

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma

Laboratoriotekniikka

2016

Katriina Palttila

ANTIGEENIN KALVORAKKULAKULJETUS B-SOLUISSA

Katriina Paltila

ANTIGEEININ KALVORAKKULAKULJETUS B-SOLUISSA

B-solut ovat tärkeä osa adaptiivista immunitteettia. Ne vastaavat elimistön vasta-aineiden tuotannosta, joiden avulla elimistö pystyy taistelemaan tehokkaasti infektioita vastaan. Erilaistukseensa vasta-aineita tuottaviksi plasmasoluiksi B-solujen täytyy ottaa tunnistamansa antigeeni sisäänsä, pilkkoa se ja esitellä se eteenpäin T-soluille. Antigeenin prosessointiketju B-soluissa tunnetaan vielä erittäin huonosti. Tässä tutkimuksessa antigenin prosessointiin liittyvät rakenteet on selvitetty aikajanallisesti, eikä tämän tyyppistä tutkimusta tietyvästi ole aiemmin tehty.

Opinnäytetyön tavoitteena oli tutkia antigeeniä pilkkovaa solunsisäistä reittiä EEA1-proteiinin, LAMP1-proteiinin ja Rab-proteiinien avulla. EEA1-proteiini toimii varhaisten endosomien merkkiaineena kun taas LAMP1-proteiini esiintyy myöhäisissä endosomeissa sekä lysosomeissa. Myös Rab-proteiinit toimivat eri soluelinten merkkiaineina. Ne ovat pieniä GTPaaseja, jotka koordinoivat solunsisäistä kalvorakkulakuljetusta.

Tutkimuksessa selvitettiin endogeenisten Rab-proteiinien, EEA1-proteiinin ja LAMP1-proteiinin sijainti B-soluissa sekä niiden keskinäinen vuorovaikutus eri aktivoituaikojen kuluttua. *In vitro* viljelty B-solut aktivoitiin liukoisella antigeenillä. Aktivoituneet solut immunovärjättiin ensin primaarivasta-aineilla ja sitten fluoresoivilla sekundaarivasta-aineilla. Solujen kuvaus tehtiin spinning disk -konfokaalimikroskoopilla (SDCM). Tutkittaessa LAMP1-proteiinia visuaalisen tarkastelun lisäksi näistä soluista tehtiin myös korrelaatioanalyysit. Lisäksi tutkittiin, miltä Rab5/7/9/11- ja EEA1-proteiinit näyttävät aktivoimattomissa B-soluissa.

Antigeenin prosessointiketjuun osallistuvat keskenään vuorovaikutuksessa olevat Rab-proteiinit ja EEA1- sekä LAMP1-proteiinit. Opinnäytetyössä on havainnollistettu antigenin prosessointiketju korrelaatiokuvaajien ja SDCM-kuvien avulla. Tutkimuksessa määritellään myös Rab-proteiinien käyttäytyminen aktivoimattomissa B-soluissa. Aktivoimattomia B-soluja tutkittaessa huomattiin, että Rab5/7/9 kerääntyvät niin sanottuun rakkulakeskittymään. Huomattiin myös, että EEA1 ei kerääntynyt Rab-proteiinien tavoin aktivoimattomissa B-soluissa, mutta aktivoinnin jälkeen myös EEA1 kerääntyy rakkulakeskittymään. Rab-proteiineilla havaittiin olevan lisäksi muita rooleja, jotka poikkeavat yleisestä näkemyksestä: esimerkiksi Rab5:n ja EEA1:n rinnakkainen lokalisaatio (ei päällekkäinen) sekä Rab9 ja antigenin korrelaatio 10 minuutin aikapisteessä.

ASIASANAT:

B-solu, kalvorakkulakuljetus, fluoresenssi, spinning disk -konfokaalimikroskooppi

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Food Technology and Biotechnology | Laboratory Technology

Spring 2016 | 51 pages

Marika Vainio (M.Sc.), Pieta Mattila (Ph.D.), Ilari Suominen (Ph.D.)

Katriina Palttila

VESICULAR ANTIGEN PROCESSING IN B CELLS

B cells are an important part of the adaptive immune system. They produce antibodies which help the system to efficiently fight against infections. In order to differentiate into antibody producing plasma cells, B cells must internalize the antigen, process it and present it as peptides for T cells. Antigen processing in B cell is not well understood. In this study, the vesicular structures involved in the antigen processing are reported spatiotemporally. To our knowledge, this study is the first of its kind.

The aim of this thesis was to study the intracellular antigen processing pathway using EEA1, LAMP1 and Rab proteins. EEA1 is associated with early endosomes while LAMP1 protein is associated with late endosomes and lysosomes. Also the Rab proteins are associated with different vesicular compartments. Rab proteins are small GTPases controlling intracellular trafficking in many cell types.

In this study, the localization of endogenous Rab proteins, EEA1 and LAMP1 and their interactions were studied at different time points after antigen addition. *In vitro* cultured B cells were activated with antigen in solution. Activated cells were immunostained first with primary antibodies and then with fluorescent secondary antibodies. The cells were imaged with a spinning disc confocal microscope (SDCM). In addition to visual evaluation, correlation analysis was performed for LAMP1-Rab -studies. Rab5/7/9/11 and EEA1 proteins were also examined for their localization and expression levels in inactivated B cells.

Rab proteins, EEA1 and LAMP1 are involved in the antigen processing pathway in interaction with each other. In this thesis, the antigen processing pathway, marked by these proteins, is illustrated with correlation plots and SDCM images. In addition, the localization of Rab proteins was determined in inactivated B cells. Rab5/7/9 were found to cluster in a central cluster in inactivated cells. In addition, EEA1 did not seem to have a similar role but it clustered in the central cluster after B cell activation. It was established that Rab proteins in B cells also have different roles from those reported for other cell types. For example Rab5-EEA1 possesses parallel localization (not colocalization) and Rab9 and antigen were correlating already at the 10 minute time point.

KEYWORDS:

B cell, vesicle transport, fluorescence, spinning disk confocal microscope

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET JA SANASTO	7
ALKUSANAT	9
1 JOHDANTO	10
2 IMMUUNIJÄRJESTELMÄ	12
3 B-SOLUT	13
3.1 B-solun aktivointi	14
3.1.1 Rab-suvun proteiinit	15
3.2 Kalvorakkulakuljetus	17
4 MIKROSKOPOINTI	19
4.1 Fluoresenssi	19
4.2 Immunofluoresenssi	21
4.3 Spinning Disk -konfokaalimikroskooppi	23
5 MATERIAALIT JA MENETELMÄT	26
5.1 Soluviljely	26
5.2 Transfektio	26
5.3 B-solujen aktivointi ja immunovärjäys	27
5.4 Spinning disk -konfokaalimikroskooppi	28
5.4.1 Korrelaatioanalyysit	28
5.4.2 Kvanttaminen	29
6 TULOKSET	30
6.1 Rab5:n toiminta muiden kalvorakkulaproteiinien kanssa aktivoiduissa B-soluissa	30
6.2 Kalvorakkulakuljetukseen osallistuvien proteiinien lokalisointi aktivoimattomissa B-soluissa	30
6.3 Rab5/7/9/11:n ja EEA1:n lokalisaatio sekä keskinäinen vuorovaikutus aktivoiduissa B-soluissa	33
6.3.1 EEA1:n ja Rab5:n vuorovaikutus aktivoiduissa B-soluissa	33
6.3.2 EEA1:n ja Rab7:n vuorovaikutus aktivoiduissa B-soluissa	35

6.3.3 EEA1:n ja Rab9:n vuorovaikutus aktivoituissa B-soluissa	36
6.3.4 EEA1:n ja Rab11:n vuorovaikutus aktivoituissa B-soluissa	38
6.4 Rab5/7/9:n ja LAMP1:n lokalisaatio ja keskinäinen vuorovaikutus aktivoituissa B-soluissa	39
6.4.1 LAMP1:n ja Rab5:n vuorovaikutus aktivoituissa B-soluissa	39
6.4.2 LAMP1:n ja Rab7:n vuorovaikutus aktivoituissa B-soluissa	42
6.4.3 LAMP1:n ja Rab9:n vuorovaikutus aktivoituissa B-soluissa	44

7 TULOSTEN TARKASTELU JA JOHTOPÄÄTELMÄT **49**

LÄHTEET **51**

LIITTEET

Liite 1. Korrelaatiotaulukot

KUVAT

Kuva 1. B-solun kehitysvaiheet.	13
Kuva 2. B-solureseptorikompleksi. ¹⁹	14
Kuva 3. Rab5C-GppNHp -proteiinin rakenne. ⁵	16
Kuva 4. Rab-proteiinit eukariotisolussa.	18
Kuva 5. Jablonskin diagrammi. ¹²	20
Kuva 6. Stokesin siirtymä.	21
Kuva 7. Epäsuora menetelmä.	22
Kuva 8. Yokogawa spinning disk -yksikön periaate. ¹⁷	24
Kuva 9. Yokogawa-mikrolinssilevyn periaate. ¹⁷	24
Kuva 10. Rab5 ja Rab7 aktivoimattomissa B-soluissa.	31
Kuva 11. Rab9 ja Rab11 aktivoimattomissa B-soluissa.	32
Kuva 12. EEA1 aktivoimattomissa ja aktivoituissa B-soluissa.	33
Kuva 13. EEA1, Rab5 ja antigeenin lokalisointi ja keskinäinen vuorovaikutus 15 minuutin aikapisteessä. Tasokuva.	34
Kuva 14. EEA1, Rab5 ja antigeenin lokalisointi ja keskinäinen vuorovaikutus 60 minuutin aikapisteessä. Tasokuva.	35
Kuva 15. EEA1, Rab7 ja antigeenin lokalisointi ja keskinäinen vuorovaikutus 10 minuutin aikapisteessä. Tasokuva.	35
Kuva 16. EEA1, Rab7 ja antigeenin lokalisointi ja keskinäinen vuorovaikutus 60 minuutin aikapisteessä. Tasokuva.	36
Kuva 17. EEA1, Rab9 ja antigeenin lokalisointi ja keskinäinen vuorovaikutus 10 minuutin aikapisteessä. Tasokuva.	37
Kuva 18. EEA1, Rab9 ja antigeenin lokalisointi ja keskinäinen vuorovaikutus 60 minuutin aikapisteessä. Tasokuva.	37

Kuva 19. EEA1, Rab11 ja antigeenin lokalisointi ja keskinäinen vuorovaikutus 15 minuutin aikapisteessä. Tasokuva.	38
Kuva 20. EEA1, Rab11 ja antigeenin lokalisointi ja keskinäinen vuorovaikutus 90 minuutin aikapisteessä. Tasokuva.	39
Kuva 21. LAMP1-Rab5-Antigeenin lokalisointi ja keskinäinen vuorovaikutus 10, 20 ja 60 minuutin aikapisteessä. Yhdistetyt tasokuvat.	40
Kuva 22. LAMP1-Rab7-Antigeenin lokalisointi ja keskinäinen vuorovaikutus 10, 20 ja 60 minuutin aikapisteessä. Yhdistetyt tasokuvat.	42
Kuva 23. LAMP1-Rab9-Antigeenin lokalisointi ja keskinäinen vuorovaikutus 10, 20 ja 60 minuutin aikapisteessä. Yhdistetyt tasokuvat.	45
Kuva 24. LAMP1-Rab9-Ag esimerkkikuvat positiivisesta ja negatiivisesta korrelaatiosta 20 minuutin aikapisteessä. Yhdistetyt tasokuvat.	48

