterodimeeri suojaa soluja estämällä mitokondrion uloimman kalvon permeabilisaation (engl. mitochondrial outer membrane permeabilization, MOMP), mikä estää apoptoosin etenemisen (Youle, R. J. & Strasser, A. 2008).

Beta-tubuliinilla käsitellyssä kalvossa havaitaan tasaiset vyöhykkeet jokaisessa näytteessä noin 55 kDa:n kohdalla. Tasainen signaali kaikissa käsittelyissä osoittaa, että kokonaisproteiinia on ladattu näytteisiin yhtä paljon, ja että Beta-tubuliinia voidaan käyttää luotettavana latauskontrollina.



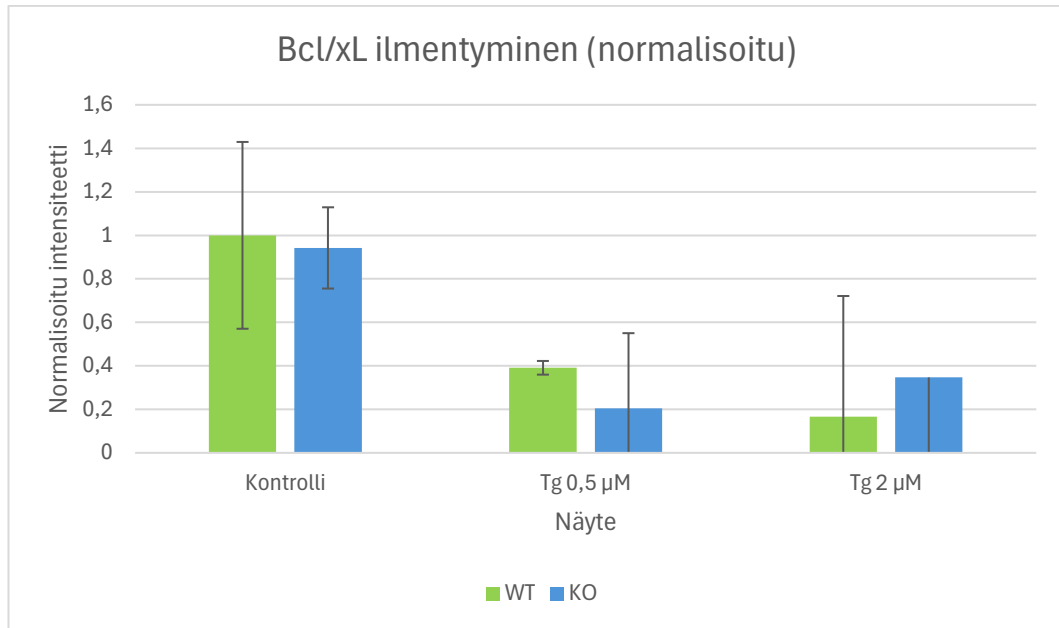
Kuva 14. Thapsigarginikäsitellyjen WT- ja KO-solujen Wester blot -analyysi.

Ki-67- ja Bcl/xL-vyöhykkeiden intensiteetit analysoitiin ImageJ-ohjelmalla ja normalisoitiin latauskontrollina toimineen Beta-tubuliinin intensiteeteillä. Ki-67-vyöhykkeiden normalisoidut intensiteetit käsittelyittäin ja solulinjoittain on esitettyinä kuviossa 2. Kuten kuvasta 14 havaittiin, Ki-67:n ilmentyminen on voimakkainta kontrollinäytteissä. Thapsigarginikäsitellyissä näytteissä signaali on heikompi, mikä näkyi alkuperäiskuvissa himmeinä vyöhykkeinä. Kuvioon merkityt virhepalkit osoittavat suurta vaihtelua kontrollinäytteiden mittaustuloksissa, mikä viittaa huomattavaan keskihajontaan näytteiden välillä. Suuri vaihtelu havaitaan myös 0,5 μM thapsigarginilla käsitellyissä WT-soluissa.



Kuvio 2. Ki-67-proteiinin ilmentyminen thapsigarginikäsitellyissä soluissa.

Kuten Ki-67:n kohdalla, myös Bcl/xL-vyöhykkeiden intensiteetit ovat suurimmillaan kontrollinäytteissä. Thapsigarginilla käsitellyissä näytteissä havaitaan kuvion 3 mukaisesti heikkoa signaalia, mutta solulinjojen välinen suhde on päinvastainen verrattuna Ki-67-analyysiin. Virhepalkkien perusteella näytekohtainen vaihtelu oli suurta kaikissa muissa ryhmissä paitsi 0,5 μM thapsigarginilla käsitellyissä WT-soluissa, joissa mittaustulokset olivat keskenään tasaisempia.



Kuvio 3. Bcl/xL-proteiinin ilmentyminen thapsigarginikäsitellyissä soluissa.

Ki-67- ja Bcl/xL-vyöhykkeiden intensiteeteistä tehtiin myös yksisuuntainen varianssianalyysi (engl. analysis of variance, ANOVA), jonka tarkoituksena oli selvittää tulosten tilastollista merkitsevyyttä. Tulokset Ki-67-proteiinin ilmentymisestä eri käsittelyryhmissä on esitettyinä taulukossa 2. Western blot -analyysin perusteella ryhmien välillä ei havaittu tilastollisesti merkitsevää eroa proteiinin ilmentymisessä. P-arvo oli selvästi suurempi kuin yleisesti käytetty merkitsevyysraja ($p < 0,05$), mikä viittaa siihen, että ryhmien väliset erot voivat johtua satunnaisvaihtelusta. Näin ollen tulosten perusteella ei voida osoittaa systemaattista eroa käsittelyryhmien välillä. Lisäksi laskettu F-arvo jäi pienemmäksi kuin kriittinen F-arvo, mikä vahvistaa tulkintaa siitä, että nollahypoteesia ei voida hylätä. Nollahypoteesi tarkoittaa, että havaittavat erot ryhmien välillä johtuvat sattumasta eikä todellisista vaikutuksista käsittelyjen välillä (Tietoarkisto, n.d.).