KUVAAJAT

Kuvaaja 1. Rab5–LAMP1-korrelaatio.	40
Kuvaaja 2. Rab5–Antigeeni-korrelaatio.	41
Kuvaaja 3. LAMP1–Antigeeni-korrelaatio.	41
Kuvaaja 4. Rab7–LAMP1-korrelaatio.	43
Kuvaaja 5. Rab7–Antigeeni-korrelaatio.	43
Kuvaaja 6. LAMP1–Antigeeni-korrelaatio.	44
Kuvaaja 7. Rab9–LAMP1-korrelaatio.	45
Kuvaaja 8. Rab9–Antigeeni-korrelaatio.	46
Kuvaaja 9. LAMP1–Antigeeni-korrelaatio.	47

TAULUKOT

Taulukko 1. Rab-proteiinien lokalisointi eukaryoottisoluiissa. ^{3,4}	17
Taulukko 2. EEA1 ja LAMP1 -värjäyksien primaari- ja sekundaarivasta-aineet ja laimennokset.	28

KÄYTETYT LYHENTEET JA SANASTO

BSA	Bovine Serum Albumin, naudan seerumi albumiini
CCD	Charge Coupled Device, varauskytketty laite
DMSO	Dimetyylisulfoksidi
EEA1	Early Endosome Associated protein, varhaisten endosomien proteiini 1
Eksosytoosi	Tapahtuma, jossa solusta poistetaan kuona-aineita, vastakkainen tapahtuma endosytoosille
Endosomi	Solukalvosta kuroutuva rakkula, kalvorakkula
Endosytoosi	Tapahtuma, jossa solu ottaa sisäänsä materiaalia solun ulkopuolelta ja kuroutuu solukalvosta irti muodostaen rakkulan
Epitopppi	Antigeenin osa, johon B-solureseptori sitoutuu
FCS	Fetal Calf Serum, vasikan sikiön seerumi
Fluorofori	Fluoresoiva merkkiaine
HEPES	4-2-hydroksietyyli-1-piperatsiinietaanisulfonihappo
IgG	Immunoglobulin G, neljästä peptidiketjusta muodostunut Y:n muotoinen immunoproteiini
Internalisaatio	Katso: endosytoosi
ITAM:s	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs, immunoreseptorin tyrosiinipohjainen aktivointimotiivi
LAMP1	Lysosomal-Associated Membrane Protein 1, lysosomin kalvoproteiini 1
PBS	Phosphate buffered saline, fosfaattipuskuroitu fysiologinen suolaliuos
PFA	Paraformaldehydi
Rab	Ras-like in rat brain, Ras:n kaltainen proteiini rotan aivoissa
RPMI	Roswell Park Memorial Institute -soluviljelymedium
SDCM	Spinning Disk Confocal Microscope, spinning disk -konfokaalimikroskooppi
TGN	Trans Golgi Network, Trans-Golgi-verkosto

Th

T helper, auttaja T-solu

Transsytoosi

Solun sisälle endosyyttisesti otetut rakkulat kulkevat solulin-
nan läpi

ALKUSANAT

Tämä tutkimus on tehty opinnäytetyönä insinöörin tutkintoon Turun ammattikorkeakoulussa Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelmaan. Tutkimus on tehty osana Turun yliopiston biolääketieteen laitoksen, patologian ja oikeuslääketieteen osaston B-lymfosyyttejä tutkivan tutkimusryhmän (Mattila Lab) tutkimusta.

Haluan kiittää tohtori Ilari Suomista Turun ammattikorkeakoulusta työn ohjauksesta ja kommentoinneista.

Haluan kiittää koko Lymphocyte Cytoskeleton Group:ia mahdollisuudesta toteuttaa opinnäytetyöni tutkimusryhmässä sekä avusta työn tekemisessä. Erityinen kiitos ryhmänjohtajalle, tohtori Pieta Mattilalle, avusta ja kommentoinneista opinnäytetyön aikana.

Marika Vainiota haluan kiittää korvaamattomasta, koko opinnäytetyöprosessin ajan kestäneestä avusta niin käytännön työn kuin kirjoittamisenkin osalta.

Rakkaimmat kiitokset menevät Alexille hänen loppumattomasta kärsivällisyydestä ja tuesta työn ja koko opiskelujeni ajalta.

1 JOHDANTO

Elimistön immunitetin muodostaa immuunijärjestelmä, joka toimii puolustusmekanismina vieraita taudinaiheuttajia, kuten infektioita vastaan. Immuunijärjestelmä jaetaan luonnolliseen ja adaptiiviseen immunitettiin. Adaptiivinen immunitetti on oppiva immunitetti: se on luonnollista immunitettia spesifisempi ja vastaa immunologisesta muistista. Adaptiivinen immunitetti muodostuu B- ja T-lymfosyyteistä. B-solut ovat tärkeä osa adaptiivista immunitettia. Ne vastaavat elimistön vasta-aineiden tuotannosta, joiden avulla elimistö pystyy taistelemaan tehokkaasti esimerkiksi virusinfektioita vastaan.

Häiriöt immuunijärjestelmän toiminnassa ilmenevät usein vakavin seurauksin, joista jopa hengenvaarallisia esimerkkejä ovat muun muassa solusyövät kuten lymfoomat sekä useat erilaiset autoimmuunisairaudet, joissa B-solut tuottavat autovasta-aineita elimistön omia soluja vastaan. Humoraalisissa immuunihäiriöissä B-solut toimivat epänormaalisti, joko tuottaen vähemmän tai ei lainkaan elimistöä suojaavia vasta-aineita.

Toimivan immuunijärjestelmän kannalta B-solujen antigeenin prosessointiketjun ymmärtäminen on ensiarvoisen tärkeää. Tämä kuitenkin tunnetaan tällä hetkellä erittäin huonosti. Tässä opinnäytetyössä tavoitteena oli selvittää antigeenin prosessointiin liittyvät rakenteet aikajanallisesti. Tutkimus oli tiettävästi ensimmäinen laatuaan ja se liittyy Turun Yliopiston biolääketieteen laitoksen, patologian ja oikeuslääketieteen osaston tutkimusryhmän (Mattila Lab) B-lymfosyyttejä koskevaan tutkimukseen. Opinnäytetyö on jatkoa aiemmin samassa tutkimusryhmässä tehdyille antigeenin prosessointia B-soluissa tutkivalle Pro Gradu -työlle (lähde 10).

Opinnäytetyössä selvitettiin endogeenisten Rab-proteiinien, EEA1-proteiinin ja LAMP1-proteiinin keskinäistä vuorovaikutusta sekä sijainti B-soluissa eri aktivointiaikojen kuluessa. Kirjallisuuden perusteella oletettiin, että esimerkiksi Rab9-proteiini assosioi antigeenin kanssa vasta myöhäisessä vaiheessa.

Tutkimus toteutettiin aktivoimalla *in vitro* viljelty B-solut liukoisella antigeenillä. Tämä jälkeen solut immunovärjättiin ensin primaarivasta-aineilla ja edelleen fluoresoivilla sekundaarivasta-aineilla. Solut kuvattiin spinning disk -konfokaalimikroskoopilla. LAMP1-proteiinista tehtiin visuaalisen tarkastelun lisäksi myös korrelaatioanalyysit. Lisäksi tutkittiin, miltä Rab5/7/9/11- ja EEA1-proteiinit näyttävät aktivoimattomissa B-soluissa.

Työn tuloksena saatiin havaintoja ja korrelaatiokuvaajia Rab-proteiinien vuorovaikutuksesta EEA1- ja LAMP1-proteiinien kanssa aktivoituissa B-soluissa. Tutkimuksessa havainnollistetaan myös Rab-proteiinien ja EEA1-proteiinin käyttäytyminen aktivoimattomissa B-soluissa. Tuloksista käy esimerkiksi ilmi, ettei kirjallisuudessa esitetty oletus Rab9:n assosiaatiosta antigeenin kanssa myöhäisessä vaiheessa pidä täysin paikkaansa, vaan sen huomattiin assosioivan jo pian antigeenin internalisoitumisen jälkeen.

2 IMMUUNIJÄRJESTELMÄ

Immuunijärjestelmä on elimistön puolustusmekanismi vieraita taudinaiheuttajia eli patogeenejä vastaan. Immuunijärjestelmä on monimutkainen systeemi, joka koostuu erilaisista puolustussoluista, imukudoksista (kuten imusolmukkeet ja perna) ja molekyyleistä, jotka taistelevat yhdessä elimistön monia eri tulehduksia eli infektioita vastaan. Immuunijärjestelmä jaetaan synnynnäiseen eli luonnolliseen immunitettiin ja opittuun eli adaptiiviseen immunitettiin. ¹

Luonnollisen immunitetin solut koostuvat muun muassa syöjäsoluista, kuten makrofageista ja dendriittisoluista. Nämä solut tunnistavat yleisiä patogeenejä molekyylirakenteita ja tuhoavat patogeenit fagosytoimalla (solusyönti) ne, sekä lähettämällä signaaleja adaptiivisen immunitetin soluille. Luonnollisen immunitetin solut toimivat tulehdus- ja immuunireaktioissa ensilinjassa, mutta eivät muodosta muistijälkiä patogeenejä kohtaan. ¹

Adaptiivinen immunitetti on luonnollista immunitettia erilaistuneempi ja vastaa immunologisesta muistista. Adaptiivisen immunitetin solut ovat B- ja T-lymfosyyttejä. Lymfositit tunnistavat antigeenejä, jotka ovat patogeeneistä pilkottuja rakenteita. Lymfositit kohtaavat antigeenin yleensä imukudoksissa antigeeniä esittelevän solun, kuten dendriittisolun, pinnalla. ¹