Taulukko 2. Ki-67-proteiinin varianssianalyysi Western blot -tuloksista.

Vaihtelun lähde	F-arvo	p-arvo	F-kriittinen
Luokkien välissä	1,21	0,41	4,39

Myöskään Bcl/xL-proteiinin ilmentymisessä ei havaittu tilastollisesti merkitsevää eroa ryhmien välillä. Tämä voidaan päätellä taulukon 3 mukaisesta p-arvosta, joka ylittää yleisesti käytetyn merkitsevyystason. Lisäksi laskettu F-arvo jää pienemmäksi kuin kriittinen F-arvo, mikä vahvistaa sen, että nollahypoteesia ei voida proteiinin osalta hylätä.

Taulukko 3. Bcl-xL-proteiinin varianssianalyysi Western blot -tuloksista.

Vaihtelun lähde	F-arvo	p-arvo	F-kriittinen
Luokkien välissä	3,09	0,10	4,39

Ki-67- ja Bcl-xL-proteiinien ilmentymistä voidaan havaita visuaalisesti, mutta tilastollisissa analyyseissä syntyy eroa, koska käytössä oli vain kaksi rinnakkaisnäytettä ja solulinjat jouduttiin jakamaan eri ryhmiin. Tulokset voisivat olla erilaisia, jos soluryhmät olisi yhdistetty samaan käsittelyyn tai jos rinnakkaisnäytteitä olisi ollut kahden sijaan neljä. Western blot -analyysi kuitenkin vahvistaa, että thapsigargiini toimii apoptoosin indusoijana.

5 Yhteenveto

Työn päätavoitteena oli testata thapsigargiinin toimivuutta apoptoosin indusoijana ja optimoida sen käsittelyä. Keskeisenä tuloksena osoitettiin, että thapsigargiini toimii tehokkaana apoptoosin indusoijana jo 0,5 μM pitoisuudella ja 24 tunnin käsittelyllä, ja vaste oli vertailukelpoinen korkeampaan 2 μM pitoisuuteen.

Työn taustalla on laajempi kiinnostus kilpirauhas- ja beetasolujen apoptoosimekanismien tutkimiseen, mikä on keskeistä kilpirauhas sairauksien ja diabeteksen taustan ymmärtämisessä. Solukuoleman säätelyprosessien tarkempi tuntemus voi tulevaisuudessa edistää uusien hoitokohteiden ja lääkeainekehityksen kehittämistä. Opinnäytetyössä saavutettiin merkittävä edistysaskel optimoimalla thapsigargiinin käsittelyolosuhteet ja analyysimenetelmät, mikä mahdollisti apoptoosia indusoivan vaikutuksen tarkemman selvittämisen. Tulokset viittaavat siihen, että thapsigargiinin apoptoosia indusoiva vaikutus voidaan saavuttaa jo huomattavan matalilla pitoisuuksilla. Koska alle 0,5 μM pitoisuuksia ei vielä testattu, jää avoimeksi mahdollisuus, että vielä pienemmät thapsigargiininipitoisuudet voisivat olla yhtä tehokkaita tai jopa tehokkaampia.

Merkittävä parannus saavutettiin IncuCyte-kuvantamisella, joka mahdollisti reaaliaikaisen seurannan thapsigargiinikäsittelyn aikana. Proliferaatiokäyrät osoittivat apoptoosin alkavan jo kuuden tunnin kuluttua käsittelystä. Solujen todettiin olevan herkkiä irtoamiselle käsittelyn aikana, minkä seurauksesta päädyttiin testaamaan 48 tunnin kiinnittymisaikaa sekä elektronisen pipetin käyttöä matalilla imu- ja annosteluasetuksilla. Nämä osoittautuivat tehokkaiksi menetelmiksi, ja säilyttivät solut kiinnittyneinä värjäykseen asti. IncuCyte-kuvantamisella on kuitenkin myös rajoituksensa, sillä järjestelmä mittaa ensisijaisesti solujen proliferaatiota, eikä suoraan apoptoottista solukuolemaa. Täten erot proliferaatiokäyrissä voivat kuvastaa sekä solujen kuolemaa että niiden jakautumisen hidastumista. Thapsigargiinin tiedetään estävän solujen

proliferaatiota, joten osittain havaitut muutokset voivat liittyä myös solujakaantumisen hidastumiseen, eivät pelkästään apoptoosiin.

Hoechst- ja PI-värjäyksen tulokset jäivät epäselviksi, osittain PI-värjäyksen alhaisen signaalin vuoksi. Tämä voi johtua useista tekijöistä, kuten liian pitkästä thapsigarginikäsittelystä, jonka seurauksena solut ovat ehtineet siirtyä apoptoosista kuolemaan. Proliferaatiokäyrästä nähtiin solutiheyden laskeneen jo kuuden tunnin kohdalla, joten lyhyempi käsittelyaika voisi mahdollisesti parantaa värjäystuloksia. Toisaalta syynä voi olla myös vanhentunut propidiumjodidiliuos, mikä selittäisi värjäyksen heikon tehon.

Hoechst- ja PI-värjäysmenetelmää pidetään yleisesti niin sanottuna apoptoosin varmistusmenetelmien "kultaisena standardina". Toinen yleisesti käytetty menetelmä on TUNEL-tekniikka (engl. terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling), joka voisi tarjota tarkemman ja spesifisemmän apoptoosianalyysin. TUNEL-tekniikassa tunnistetaan apoptoosille tyypillinen DNA-fragmentaatio liittämällä fluoresoivia nukleotidimerkkejä DNA:n katkeamiskohtiin. Tämä mahdollistaisi suoran apoptoosin mittaamisen solutasolla, sekä voisi olla spesifisempi ja vähemmän altis värjäystulosten tulkinnanvaraisuudelle kuin Hoechst- ja PI-värjäys.

Työ suoritettiin ensimmäistä kertaa beetasolujen sijaan FRTL-5-soluilla, mikä toi työhön näkökulmia myös kilpirauhassolujen apoptoosimekanismeista. Vertailussa villityypin ja poistogeenisen kilpirauhassolulinjan välillä ei havaittu merkittäviä eroja apoptoosin määrässä tai ajoituksessa. Proliferaatiokäyrät osoittivat apoptoosin käynnistyvän samassa aikarajassa molemmissa solutyypeissä. Lisäksi Western blot -tulokset tukivat tätä havaintoa, sillä Ki-67- ja Bcl/Bxl-proteiinien ilmentymisessä ei havaittu tilastollisesti merkitseviä eroja. Näiden havaintojen perusteella voidaan päätellä, että USP47-geenillä ei ole merkittävää vaikutusta FRTL-5-kilpirauhassolujen apoptoosireittiin.

Tulevissa kokeissa on suunnitelmassa testata IncuCyte-laitteistoon soveltuvaa vihreää fluoresoivaa väriainetta, joka voisi mahdollistaa apoptoosin tarkan ajallisen ja määrällisen seurannan ilman erillistä apoptoosivärjäystä. Väriin mekanismi perustuu kaspasi-3/7-entsyymien aktivoitumiseen apoptoosin

alkaessa, joka saa aikaan vihreän fluoresenssin emittoitumisen. Ensimmäiset kokeilut on suunniteltu FRTL-5-soluille, minkä jälkeen menetelmä aiotaan siirtää beetasoluihin. Koska solulinjojen biologiset ominaisuudet eroavat toisistaan merkittävästi, on mahdollista, että protokollan hienosäätö voi olla tarpeen ennen sen laajempaa soveltamista.

Yhteenvetona voidaan todeta, että thapsigargiini toimii tehokkaana apoptoosin indusoijana FRTL-5-soluissa jo 0,5 μM pitoisuudella ja että IncuCyte-kuvantamisen reaaliaikainen seuranta on hyvä solujen vasteiden havaitsemiseen. Työ luo vahvan pohjan tuleville tutkimuksille, joissa pyritään vielä tarkempaan ja spesifisempään apoptoosin kvantifointiin.

Lähteet

- Abcam. n.d. The complete guide to western blot. Viitattu 18.4.2025.
<https://www.abcam.com/en-us/technical-resources/guides/western-blot-guide>
- Ambesi-Impiombato, F. S. ym. 1980. Culture of hormone-dependent functional epithelial cells from rat thyroids. *Cell biology*. Vol. 77, No. 6, 3455-3459.
- Azure biosystems. n.d. 6 Steps to Western Blotting. Viitattu 22.3.2025.
<https://azurebiosystems.com/6-steps-to-western-blotting/>
- Barrett, K. E. ym. 2016. *Ganong's Review of Medical Physiology*. 25., painos. New York. McGraw-Hill Education.
- Bio-Rad. n.d. TC20 Automated Cell Counter. Viitattu 30.3.2025. <https://www.bio-rad.com/en-fi/product/tc20-automated-cell-counter?ID=M7FBG34VY>
- Bray, A. ym. 2010. *Essential cell biology*. Kolmas painos. New York. Garland Science.
- Cancer Research UK. 2014. Diagram showing the position of the thyroid gland. Wikimedia Commons. Viitattu 27.4.2025.
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Diagram_showing_the_position_of_the_thyroid_gland_CRUK_363.svg
- Cell culture company. 2025. *Mastering Cell Culture Techniques: Successful Cell Maintenance and Growth*. Viitattu 21.4.2025.
<https://cellculturecompany.com/mastering-cell-culture-techniques-successful-cell-maintenance-and-growth/>
- Chidawanyika, T. ym. 2018. SEC24A identified as an essential mediator of thapsigargin-induced cell death in a genome-wide CRISPR/Cas9 screen. *Cell Death Discovery*. Vol. 4, article 115.
- Colorado community college system. n.d. *Endocrine Structures and Functions*. Viitattu 27.4.2025. <https://pressbooks.ccconline.org/bio106/chapter/endocrine-structures-and-functions/>

Coomans de Brachène, A. ym. 2022. Exercise as a non-pharmacological intervention to protect pancreatic beta cells in individuals with type 1 and type 2 diabetes. *Diabetologia*. Vol. 66, 450–460.

Feldt-Rasmussen, U. ym. 2021. The hypothalamus-pituitary-thyroid (HPT)-axis and its role in physiology and pathophysiology of other hypothalamus-pituitary functions. *Molecular and cellular endocrinology*. Vol. 525, No. 111173.

Fonseca, S. G. ym. 2012. Endoplasmic reticulum stress and pancreatic beta cell death. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. Vol. 22, No. 7, 266-274.