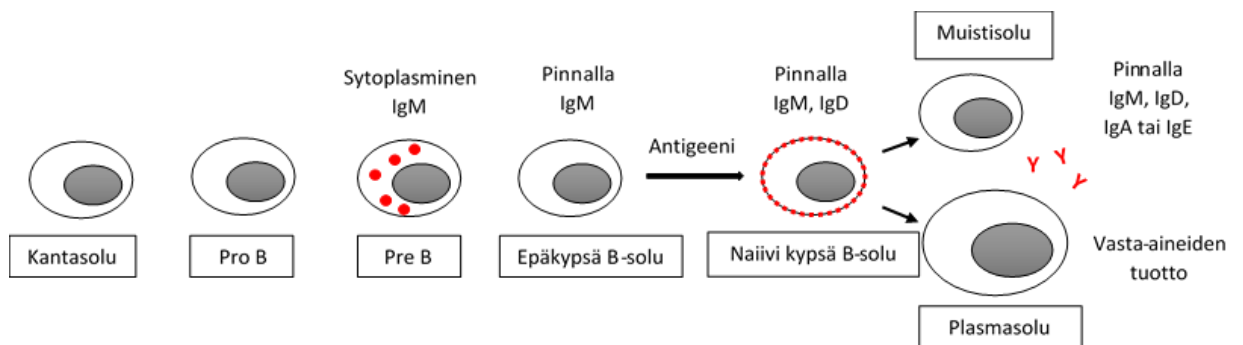
Luonnollinen ja opittu immunitetti toimivat siis tehokkaimmin yhdessä. Kohdatessaan vieraan taudinaiheuttajan, luontaisen immunitetin solut pilkkovat taudinaiheuttajan, kullavat sen imusolmukkeisiin ja esittelevät taudinaiheuttajan antigeeniosaa adaptiivisen immunitetin soluille. Adaptiivisen immunitetin solut puolestaan saavat aikaan laajan immuunireaktion, jossa tuotetaan muun muassa vasta-aineita ja sytokiinejä, jotka auttavat tuhoamaan patogeenin. ¹

3 B-SOLUT

B-solut, eli B-lymfosyytit ovat erittäin pieniä (\varnothing 5...7 μm) valkosoluja, jotka ovat keskeinen osa adaptiivista immuniteettia. B-solut vastaavat elimistön vasta-aineiden tuotannosta, jonka avulla elimistö pystyy taistelemaan tehokkaasti infektioita vastaan. ¹

B-solut kehittyvät luuytimen kantasoluista ensin pro B-soluiksi ja edelleen pre B-soluiksi ja lopulta B-solureseptoreja kantaviksi epäkypsiksi B-soluiksi. Epäkypsät B-solut siirtyvät luuytimestä verenkiertoon ja muualle sekundaarisiin imukudoksiin, jolloin ne kypsyvät naiiveiksi kypsiksi B-soluiksi. Antigeenin kohdattuina naiivit kypsät B-solut erilaistuvat edelleen joko muistisoluiksi tai vasta-aineita tuottaviksi plasmak soluiksi. ¹ (kuva 1)

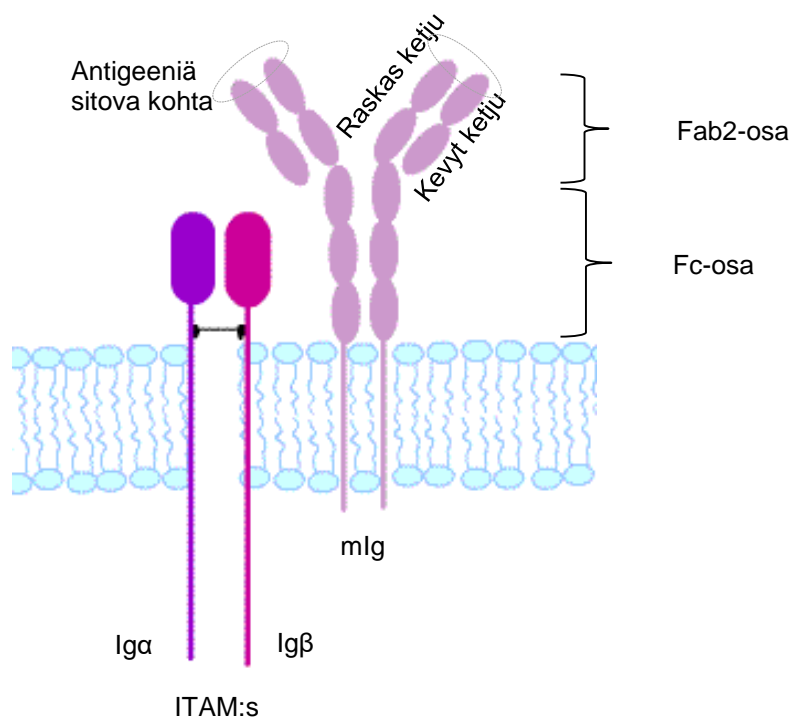
Epäkypsissä B-soluissa on antigeeniä tunnistavia B-solureseptoreja (Ig α), joten epäkypsät B-solut pystyvät sitoutumaan antigeeniin, mutta ne eivät pysty vielä tuottamaan vasta-aineita. Kypsät B-solut aktivoituvat vasta-aineita tuottaviksi plasmak soluiksi antigeenin tunnistuksen kautta. Muistisolut elävät huomattavasti pidempään, jopa kymmeniä vuosia, kuin vasta-aineita tuottavat plasmak solut, jotka yleensä kuolevat muutamissa päivissä. ¹ (kuva 1)



Kuva 1. B-solun kehitysvaiheet.

B-solut tunnistavat antigeenin B-solureseptoreiden (kuva 2) avulla. Yhden B-solun kaikki B-solureseptorit ovat samanlaisia ja jokainen B-solu tunnistaa vain yhden antigeenin yhtä tiettyä epitooppia. B-solureseptorikompleksi koostuu kalvosidososasta (Ig-osa) ja apumolekyyleistä (Ig α ja Ig β). Apumolekyyleillä on pitkä solunsisäinen häntä, ITAM, joka

toimii yhdessä erilaisten signaalimolekyylien kanssa saavuttaakseen tehokkaan antigeenin prosessoinnin. Ig-osa koostuu kahdesta identtisestä Fab-osasta, jotka ovat reseptorin antigeenin tunnistava kohta. Fab-osat ovat rakentuneet raskaasta ja kevyestä ketjusta. Reseptori sitoutuu solukalvoon eli membraaniin raskaasta ketjusta rakentuneen Fc-osan avulla. Fc-osassa on sitoutumiskohtia komplementtiproteiineille ja erilaisille solupintareseptoreille. B-solun kehityksen alkuvaiheessa B-solureseptorin Fab-osat uudelleenjärjestäytyvät satunnaisesti ja siten B-solut ovat keskenään kaikki erilaisia. Muuntautumiskykynsä ansiosta B-solut pystyvät tunnistamaan ja muistamaan arviolta 10^{14} eri antigeenien epitooppia. ^{1,2}



Kuva 2. B-solureseptorikompleksi. ¹⁹

3.1 B-solun aktivointi

B-solut kiertävät elimistössä imunesteen mukana imusolmukkeisiin ja sieltä takaisin imunestekiertoon. On tarkoituksenmukaista, että B-solut kiertävät imukudoksissa, jonne antigeenejä kulkeutuu laajoilta alueilta. B-solu voi aktivoitua vasta-aineita tuottavaksi

plasmasoluksi kahdella tapaa: T-soluista riippumattomasti tai T-soluista riippuvaisesti. Molemmassa tavoissa B-solureseptori sitoutuu antigeeniin ja antigeenin sitoutuminen johtaa Ig α ja Ig β -välitteiseen solunsisäiseen signalointiin. Solunsisäinen signalointi johtaa antigeeni-B-solureseptorikompleksin sisäänottoon ja antigeenin pilkkoutumiseen *peptidi-antigeeniksi*. T-soluvälitteisessä B-soluaktivoinnissa *peptidi-antigeeni* esitellään Th-soluille, jotka antavat puolestaan B-solulle tehokkaaseen vasta-ainetuotantoon vaa- ditut signaalit. Mikäli B-solu alkaa tuottaa vasta-aineita T-soluista riippumatta, seuraa yleensä heikompi vasta-ainetuotanto. Se, missä rakenteissa antigeeni pilkkoutuu *pep- tidi-antigeeniksi*, ei ole vielä tarkkaan selvillä. ¹

3.1.1 Rab-suvun proteiinit

GTPaasit ovat entsyymiperhe, jotka voivat sitoa ja hydrolysoida guanosiinitrifosfaattia (Guanosine TriPhosphate, GTP). Ras-proteiinit taas ovat GTPaasi-perheeseen kuuluva proteiiniperhe. Ras-proteiinit ovat ominaisia kaikille eukaryoottisoluille. Ras-proteiinit vä- littävät solujen sisäisiä signaaleja. ³

Rab-proteiinit ovat Ras-proteiiniperheeseen kuuluvia pieniä proteiineja (21...25 kDa), jotka säätelevät solujen GDP- (Guanosine DiPhosphate) ja GTP- kiertoa. Rab-proteiinit liitetään muun muassa solujen kasvuun, proteiinikuljetukseen ja endosomien tunnista- miseen. Rab-proteiinit koordinoivat kalvorakkuloiden kuljetustapahtumia. Kullekin Rab- proteiinille on ominaista sen tietty paikka solussa ja ne säätelevät laajaa kirjoa endosy- toosista, transsytoosista ja eksosytoosista kuljetusreittiä. ^{4,5}

Rab-proteiinien korkean resoluution rakennetta on tutkittu röntgenkristallografialla. Rab- proteiinit sisältävät korkeasti konservoituneita alueita, joita on löydetty myös muista Ras- perheen proteiineista. Hyvin tunnetut guaniini-nukleotidisidosmotiivit ovat samanlaisia kuin GTPaaseilla, esimerkiksi Rab- ja Ras-proteiineilla. Tämän lisäksi on useita muita lyhyen sekvenssin motiiveja, jotka ovat tyypillisiä ainoastaan Rab-proteiineille. ⁴

Rab-proteiinien poikkeavin alue on amino- ja karboksyyliipäät. Rab-proteiinien kar- boksyyliipäät sisältävät XXXCC, XXCCX, XCCXX, CCXXX tai XXCXC motiivin, joissa kaksi kysteiniä toimivat prenylaatioalustana. Tämä prenylaatioalusta on ehdottoman tär- keä membraanisitoutumiselle. Karboksyyliipään hypermuuttuva alue on vaatimus, mutta ei yksinään riittävä Rab-proteiinien oikealle lokalisoinnille solussa. Useimmat Rab-prote-

iinit toimivat tiiviisti yhdessä solukalvojen kanssa kahden geranyyli-geranyyliryhmän liityessä kahteen karboksyylipäätä lähellä olevaan kysteiiniin post-translaationaalisen addition kautta. Joillakin Rab-proteiineilla on kuitenkin vain yksi geranyyli-geranyyliryhmä. Rab-proteiinien tertiaarirakenne muistuttaa läheisesti muita GTPaaseja, joissa keskitynnyri muodostuu kuusisäikeisestä β -lehdestä, jota ympäröi α -heliksit, kuten Rab5C:llä (kuva 3). Kattavissa analyyseissä muista GTPaaseista on löydetty kaksi aluetta, joita kutsutaan kytkimiksi I ja II. Nämä sijaitsevat guaniini-nukleotidisidoksen fosfaattialueen lähellä. Näillä alueilla tapahtuu dramaattinen konformaationaalinen muutos nukleotidivaihdossa ja ne liittyvät proteiini-proteiini kontaktiin ja vastaavat nukleotidiriippuvuudesta suurimmassa osassa GTPaasi-toimintoja.^{4,6}



| kytkimet

| alueet, jotka määräävät komplementaarisuuden

| hydrofobiset kolmikkojäämät, joiden sivuketjut ovat erisuuntaan

Kuva 3. Rab5C-GppNHp -proteiinin rakenne.⁵

Eukaryoottisolujen membraanikuljetus on monimutkainen prosessi, jota säätelee laaja kirjo erilaisia proteiineja. Rab-proteiinit ovat pääasiainen solunsisäisen kalvorakkulakuljetuksen säätelijä. Rab-proteiinit on lokalisoitu kuljetusrakkuloiden membraaneihin ja niiden spesifisiin kohdeosastoihin. Rab-proteiinit kasaantuvat kohdeosastoonsa ja näin ollen niitä käytetään erilaisten soluelinten merkkiaineina.⁴ Tutkimuksessa käytetyt Rab-proteiinit ja niiden lokalisointi eukaryoottisolussa on esitetty taulukossa 1. Rab5-proteiinilla on kolme isoformia Rab5A, Rab5B ja Rab5C. Tutkimuksessa käytetty Rab5 tunnistaa nämä kaikki isoformit.