Halliez, C. ym. 2023. In vitro beta-cell killing models using immune cells and human pluripotent stem cell-derived islets: Challenges and opportunities. *Frontiers in Endocrinology*. Vol. 13, No. 1076683.

Human cell design. 2021. EndoC- β H1 a human beta cell line of reference. User guide. Viitattu 3.4.2025.

Kailing, P. ym. 2021. Role of Ubiquitin-Specific Peptidase 47 in Cancers and Other Diseases. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. Vol. 9, No. 726632.

King Aileen JF. 2012. The use of animal models in diabetes research. *British Journal of Pharmacology*. Vol. 166, No. 3, 877-894.

Kulkarni, A. 2022. Inside the β Cell: Molecular Stress Response Pathways in Diabetes Pathogenesis. *Endocrinology*. Vol. 164. No. 1.

Mahmood, T. & Yang, P. 2012. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *North American Journal of Medicine and Science*. Vol. 4, No. 9, 429–434.

Morishita, Y. ym. 2020. Thyrocyte cell survival and adaptation to chronic endoplasmic reticulum stress due to misfolded thyroglobulin. *Journal of biological chemistry*. Vol. 295, No. 20.

Najid, M. 2025. How Incucyte Revolutionizes Real-Time Cell Imaging in Cancer Research. *Cancer biology research verkkolehti*. Viitattu 2.4.2025.

<https://cancerbiologyresearch.com/how-incucyte-revolutionizes-real-time-cell-imaging-in-cancer-research/>

Otonkoski, T. 1998. Insuliinin erityys. Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim. Vol. 114, No. 20, 2077–2083.

Patsnap Synapse. 2024. What is the mechanism of Trypan blue? Viitattu 30.3.2025. <https://synapse.patsnap.com/article/what-is-the-mechanism-of-trypan-blue>

Peltari, H. 2024. Struuma (suurentunut kilpirauhanen). Lääkärikirja Duodecim. Kustannus Oy Duodecim. Viitattu 5.5.2024. <https://www.terveyskirjasto.fi/dlk00678>

Renehan, A. G. ym. 2001. What is apoptosis, and why is it important? British Medical Journal. Vol. 322. No. 7301. 1536–1538.

Saarnikko, K. 2025. Basedowin tauti on yleisin kilpirauhasen liikatoiminnan aiheuttaja. Potilaan lääkärilehti. Viitattu 24.4.2025. <https://www.potilaanlaakarilehti.fi/uutiset/basedowin-tauti-on-yleisin-kilpirauhasen-liikatoiminnan-aiheuttaja/>

Schalin-Jääntti, C. 2021. Basedowin silmäoireyhtymä. Suomen endokrinologiyhdistys ry. Viitattu 14.4.2025. <https://www.endo.fi/tietoa-endokrinologisista-sairau/potilasohjeet/basedowin-silmaoireyhtyma/>

Sino Biological. n.d. Chemiluminescent Western Blotting Detection. Viitattu 19.4.2025. <https://www.sinobiological.com/category/chemiluminescence-wb>

Stevens, M. & Oltean, S. 2019. Modulation of the Apoptosis Gene Bcl-x Function Through Alternative Splicing. Frontiers in Genetics. Vol 10.

Syngene. n.d. Chemiluminescence & Fluorescence Applications. Viitattu 20.4.2025. <https://www.syngene.com/applications/chemiluminescence-fluorescence/>

Szegezdi, E. ym. 2006. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. Embo reports. Vol. 7, 880–885.

Thermo Fisher Scientific. 2014. Pierce Western Blotting Handbook and Troubleshooting Guide. Vianmääritysopas.

Thermo Fisher Scientific. n.d.-a. Chemistry of Protein Assays. Viitattu 30.3.2025. <https://www.thermofisher.com/fi/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/chemistry-protein-assays.html>

Thermo Fisher Scientific. n.d.-b. Beta Tubulin Antibodies. Viitattu 10.4.2025. <https://www.thermofisher.com/fi/en/home/life-science/antibodies/primary-antibodies/control-antibodies/loading-control-antibodies/beta-tubulin-antibodies.html>

Thermo Fisher Scientific. n.d.-c. Ki-67 Monoclonal Antibody (SolA15), eBioscience. Viitattu 11.4.2025. <https://www.thermofisher.com/antibody/product/Ki-67-Antibody-clone-SolA15-Monoclonal/14-5698-82>

Tietoarkisto. n.d. Varianssianalyysi. Viitattu 24.4.2025. <https://www.fsd.tuni.fi/fi/palvelut/menetelmaopetus/kvanti/varienssi/anova/>

Vitti, P. & Hegedüs, L. 2018. Thyroid diseases, pathogenesis, diagnosis, and treatment. Cham. Springer International Publishing.

Warnes, G. 2016. The Multiplexing of Assays for the Measurement of Early Stages of Apoptosis by Polychromatic Flow Cytometry. *Flow Cytometry - Select Topics*, 85-100.

Youle, R. J. & Strasser, A. 2008. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Vol. 9. 47–59.

Young, S. E. ym. 2022. Links between Thyroid Disorders and Glucose Homeostasis. *Diabetes & Metabolism Journal*. Vol. 46, No. 2, 239-256.

Protokolla FRTL-5-solujen ylläpitoon

Elatusaineen valmistus (500 ml):

Reagenssit	Valmistaja	Kataloginnumero	Tilavuus
F12 Ham Coon´s medium	-	-	464,5 ml
Inactivated Fetal Calf Serum	Life Technology	17593595	25 ml
L-glutamine, 200 mM	Life Technology	25030081	5 ml
Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml)	Life Technology	15140-122	2,5 ml
Bovine TSH, 100 mg/ ml	Sigma-Aldrich	9002-71-5	500 µl
Somatostatin, 10 µg/ml	-	-	500 µl
GLY-HIS-LYS, 10 µg/ml	Sigma-Aldrich	G7387	500 µl
Transferrin, 10 mg/ ml	-	-	250 µl
Hydrocortisone, 1 µm/ml	Sigma-Aldrich	H0135-1MG	500 µl
Insulin, 10 mg/ml	Sigma-Aldrich	19278	500 µl

1. Sekoita reagenssit steriiliin pulloon.
2. Säilytä + 4 °C:ssa.

Solujen sulatus:

Tehdään työn aluksi.

1. Suspendoi pakastettu solunäyte elatusaineeseen (lisää 10 ml viljelymediumia + pakastettu solususpensio falcon-putkeen. Vinkki: voit lisätä suoraan 1 ml elatusainetta ampulliin sulatuksen nopeuttamiseksi).

Liite 1

2. Sentrifugoi 200 x g, 3 minuuttia.
3. Kaada supernatantti pois ja resuspendoi pelletti 1 ml:aan elatusainetta.
4. Ota 10 cm:n viljelymalja ja lisää siihen 9 ml elatusainetta.
5. Lisää 1 ml resuspendoitua solususpensiota viljelymaljaan.
6. Aseta maljat inkubaattoriin (+ 37 °C, 5 % CO₂).

Alaviljely:

Tehdään 70–80 % konfluenssissa olevista soluviljelmistä 10–20 % konfluenssiin 5–7 päivän välein.

1. Lämmitä PBS, Trypsiini-EDTA-liuos ja elatusaine + 37 °C inkubaattorissa vähintään 20 minuutin ajan ennen käyttöä.
2. Poista vanha elatusaine imemällä aspiraattorilla.
3. Lisää 5 ml PBS:ää viljelymaljaan ja kallista varovasti vasemmalle ja oikealle. Ime PBS pois.
4. Lisää 2 ml 0,05 % Trypsiini-EDTA-liuosta ja inkuboi 5 minuuttia + 37 °C inkubaattorissa.
5. Inkuboinnin aikana valmistele uudet 10 cm:n viljelymaljat lisäämällä kuhunkin 9 ml elatusainetta.
6. Inaktivoi trypsiini lisäämällä 5 ml elatusainetta. Käytä 1 ml pipettiä ja pipetoi ylös-alas varovasti sekoittaaksesi soluryppäät ja irrottaaksesi solut.
7. Siirrä 1 ml trypsiiniä ja elatusainetta sisältävää solususpensiota uuteen viljelymaljaan (voit siirtää enemmänkin, jos solut ovat alle 70 % konfluenssissa. Muista, että lopullinen tilavuus viljelymaljassa tulisi olla noin 9–10 ml).
8. Siirron jälkeen sekoita viljelymaljaa varovasti ylös-alas ja vasemmalle-oikealle tasoa vasten.
7. Merkitse solulinja, päivämäärä, passausnumero ja omat nimikirjaimesi viljelyastian kylkeen.
8. Aseta maljat inkubaattoriin (+ 37 °C, 5 % CO₂).

Elatusaineen vaihto:

Tehdään tarvittaessa 2–3 päivän välein.

1. Lämmitä elatusaine + 37 °C inkubaattorissa vähintään 20 minuutin ajan ennen käyttöä.
2. Ime vanha elatusaine pois aspiraattorilla.
3. Lisää 10 ml tuoretta elatusainetta kuhunkin viljelymaljaan. Annostele hitaasti, kupla kerrallaan, samalla kun pidät viljelymaljaa kevyesti kallistettuna – näin vältetään solujen irtoamisen. Aseta maljat inkubaattoriin (+ 37 °C, 5 % CO₂).

Protokolla EndoC-βH1-solujen ylläpitoon

Elatusaineen valmistus (250 ml):

Reagenssit	Valmistaja	Kataloginumero	Tilavuus/massa
DMEM (1X) low glucose (1 g/ml)	Life Technology	31885-049	247 ml
BSA Fraction V fatty acid free	Sigma- Aldrich	10775835001	5 g
2-Mercaptoethanol	Sigma- Aldrich	102448173	0,875 µl
Nicotinamide	Merck	3904384	0,305 g
Human transferrin in low glucose DMEM (5,5 mg/ml)	Sigma- Aldrich	T8158	250 µl
Sodium Selenite (6,7 µg/ml)	Sigma- Aldrich	10102-18-8	250 µl
Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml)	Life Technology	15140-122	2,5 ml

1. Sekoita reagenssit pulloon.
2. Steriloi liuos suodattamalla se 0,22 µm suodattimen läpi.
3. Säilytä + 4 °C:ssa ja käytä enintään 30 vuorokauden ajan.

Neutralisointiliuoksen valmistus (100 ml):

Reagenssit	Valmistaja	Kataloginnumero	Tilavuus
PBS (1X), pH 7,4	Life Technology	10010023	80 ml
Inactivated Fetal Calf Serum	Life Technology	17593595	20 ml

1. Sekoita 80 ml PBS:ää ja 20 ml inaktivoitua iFCS:ää pullossa.
2. Steriloi liuos suodattamalla se 0,22 µm suodattimen läpi.
3. Säilytä + 4 °C:ssa ja käytä enintään 30 vuorokauden ajan.