Taulukko 1. Rab-proteiinien lokalisointi eukaryoottisolussa. ^{3,4}

Rab-proteiini	Varhaiset endosomit	Myöhäiset endosomit	Lysosomit	Trans-Golgi-verkosto	Kierrätys endosomit
Rab5A, Rab5B, Rab5C	x				
Rab7		x	x		
Rab9		x		x	
Rab11				x	x

3.2 Kalvorakkulakuljetus

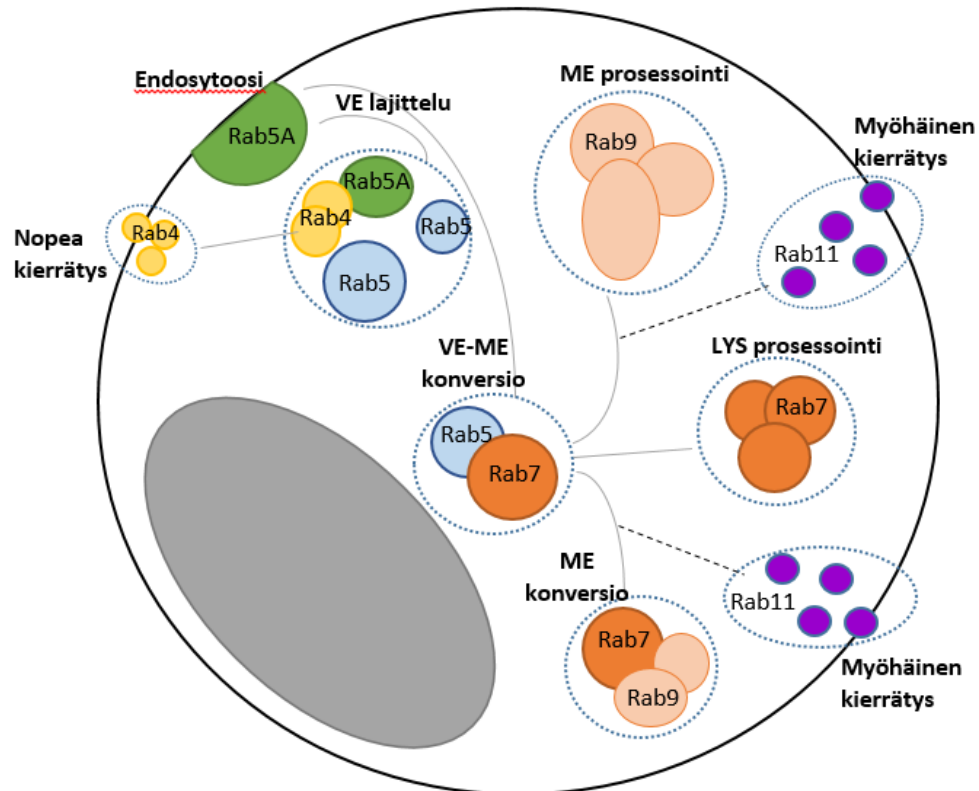
Solussa oleva kalververkosto muodostuu erilaisista endosomeista, jotka jatkuvat solun reunalta tuman lähelle. Lähimpänä reunaa olevia endosomeja kutsutaan varhaisiksi endosomeiksi, jotka ovat putkimaisia kalvorakenteita ja tuman lähellä olevia myöhäisiksi endosomeiksi, jotka puolestaan ovat varhaisia pyöreämpiä, monikalvoisia rakenteita. ⁷

Varhaisissa endosomeissa tapahtuu molekyylien lajittelu joko myöhäisiin endosomeihin tai kierrätettäviksi takaisin solukalvolle. Varhaisissa endosomeissa pH on noin 6 ⁶, eli lievästi hapan, mikä saattaa myös edesauttaa sisään otettavien reseptorien irtoamista solukalvosta. ⁷

Solun kalvorakkuloiden koordinoinnista vastaavat muun muassa erilaiset Rab-proteiinit. Varhaiset endosomit voidaan tunnistaa tyypillisesti niiden pinnalla olevien Rab5-proteiinien avulla. Myös EEA1-proteiinit (Early Endosome Associated protein) esiintyvät varhaisissa endosomeissa ja toimivat näiden merkkiaineina. Rab5- ja EEA1-proteiinit toimivat kumpikin endosomirakkuloiden yhdistymisessä, joka tapahtuu tyypillisesti varhaisten rakkuloiden kypsyessä. ^{7,8}

Kun Rab5 korvautuu Rab7-proteiinilla, varhaiset endosomit muuttuvat lysosomeiksi ja myöhäisiksi endosomeiksi. Rab7-proteiinia kehittyä varhaisen endosomin tuman puoleisella reunalla, josta se irtoaa rakkuloina ja liittyy myöhäiseen endosomiin. LAMP1-proteiinit (Lysosomal-Associated Membrane Protein 1) esiintyvät myöhäisissä endosomeissa sekä lysosomeissa ja näin ollen toimivat Rab7 tapaan niiden merkkiaineina. Kypsyessään endosomit liikkuvat tyypillisesti kohti solun keskustaa. Myöhäisten endosomien pH on hieman alhaisempi (noin 5...6)⁶ kuin varhaisten endosomien, joka selittää myöhäisten rakkuloiden ja etenkin lysosomien (pH noin 4,8)⁹ proteiineja hajottavan luonteen. ⁷

Rab4, -5 ja -5A toimivat yhdessä varhaisten endosomien (VE) kanssa, jossa ne osallistuvat molekyylien lajitteluun. Rab4:n on havaittu osallistuvan nopeaan kierrätykseen, kun taas Rab5:n on havaittu assosioivan jo endosytoosissa. Rab7 ja Rab9 toimivat yhdessä myöhäisissä endosomeissa (ME), joissa kuorma pilkkoutuu. Rab7 toimii myös lysosomien (LYS) merkkiaineena. Rab11 toimii myöhäisessä kierrätyksessä. ¹⁰ (kuva 4)



Kuva 4. Rab-proteiinit eukariotisolussa.

4 MIKROSKOPOINTI

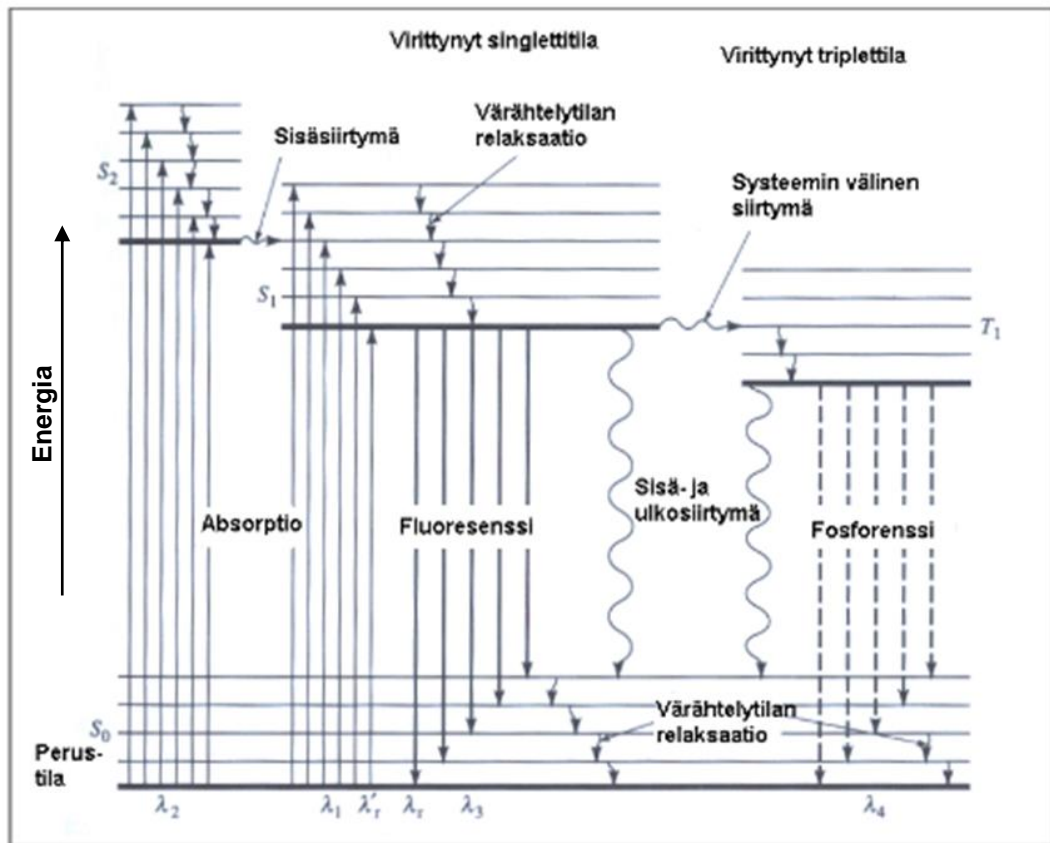
Tutkimuksessa käytetyn spinning disk -konfokaalimikroskoopin toiminta perustuu fluoresenssiin ja kiinnitettyjen solujen immunofluoresenssivärjäykseen.