Pinnoiteliuoksen valmistus:

Reagenssit	Valmistaja	Kataloginnumero	Tilavuus
DMEM (1X) High glucose (4,5 g/l)	Life Technology	41965-039	9,9 ml
Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml)	Life Technology	15140-122	100 µl
Fibronectin from bovine plasma (2 µg/ml)	Sigma-Aldrich	F1141-1MG	20 µl
1 % of ECM (8,45 mg/ml)	Sigma-Aldrich	E1270-1ML	101 µl

1. Siirrä 1 % ECM-erä pakastimesta jäihin sulamaan.
2. Lisää 9,9 ml kylmää (+ 4 °C) DMEM 4,5 g/l glukosiliuosta 15 ml:n steriiliin falcon-putkeen.
3. Lisää 100 µl Penicillin/Streptomycin -liuosta DMEM:iin ja sekoita.
4. Lisää fibronectin.
5. Lisää valmistettua liuosta ECM:n putkeen ja pipetoi hitaasti ylös ja alas liuoksen sulattamiseksi. Siirrä tämä jäljellä olevaan 9,7 ml:n liuokseen.

Liite 2

6. Homogenisoi seos pipetoimalla ylös-alas.
7. Pinnoita kaksi 10 cm:n viljelymaljaa:
 - a. Lisää 5 ml pinnoitusliuosta kuhunkin maljaan.
 - b. Kallista maljoja varovasti niin, että liuos leviää tasaisesti koko pinnalle.
 - c. Aseta maljat inkubaattoriin (+ 37 °C, 5 % CO₂) ja varmista, että neste peittää koko kasvatuspinnan.
 - d. Inkuboi vähintään 1 tunti ja enintään 6 tuntia.

Solujen sulatus:

Tehdään työn aluksi.

1. Valmista pinnoiteliuos viljeltäville maljoille. Inkuboi vähintään 1 tunti ja enintään 6 tuntia.
2. Pipetoi 9 ml (sulatettua soluvialia kohden) elatusainetta steriiliin 50 ml Falcon-putkeen ja lämmitä vähintään 20 minuutin ajan 37 °C:ssa.
3. Poista kryovial nestetypestä ja säilytä kuivajään päällä.
4. Kierrä kryovialin korkkia kevyesti paineen vapauttamiseksi laminaari-virtakaapissa ja sulje sitten uudelleen.
5. Siirrä kryovial nopeasti + 37 °C vesihauteeseen 1–3 minuutin ajaksi – varo, ettei vettä pääse korkin alueelle. Pieniä jääkkeitä saa jäädä jäljelle, kun kryovial otetaan pois vedestä.
6. Siirrä puoliksi sulanut solususpensio putkeen, jossa on 9 ml lämmitettyä elatusainetta (1:10 suhde solususpensiota kokonaismäärään nähden).
7. Huuhtele kryovial noin 1 ml:lla elatusainetta ja kaada 9 ml:n soluseokseen.
8. Sentrifugoi solususpensio 5 minuutin ajan, 500 x g, huoneenlämmössä.
9. Poista supernatantti varovasti. Vältä solujen aspiroimista. Resuspendoi solut 1 ml:aan elatusainetta. Pipetoi hitaasti ylös ja alas tasaisen solususpension aikaansaamiseksi.
10. Valmista 1:1-laimennos sekoittamalla 10 µl trypan blue -liuosta ja 10 µl solususpensiota. Sekoita varovasti.
11. Pipetoi 10 µl seoksesta laskentakammion aukkoon laskentalevyille.

Liite 2

12. Valmistele solususpensio elävien solujen määrän perusteella:

- 6 cm malja: $1,6 \times 10^6$ solua
- 10 cm malja: $4,2 \times 10^6$ solua

13. Poista pinnoiteliuos maljoilta, lisää tarvittava määrä elatusainetta ja viljele solut. Varmista, että solut jakautuvat tasaisesti heiluttamalla maljaa varovasti edestakaisin ja sivusuunnassa.

14. Inkuboi + 37 °C:ssa ja 5 % CO₂:ssa 3–4 tuntia.

15. Noin 4 tunnin kuluttua tarkista solujen kiinnittyminen ja vaihda elatusaine tuoreeseen.

16. Tarkkaile soluja päivittäin mikroskoopilla.

Elatusainetta ei tarvitse vaihtaa ensimmäisten 3 päivän aikana sulattamisesta. Tarkkaile soluja mikroskoopilla 2–3 päivän välein. Jos kelluvia soluja on paljon, vaihda elatusaine tuoreeseen.

Alaviljely:

Tehdään 7 päivän välein.

1. Valmista pinnoiteliuos viljeltäville maljoille. Inkuboi vähintään 1 tunti ja enintään 6 tuntia.
2. Lämmitä neutralointiliuos, DMEM (1 g/l), trypsin / EDTA, ja elatusaine vähintään 20 minuutin ajan + 37 °C:ssa.
3. Poista elatusaine solumaljalta.
4. Pese 10 ml huoneenlämpöisellä PBS 1X -liuoksella.
5. Lisää 1,5 ml trypsin / EDTA ja siirrä solut inkubaattoriin + 37 °C:een 3 minuutin ajaksi.
6. Tarkista solujen irtoaminen mikroskoopilla.
7. Taputa maljaa muutaman kerran, jotta solut irtoavat.
8. Lisää 4,5 ml neutralointiliuosta inaktivoimaan trypsiini.
9. Kallista maljaa ja pipetoi solususpensiota hitaasti ylös ja alas soluklustereiden rikkomiseksi.

Liite 2

10. Kun solususpensio vaikuttaa homogeeniselta, siirrä se 50 ml steriiliin falcon-putkeen.
11. Pese maljat kaksi kertaa DMEM:llä (1 g/l) ja siirrä solususpensiot samaan putkeen.
12. Tarkista maljat mikroskoopilla varmistaaksesi, että suurin osa soluista on kerätty.
13. Sentrifugoi 500 x g 5 minuutin ajan.
14. Poista supernatantti.
15. Lisää 1 ml elatusainetta ja pipetoi varovasti ylös ja alas solupelletin rikkomiseksi.
16. Laske elävien solujen määrä trypan blue värjäyksellä ja automaattisella solulaskurilla. Yhdistä 10 µl solususpensiota ja 10 µl trypan blue -värjäysliuosta sekoittamalla ja pipetoi 10 µl solulaskentalevyille.
17. Laske solususpensio alaviljelytilavuus tiheydelle 75 000 solua/cm² ja 10 cm maljan pinta-alalle 56,7 cm²:

$$V = \frac{N_d * A_d}{C}$$

Kaava 1. Solujen alaviljelytilavuus

jossa:

V on tarvittava siirtotilavuus (ml)

N_d on haluttu solutiheys (soluja/ cm²)

A_d on maljan pinta-ala (cm²)

C on solujen pitoisuus alkuperäisessä suspensiossa (soluja/ml)

18. Poista pinnoiteliuos uusilta maljoilta ja lisää tarvittava määrä elatusainetta (10 ml – alaviljelytilavuus).

Liite 2

19. Lisää maljalle alaviljelytilavuuden mukainen määrä solususpensiota. Siirron jälkeen sekoita viljelymaljaa varovasti ylös-alas ja vasemmalle-oikealle tasoa vasten.
20. Merkitse solulinja, päivämäärä, passausnumero ja omat nimikirjaimesi viljelyastian kylkeen.
21. Aseta maljat inkubaattoriin (+ 37 °C, 5 % CO₂).

Elatusaineen vaihto:

Tehdään tarvittaessa 2–3 päivän välein.

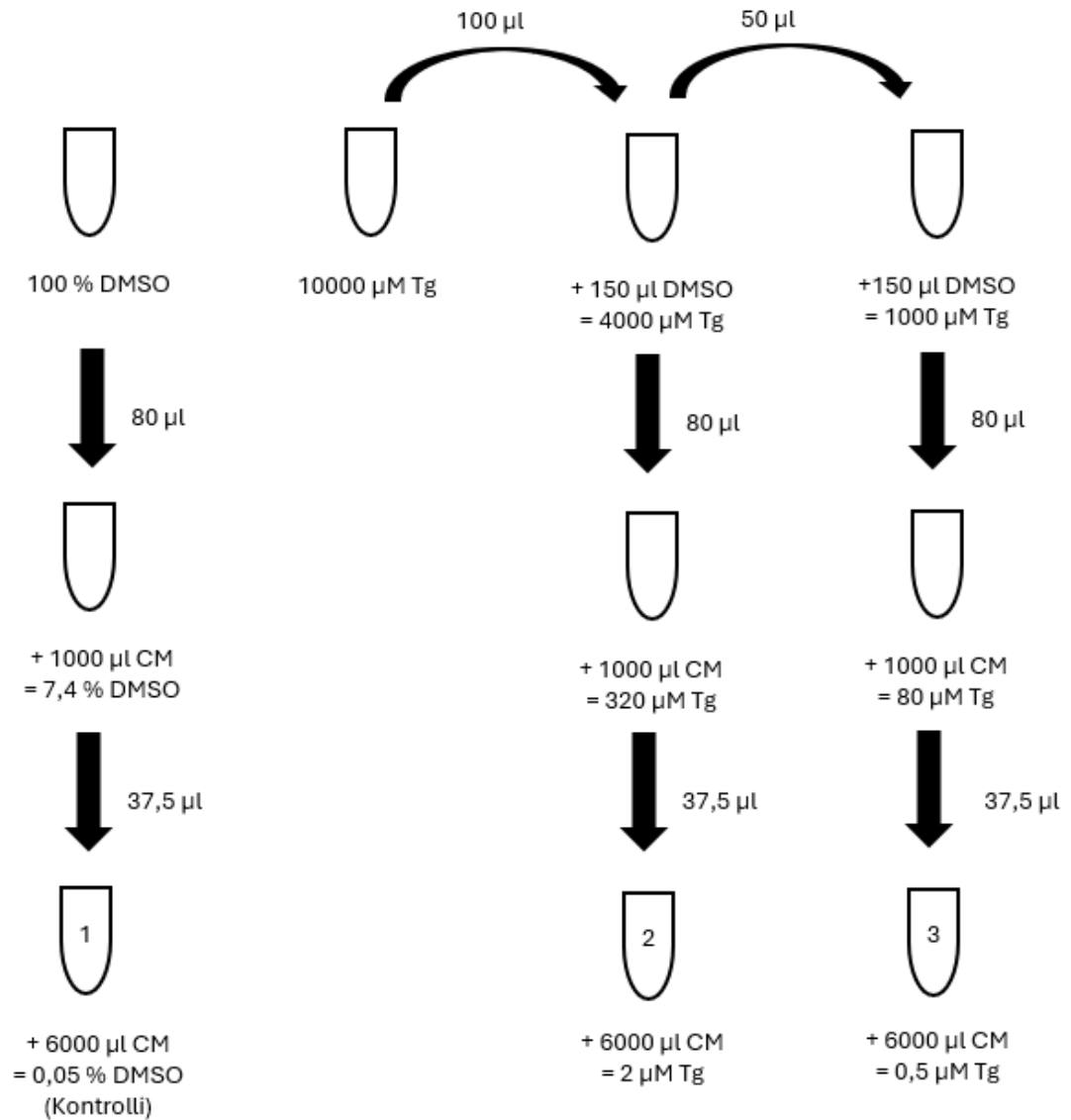
4. Lämmitä elatusaine + 37 °C inkubaattorissa vähintään 20 minuutin ajan ennen käyttöä.
5. Ime vanha elatusaine pois aspiraattorilla.
6. Lisää 10 ml tuoretta elatusainetta kuhunkin viljelymaljaan. Annostelee hitaasti, kupla kerrallaan, samalla kun pidät viljelymaljaa kevyesti kallistettuna – näin vältetään solujen irtoamisen. Aseta maljat inkubaattoriin (+ 37 °C, 5 % CO₂).