4.1 Fluoresenssi

Fluoresenssi tarkoittaa molekyylin tietyn viritystilän purkautumisesta aiheutuvaa fotonien emissiota. Molekyylin altistuessa valolle, jolla on oikea aallonpituus, molekyyli absorboi osan valon energiasta. Energian absorptio aiheuttaa molekyylin elektronin virittymisen korkeammalle energiatasolle eli siirtymisen viritystilaan. Viritystila ei ole pysyvä ja molekyyli palaa ajan kuluessa takaisin perustilaan. Molekyylin virityksen purkautuessa molekyyli vapauttaa ylimääräisen energiansa ja palaa jälleen perustilaan. Absorboidusta energiasta ja molekyylin luonteesta riippuen molekyyli voi virittyä singlettitilaan tai korkeammalle energiatasolle triplettitilaan. Viritystilän purkautuessa singlettitilasta, puhutaan fluoresenssista. Vastaavasti, jos viritystila purkaantuu triplettitilasta, on kyseessä fosforesenssi. Virittävän säteilyn loputtua virittyneen molekyylin elektroni palaa perustilaan lähes välittömästi: elektronin viritystilän purkautuminen kestää noin $10^{-8} \dots 10^{-4}$ sekuntia kun taas fosforesenssissa palautumisaika voi olla jopa useita tunteja.¹¹

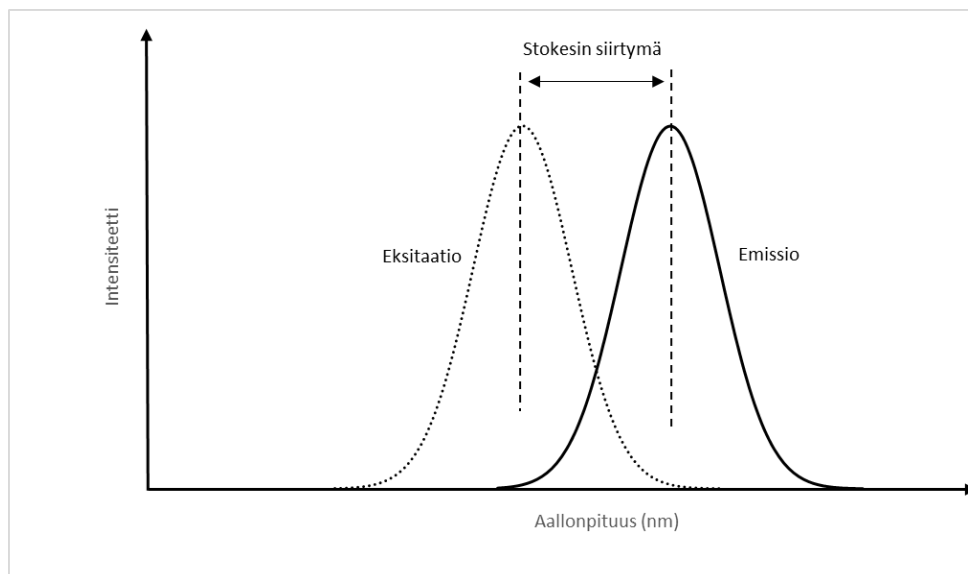
Jablonskin diagrammi (kuva 5) kuvaa molekyylin siirtymät viritystilalta toiselle. Alimmainen tila (S_0) on molekyylin perustila, johon molekyyli emission jälkeen palautuu. S_1 ja S_2 ovat ensimmäinen ja toinen virittynyt singlettitila, josta palautuvan molekyylin emittoimaa energiaa kutsutaan fluoresenssiksi. S_2 -tilassa molekyyli voi systeemin sisäisellä siirtymällä siirtyä alempaan energiatalaan S_1 ennen palautumistaan perustilaan. T_1 on puolestaan ensimmäinen virittynyt triplettitila, josta perustilaan palaavan molekyylin sanotaan fosforoivan. Perustila, kuten muutkin sigletti- ja triplettitilat, jakaantuvat moniin värähtelytiloihin. Tilojen sisällä tapahtuvaa värähtelyä kutsutaan värähtelytilan relaksaatioksi, jossa energia vapautuu lämpönä.¹¹

Kun molekyyli palaa mistä tahansa virittyneestä tilasta perustilaan S_0 , se emittoi virittyneen tilan ja perustilan energiamäärien erotusta vastaavalla aallonpituudella. Relaksaatio voi tapahtua mihin tahansa perustilan värähtelytilaan, mutta se alkaa aina singlettitilan alimmasta värähtelytilasta.¹¹



Kuva 5. Jablonskin diagrammi. ¹²

Emittoidussa valossa on käytännössä vähemmän energiaa kuin eksitaatiovalossa. Siksi emissiovalon aallonpituus on suurempi. Näin ollen emissiovalo on myös eri väristä kuin eksitaatiovalo.¹³ Näiden valojen aallonpituuksien erotusta kutsutaan Stokesin siirtymäksi. Molemmilla käyrillä intensiteetillä on maksimiarvo (kuvaajan huippu), jolla on tietty aallonpituus. (kuva 6)



Kuva 6. Stokesin siirtymä.

Eksitaation aallonpituus on olennaista molekyylin absorptioon ja näin ollen virittymisen kannalta. Mitä lähempänä eksitaatiovalon aallonpituus on fluoroforin eksitaation maksimi-intensiteetin aallonpituutta, sitä enemmän fluorofori absorboi valoa. Tällöin myös virittyneiden molekyylien lukumäärä on suurempi ja näin ollen emission intensiteetti on suurempi. Tätä tietoa voidaan hyödyntää sovelluksissa, joissa tunnetaan fluoresoiva aine ja halutaan mahdollisimman hyvä signaali (emissio). Tällöin aineeseen johdettavan valon aallonpituus valitaan kyseisen aineen eksitaatiokäyrän maksimin mukaan.¹³

4.2 Immunofluoresenssi

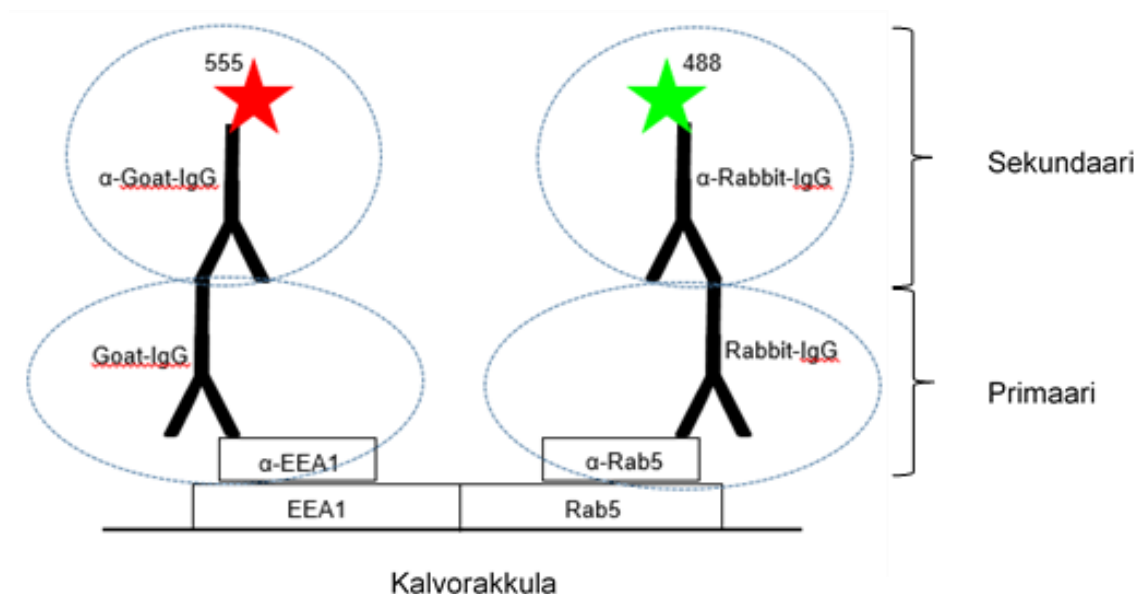
Immunofluoresenssin avulla voidaan kiinnitetyistä soluista osoittaa haluttuja proteiineja tai antigeenejä. Immunovärjäyksellä voidaan liittää fluoroforeja vasta-aineisiin tuhoamatta niiden biologista aktiivisuutta. Antigeenin sijaintia soluissa voidaan tarkastella fluoresenssimikroskoopin avulla, kun solut on käsitelty fluoresoivilla vasta-aineilla. Eksitaatioaallonpituudella fluorofori emittoi pitempiaaltoista valoa, joka voidaan havaita fluoresenssi- tai konfokaalimikroskoopilla.¹⁴

Immunofluoresenssivärjäyksistä on olemassa kaksi menetelmää. Yksinkertaisemmassa, suorassa menetelmässä, käytetään vain yhtä fluoresoivaa vasta-ainetta, mikä tunnistaa solun antigeenin tai proteiinin. Opinnäytetyössä käytetty menetelmä on epä-

suora menetelmä. Epäsuorassa menetelmässä käytetään puolestaan kahta vasta-ainetta. Ensimmäiseksi laitetaan primaarivasta-aine, joka tunnistaa solun antigeenin tai proteiinin kuten suorassakin menetelmässä. Toisessa vasta-aineessa eli sekundaarivasta-aineessa on fluoresoiva merkkiaine, mikä absorboi tiettyä aallonpituutta. Sekundaarivasta-aineen tehtävänä on tarttua primaarivasta-aineeseen. Kummassakin menetelmässä näytteet käsitellään siten, että voidaan estää epäspesifisiä tartuntoja sekä taustan värjäytymistä (blokkaukset).^{15,16}

Immunofluoresenssimenetelmä on laajalti käytössä tutkimustyössä erilaisten aineiden paikantamiseksi soluista ja kudoksista. Menetelmä on myös tärkeä käytännön lääketieteessä, kliinisessä patologiassa ja tartuntatautien diagnostiikassa.¹⁴

Esimerkiksi Rab5-proteiini ja EEA1-proteiini voidaan immunovärjätä epäsuorasti. Käsittelemätön vasta-aine eli α -Rab5 (-Rabbit-IgG) tarttuu kalvorakkulan pinnalla olevaan Rab5-proteiiniin. Lisäämällä fluoresoivaa (vuohessa tuotettua) α -Rabbit-IgG:tä saadaan aikaan Rab5:n värjäytyminen. Vastaavasti käsittelemätön vasta-aine α -EEA1 (-Goat-IgG) tarttuu kalvorakkulassa olevaan EEA1-proteiiniin ja värjäys saadaan aikaan lisäämällä (aasissa tuotettua) fluoresoivaa α -Goat-IgG:tä. (kuva 7)



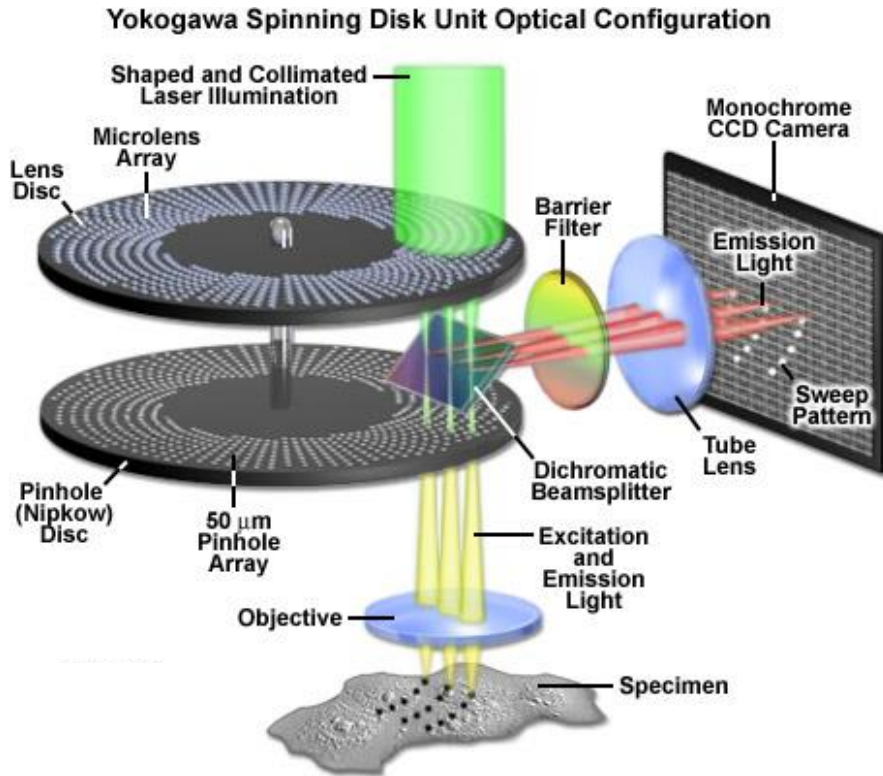
Kuva 7. Epäsuora menetelmä.