Thapsigarginikäsittelyn laimennoskaavio

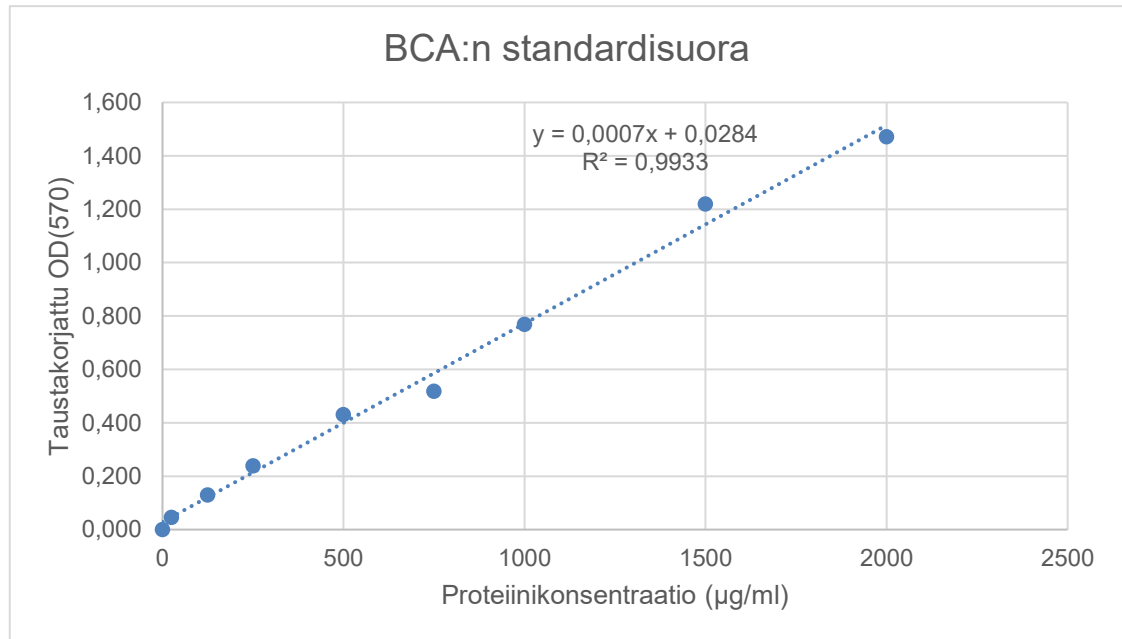
CM = elatusaine

Tg = thapsigargini

DMSO = dimetyylisulfoksidi



BCA:n standardisuora ja laskut



Taustakorjatut laskut ja näytemäärät:

Kaivo	Näyte	OD (570)	Konsentraatio (µg/ml)	Konsentraatio x4 (µg/ml)	Lysaatti (µl)	Puskuri (µl)	6xSDS (µl)
1	Markkeri: BioRad, Cat: #161037						
2	Kontrolli WT	0,241	285,922	1143,686	16	7	5
3	Kontrolli WT	0,312	381,496	1525,982	12	11	5
4	Kontrolli KO	0,275	332,223	1328,893	14	9	5
5	Kontrolli KO	0,242	287,486	1149,943	16	7	5
6	Tg 0,5 µM WT	0,194	222,469	889,875	20	3	5
7	Tg 0,5 µM WT	0,185	210,244	840,977	21	2	5
8	Tg 0,5 µM KO	0,219	256,292	1025,167	18	5	5
9	Tg 0,5 µM KO	0,187	213,229	852,916	21	2	5
10	Tg 2 µM WT	0,192	219,986	879,945	20	3	5
11	Tg 2 µM WT	0,179	201,988	807,952	22	1	5
12	Tg 2 µM KO	0,195	224,687	898,748	20	3	5
13	Tg 2 µM KO	0,182	207,132	828,529	22	1	5
14	Markkeri: England Biolabs, Cat: P7719S						

Liite 4

Esimerkkilasku, Kontrolli WT, kaivo 2:

Standardisuoran yhtälö:

$$y = 0,0007 + 0,0284$$

Sijoitetaan taustakorjattu OD – arvo:

$$0,241 = 0,0007x + 0,0284$$

$$x = \frac{(0,241 - 0,0284)}{0,0007}$$

$$x = 285,922 \frac{\mu g}{ml}$$

Huomioidaan laimennoskerroin:

$$285,922 \frac{\mu g}{ml} * 4 = 1143,688 \frac{\mu g}{ml}$$

Lysaatin määrä, kun näytteen proteiinimääräksi halutaan 18 μg :

$$\frac{1000}{\left(\frac{1143,686 \frac{\mu g}{ml}}{18 \mu g}\right)} = 15,738 \mu l \approx 16 \mu l$$

Puskurin määrä, kun kokonaistilavuudeksi halutaan 28 μl ja 6XSDS osuus on 5 μl :

$$28 \mu l - 16 \mu l - 5 \mu l = 7 \mu l$$