4.3 Spinning Disk -konfokaalimikroskooppi

Spinning Disk Confocal Microscope (SDCM) on solubiologiassa paljon käytetty konfokaalimikroskooppi, jonka periaate perustuu fluoresenssiin. SDCM-mikroskoopilla saadaan nopeasti ja tarkasti 3D-kuvaa myös elävistä soluista. SDCM on tavallista konfokaalimikroskooppia huomattavasti nopeampi, sillä pyörivän levyn ansiosta (Nipkow Spinning disk) mikroskooppi pystyy valottamaan näytteen pyyhkäisynomaisesti, kun taas perinteisessä konfokaalimikroskoopissa näyte valotetaan yksi pikseli kerrallaan. ¹⁷

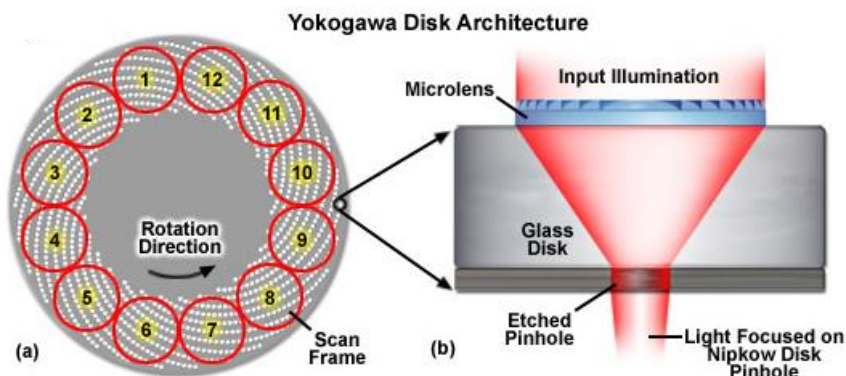
Yokogawan spinning disk -yksikössä (kuva 8) on kaksi samalla akselilla kohdakkain olevaa levyä, joiden välissä on dikromaattinen säteenjakajapeili. Molemmissa levyissä on keskimäärin 20 000 mikroreikää spiraalin muotoisesti. Ylempi levy on lasia (kuva 9), jonka pinnalla on Fresnelin mikrolinssejä, mitkä ohjaavat ja tarkentavat valon halkaisijaltaan 50 µm mikroreistä alempaan levyyn ja siitä objektiivin läpi näytteeseen. ¹⁷

Kuvantamisyksikköön tuodaan laservaloa yksimoodisen eli yksimuotoisen optisen kuidun läpi. Tämä valo ohjataan linssin läpi, joka säätää valon Gaussin käyrän mukaisesti jakautuneen intensiteettijakauman keskikohdan kohdistuslinssin avulla mikrolinssilevylle. Mikrolinssilevyn tarkoituksena on ohjata merkittävä osa valosta, 40...60 % ¹⁸, dikromaattiselle säteenjakajalle. Säteenjakajan kautta valo kuljetetaan alapuolella olevalle Nipkow-reikälevylle. Säteenjakajan kattama ala projisoituna reikälevylle on 7 mm x 10 mm. Tässä alassa reikälevyllä on noin 1000 reikää. Mikroreikien muodostaman spiraalin muoto on suunniteltu siten, että yksittäinen kuva muodostuu levyn pyörähdettyä 30 astetta. Koska jokaisen spiraalin yksittäisen reiän etäisyys levyn keskipisteestä on hieman eri kuin muilla, koko näyte voidaan kattaa osittain päällekkäisillä rei'illä. ¹⁷
(kuva 8)



Kuva 8. Yokogawa spinning disk -yksikön periaate. ¹⁷

Yokogawa-konfokaaliskannerin maksimi pyörimisnopeus on mallista riippuen 1800 (CSU-10), 5000 (CSU-22) tai 10 000 (X1) RPM. Näistä jokaisen reikälevyn reikäkuvio skannaa 12 kuvaa 360 asteen pyörähdyksellä (kuva 9). Näin saadaan vastaavasti laitekohtaisesti kuvantamisnopeudet 360, 1000 ja 2000 fps (kuvaa sekunnissa). Tässä tutkimuksessa käytettiin mallia CSU-22.¹⁷



Kuva 9. Yokogawa-mikrolinssilevyn periaate. ¹⁷

Eksitaatiovalo ohjataan rei'istä näytteelle konfokaaliobjektiivin kautta. Näytteessä tapahtuu fluoresenssi-ilmiö, jonka synnyttämä emissiovalo ohjataan objektiivin kautta reikälevyn reikiin pienennettynä kuvana. Valon saapumisreikää vastaava reikä toimii nyt poistumisreikänä ohjaten näytteessä syntyneen kyseistä pistettä vastaavan kuvan säteenjakajalle. Koska konfokaaliobjektiivin polttopiste on sama kumpaankin suuntaan, se ei ohjaa muualla näytteessä syntynyttä häiriöemissiota reiälle.¹⁷ (kuva 8)

Yokogawa-säteenjakajan rakenne on sellainen, että se päästää läpi lyhyitä aallonpituuksia ja heijastaa pitkiä aallonpituuksia. Näin ollen alussa säteenjakajalle ohjattu lyhytaallonpituuksinen eksitaatiovalo läpäisi säteenjakajan. Nyt pitkäaallonpituuksinen emissiovalo heijastuu siitä häiriösuodattimelle (barrier filter). Häiriösuodattimella poistetaan mahdollisesti jäljellä oleva hajavalo sekä valo, joka ei kuulu fluoresenssin emissionauhaan. Suodattimelta valo kulkee CCD-kameralle, jossa yksittäisten reikien valosta muodostetaan lopullinen kuva.¹⁷ (kuva 8)

5 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

Opinnäytetyössä käytetyt menetelmät sisältävät B-solujen soluviljelyn, transfektion, aktivoinnit ja värjäykset sekä solujen kuvantamiseen käytetyt menetelmät ja materiaalit.

5.1 Soluviljely

Tutkimuksessa viljeltiin *in vitro* hiiren syöpäsoluista eristettyä B-solulinjaa A20D1.3. Kasvatus tehtiin soluviljelykaapissa, jossa lämpötila oli + 37 °C ja CO₂ pitoisuus 5 %. Soluja kasvatettiin T75-pullossa, jossa kasvatusliuosta, RPMI 1640 (HyClone, GE Healthcare Life Sciences), oli täydennetty 1 % L-glutamiinia, 1 % HEPES, 1 % 50 U/ml penisilliini-streptomysiiniä, 0,5 % β-merkaptotetanolia ja 10 % lämpöinaktivoitua FCS. Solut jaettiin kolmesta viiteen kertaa viikossa niin, että solutiheys pysyi välillä (0,4...1,5) x 10⁶ /ml. Solut laskettiin Bürker-kammion avulla valomikroskoopilla kaavan 1 mukaisesti. Kaavassa 1 kerroin 10⁴ on kammion muuntokerroin:

$$\text{Solutiheys (solua/ml)} = \frac{\text{Lasketut solut}}{\text{lasketut ruudut}} \cdot \text{Laimennoskerroin} \cdot 10^4$$

Kaava 1. Solutiheys.

5.2 Transfektio

Transfektiossa B-solun sisään viedään sähköshokin (elektroporaatio) avulla haluttua rengasmaista DNA-molekyyliä eli plasmidia. Plasmidissa on fluoresoivaa proteiinia koodaava geeni, jonka tuottamaa proteiinia voidaan havaita konfokaalimikroskoopin avulla. Tutkimuksessa tehdyt transfektiot olivat transienteja eli väliaikaisia, jossa DNA pysyy solussa 1...3 päivää ja katoaa solun jakautuessa.

6-kuoppalevyille pipetoitiin 4 ml 1 % DMSO-cRPMI -mediumia per kuoppa. Kuoppalevy laitettiin soluviljelykaappiin lämpenemään. A20D1.3 B-solut laskettiin Bürker-kammion avulla valomikroskoopilla. Soluja otettiin 4 miljoonaa, jotka laitettiin sentrifugiin viideksi minuutiksi 450 RPM. Kasvatusliuos pipetoitiin pois ja tilalle laitettiin 180 µl kylmää 2S-liuosta (5 mM KCl; 15 mM MgCl₂; 15 mM HEPES; 50 mM natriumsukkinaatti; 150

mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄; pH 7,2) ja 4 µg (10 µl) Rab5A-RFP plasmidia. Transfektio tehtiin AMAXA nucleofector II Biosystems -elektroporaatiolaitteella käyttäen ohjelmaa x-005. Transfektoidut B-solut siirrettiin kyvetistä kuoppalevyille ja annettiin toipua kahden vuorokauden ajan + 37 °C:ssa 5 % CO₂ pitoisuudessa.

Rab5A-RFP plasmidi oli saatu lahjoituksena professori J. Ivaskalta.

5.3 B-solujen aktivointi ja immunovärjäys

12 kuoppaisen mikroskooppilasien (Fisher Scientific) kuoppiin pipetoitiin 20 µl 4 µg/ml fibronectiiniä PBS:ssä ja annettiin tarttua kuoppiin 30 minuuttia huoneenlämmössä.

A20D1.3 B-solut laskettiin Bürker-kammion avulla valomikroskoopilla. Otettiin 750 000 solua, jotka sentrifugoitiin pohjaan 1300 RPM 2 minuutin ajan. Sentrifugoinnin jälkeen kasvatusliuos poistettiin ja tilalle pipetoitiin 240 µl kuvantamispuskuria (10 % FCS-PBS) sekä 1,2 µl liukoista antigeeniä (Donkey-anti-mouse-F(ab)₂-647, 1,5 mg/ml, lopullinen F(ab)₂-konsentraatio oli 0,65 µg/ml). Solut laitettiin jäälle odottamaan aktivointia. B-solut pipetoitiin kuoppiin (20 µl/kuoppa) ja annettiin aktivoitua haluttu aika (vastaavat aikapistteet luvussa 6) soluviljelykaapissa (+ 37 °C, 5 % CO₂ pitoisuus).

Aktivoinnin jälkeen solut kiinnitettiin 4 % PFA:lla huoneenlämmössä 10 minuuttia. Kuopat huuhdeltiin PBS:llä, jonka jälkeen kuoppiin pipetoitiin huoneenlämmössä 5 minuutin ajaksi ”läpäisevyyspuskuri” (0,1 % triton-x100 / PBS), jonka avulla soluista saatiin huokoiset värjäystä varten. Tämän jälkeen solut huuhdottiin jälleen PBS:llä, minkä jälkeen solut käsiteltiin huoneenlämmössä tunnin ajan ”estopuskurilla” (1 % BSA-0,5 % seerumia / PBS), jonka avulla estettiin epäspesifisiä vasta-ainetartuntoja.

Ensimmäinen (primaari) värjäys tehtiin värjäyspuskurissa (0,3 % Triton-x100 / 1 % BSA PBS:ssä). Värjäysliuosten annettiin olla + 8 °C:ssa yön yli. Primaarivärjäyksessä käytetyt vasta-aineet ja laimennokset ovat taulukossa 2.

Toinen värjäys (sekundaari) aloitettiin huuhtelemalla kuopat kolme kertaa PBS:llä. Sekundaarien annettiin olla tunnin ajan huoneenlämmössä, minkä jälkeen kuopat huuhdeltiin kolme kertaa PBS:llä. Huuhtelun jälkeen kuoppiin pipetoitiin peitinöljyä (Fluoromount-G, SothernBiotech) ja peitettiin kuopat peitinlasilla (Nr.1,0; 24x60 mm). Sekundaarivärjäyksessä käytetyt vasta-aineet ja laimennokset ovat taulukossa 2.

Taulukko 2. EEA1 ja LAMP1 -värjäyksien primaari- ja sekundaarivasta-aineet ja laimennokset.

EEA1 värjäykset		LAMP1 värjäykset	
Primaarivasta-aine	Laimennos	Primaarivasta-aine	Laimennos
Goat-EEA1	1:50	LAMP1	1:75
Rabbit-Rab5	1:1000	Rabbit-Rab5	1:600
Rabbit-Rab7	1:100	Rabbit-Rab7	1:75
Rabbit-Rab9	1:250	Rabbit-Rab9	1:250
Rabbit-Rab11	1:250		
Sekundaarivasta-aine	Laimennos	Sekundaarivasta-aine	Laimennos
α -Rabbit-488	1:600	α -Rat-488	1:600
α -Goat-555	1:600	α -Rabbit-555	1:600

5.4 Spinning disk -konfokaalimikroskoopi

Tutkimuksessa käytettiin Zeiss Axiovert-200M -mikroskooppia, jossa oli Yokogawa CSU22 spinning disk -konfokaaliyksikkö. Objektivina käytettiin 63x öljyobjektiveja. Tutkimuksessa käytettiin kolmea eri kanavaa, joiden laserien eksitaatioaallonpituudet olivat 488 nm, 561 nm ja 642 nm. Kuvausohjelmassa käytössä oli SlideBook6 (Intelligent Imaging Innovations Incorporation).

Kuvat otettiin 3D-muodossa, jossa pikselikoko oli 0,102 μ m. Kuvausohjelman avulla säädettiin kuvattavan solun ylä- ja alarajat sekä määritettiin kuvanottoväli (0,5 μ m). Ohjelmalla säädettiin valotusaika (noin 100...800 ms) sopivaksi kullekin kanavalle. Tarvittaessa säädettiin intensiteetin vahvuutta (gain). EEA1:n kanssa vahvuus oli 90 ja LAMP1:n kanssa 170.

5.4.1 Korrelaatioanalyysit

Korrelaatiolla tutkittiin LAMP1-proteiinin, Rab5/7/9-proteiinien ja antigeenin riippuvuutta toisiinsa nähden. Korrelaation arvo 1 kertoo, että muuttujat korreloivat täysin keskenään. Arvo 0 kertoo sen, että korrelaatio on satunnaista ja arvolla -1 korrelaatio on negatiivinen. Korrelaatioista tehtiin kuvaajat, joissa tarkasteltiin Rab-proteiinien ja LAMP1:n, Rab-proteiinien ja antigeenin sekä LAMP1:n ja antigeenin suhdetta toisiinsa.

Korrelaatioanalyysit tehtiin BioImageXD-ohjelmalla. Kuvien intensiteettien kynnyksarvot säädettiin manuaalisesti siten, että jokaiselle tutkittavalle solulle määritettiin sama kynnyksarvo. Kynnyksarvon säätö ei vaikuta korrelaatioon, mutta säätämällä arvoa saadaan oikeat kalvorakkulat näkyviin ja taustan vaikutus poistettua. (Tehnyt M.Vainio)

5.4.2 Kuvantaminen

Kuvien intensiteetit säädettiin ImageJ-ohjelmalla ja kynnyksarvot BioImageXD-ohjelmalla (tehnyt M.Vainio).

6 TULOKSET

Tässä luvussa on esitetty opinnäytetyön käytännön osuuden tulokset kuvien avulla. Transfektioista ei saatu tuloksia pitkästä optimoinnista huolimatta. Luvussa 6.2 on esitetty aktivoimattomien B-solujen tulokset. Luku 6.3 käsittelee EEA1- ja Rab-proteiinien avulla tutkittuja antigeenillä aktivoituja B-soluja ja luvussa 6.4 on esitetty LAMP1- ja Rab-proteiinien avulla tutkittuja antigeenillä aktivoituja B-soluja.

6.1 Rab5:n toiminta muiden kalvorakkulaproteiinien kanssa aktivoituissa B-soluissa

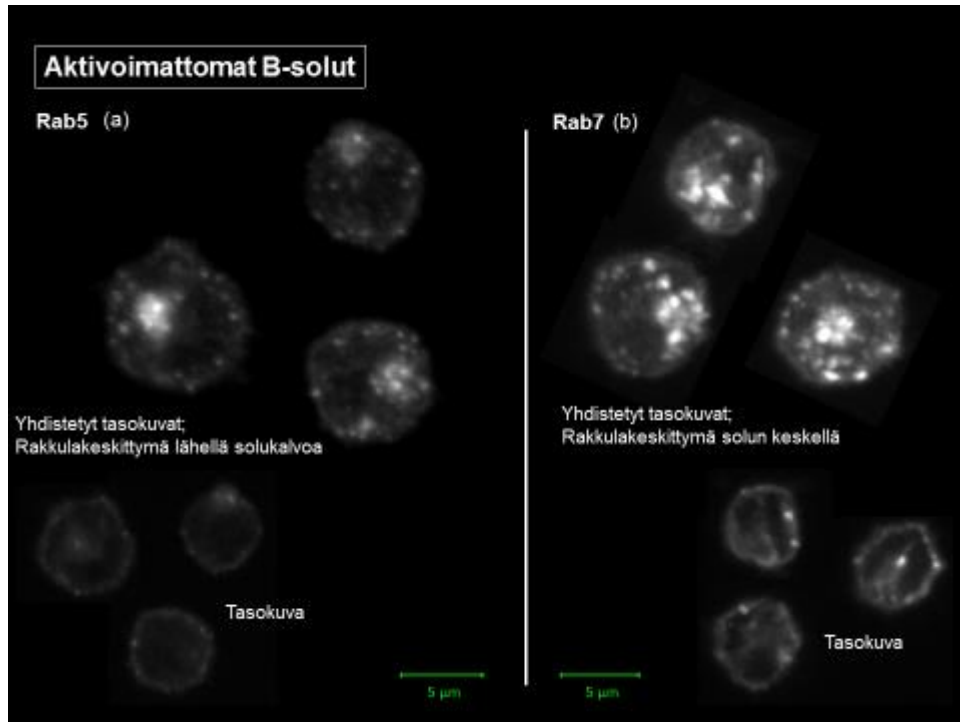
Tavoitteena oli ilmentää Rab5-RFP B-soluissa, aktivoida solut ja tutkia muiden kalvorakkulaproteiinien suhdetta Rab5-RFP-rakkuloihin. Rab5-RFP:n transfektio B-soluihin ei kuitenkaan onnistunut pitkistä optimoinneista huolimatta. Tätä on pohdittu tarkemmin luvussa 7.

6.2 Kalvorakkulakuljetukseen osallistuvien proteiinien lokalisointi aktivoimattomissa B-soluissa

Aktivoimattomat B-solut ovat niin sanottuja lepääviä soluja, sillä niille ei ole esitelty antigeeniä. Tutkimuksessa haluttiin selvittää missä ja millaisina antigeenin prosessointiin osallistuvat Rab-proteiinit ilmenevät B-solussa, kun solut eivät ole aktivoituneet eli ne eivät ole kohdanneet antigeeniä.

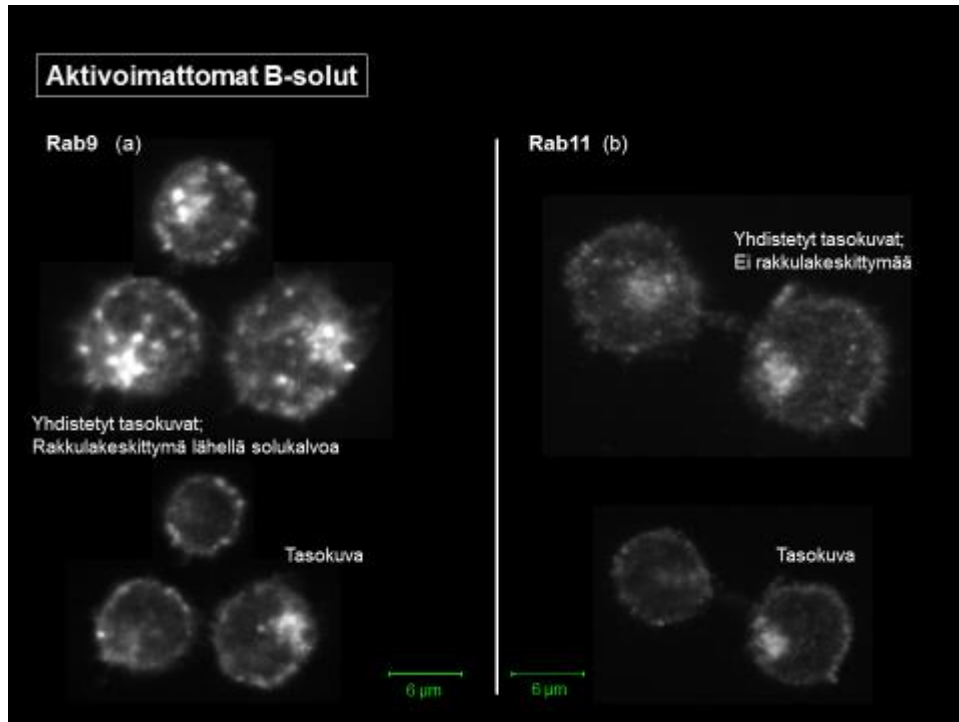
Aktivoimattomissa B-soluissa olevia EEA1- ja Rab-proteiineja tutkittaessa tehtiin erittäin mielenkiintoisia havaintoja näiden keskinäisistä suhteista. Rab5/7/9-proteiinien huomattiin kasaantuneen solun keskiosaan eräänlaiseen rakkulakeskittymään. (kuvat 10 ja 11)

Rab5-proteiinit ovat lepäävien B-solujen rakkulakeskittymässä vähiten aktiivisia (kuva 10 a), kun taas myöhäiset rakkulat Rab9:t ovat aktiivisempia (kuva 11 a) ja Rab7:t selvästi aktiivisimpia (kuva 10 b). Rab7-proteiinit vaikuttaisivat olevan melko aktiivisia rakkulakeskittymän lisäksi myös muualla B-soluissa. Rab7-proteiini muodostaa suurehkoja kalvorakkuloita myös solukalvolla ja jopa säikeitä rakkulakeskittymästä solukalvolle (kuva 10 b).



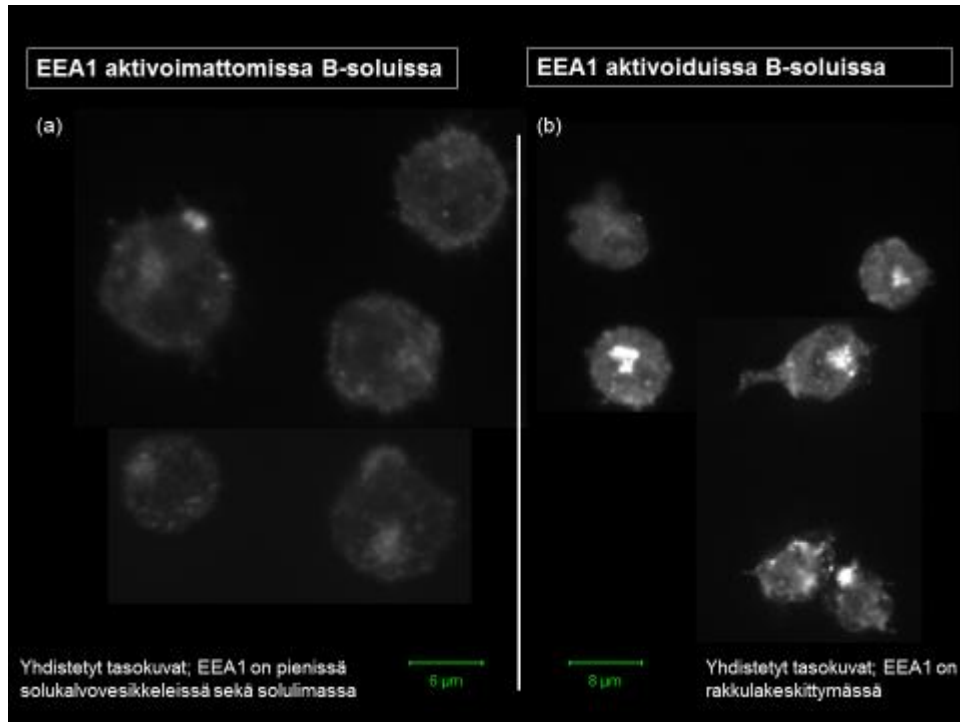
Kuva 10. Rab5 ja Rab7 aktivoimattomissa B-soluissa.

Rab9 (kuva 11 a) vaikuttaa olevan hyvin aktiivinen sekä solukalvolla että rakkulakeskittymässä lepäävissä B-soluissa. Tutkimus osoittaa, että Rab11-proteiinit eivät kasaannu rakkulakeskittymään (kuva 11 b). Rab11 kalvorakkulat vaikuttavat vähemmän aktiivisilta ja Rab11 muodostaa hyvin pieniä, mutta selkeitä rakkuloita ympäri solulimaa (kuva 11 b).



Kuva 11. Rab9 ja Rab11 aktivoimattomissa B-soluissa.

Aktivoimattomissa B-soluissa EEA1-proteiinit (kuva 12 a) ovat hyvin epäaktiivisia eivätkä ne kasaannu Rab5/7/9 tavoin rakkulakeskittymään. EEA1-proteiinit ovat lähes yksinomaan solulimassa tai pieninä rakkuloina aivan solukalvon pinnalla. Aktivoituissa B-soluissa EEA1-proteiinit (kuva 12 b) ovat kuitenkin selvästi aktiivisia ja ne kasaantuvat rakkulakeskittymään.



Kuva 12. EEA1 aktivoimattomissa ja aktivoituissa B-soluissa.

6.3 Rab5/7/9/11:n ja EEA1:n lokalisaatio sekä keskinäinen vuorovaikutus aktivoituissa B-soluissa

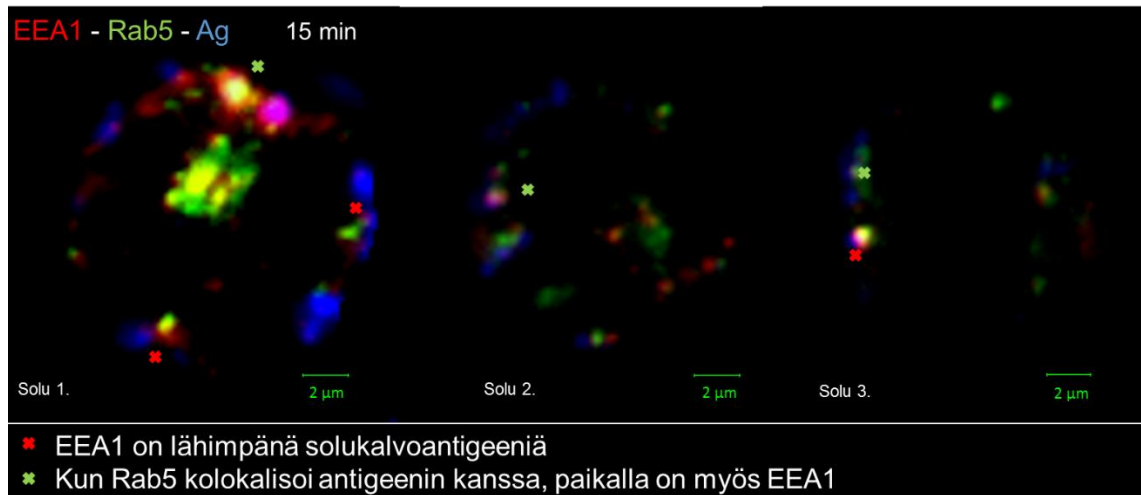
EEA1 on yleisesti käytetty varhaisten endosomien proteiini ja sitä on käytetty laajalti varhaisten endosomien merkkiaineena. Rab-proteiinien puolestaan tiedetään olevan yleispäteviä merkkiaineita tietyille solurakenteille, mutta Rab-proteiineilla on raportoitu olevan myös rooleja, jotka ovat ominaisia tietyille soluille.^{7,8}

Tutkimuksessa haluttiin selvittää Rab-proteiinien luonne B-soluissa ja määrittää, mitkä Rab-proteiineista toimivat yhdessä EEA1:n kanssa aktivoituissa B-soluissa. Näiden välistä vuorovaikutusta tutkittiin immunovärjäyksin ja kuvantamalla värjäytyt solut spinning disk -konfokaalimikroskoopilla.

6.3.1 EEA1:n ja Rab5:n vuorovaikutus aktivoituissa B-soluissa

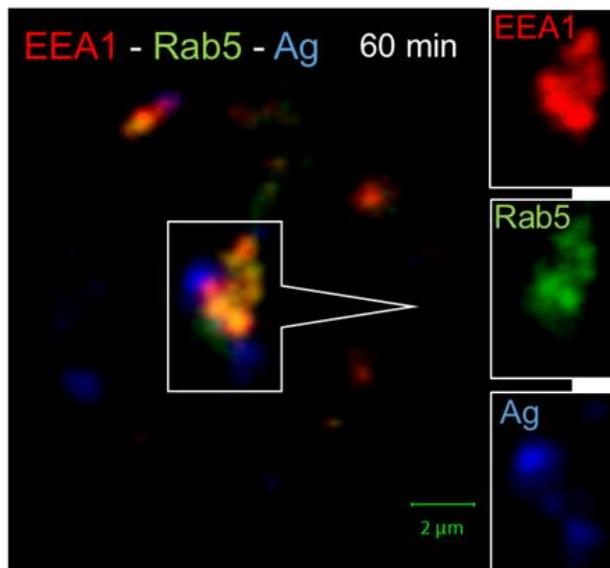
EEA1:n ja Rab5:n on raportoitu toimivan yhdessä ja kolokalisoiden pian endosytoosin jälkeen, mutta niiden rooleja B-soluissa ei ole tiettävästi tutkittu. Yllättäen havaittiin, että

EEA1 (punainen) on ensimmäisenä rakkulaproteiinina lähimpänä solukalvolla olevaa antigeeniä (sininen). Rab5 odottaa vasta syvemmällä solulimassa, joten EEA1- ja Rab5-proteiinit eivät ole samoissa kalvorakkuloissa. Toisaalta, jos Rab5 kolokalisoi antigeenin kanssa (vihreä) aikaisessa aikapisteessä, kalvorakkuloissa on aina läsnä myös EEA1. (kuva 13)



Kuva 13. EEA1, Rab5 ja antigeenin lokalisointi ja keskinäinen vuorovaikutus 15 minuutin aikapisteessä. Tasokuva.

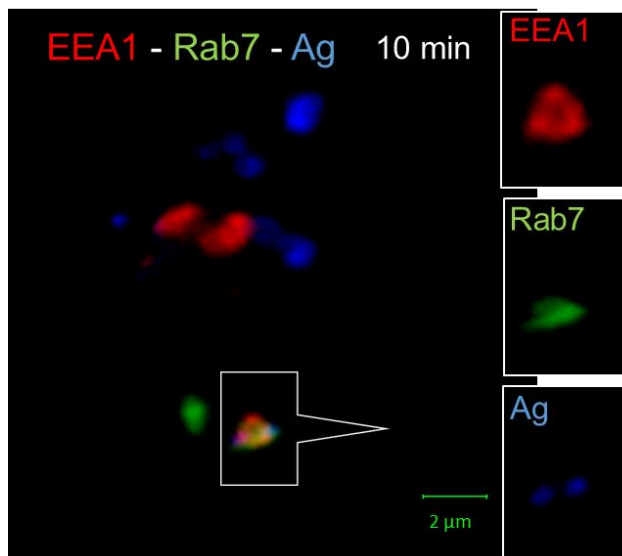
Kokeessa seurattiin, miten EEA1:n ja Rab5:n vuorovaikutus antigeenin kanssa muuttuu ajan kuluessa ja havaittiin, että ne eivät enää 60 minuutin kohdalla kolokalisoi rakkula-keskittymässä antigeenin kanssa, vaikka EEA1 ja Rab5 ovatkin antigeenin läheisyydessä. EEA1 ja Rab5 kolokalisivat kuitenkin myöhäisemmässä aikapisteessä vahvasti keskenään (oranssi/keltainen). (kuva 14)



Kuva 14. EEA1, Rab5 ja antigeenin lokalisointi ja keskinäinen vuorovaikutus 60 minuutin aikapisteessä. Tasokuva.

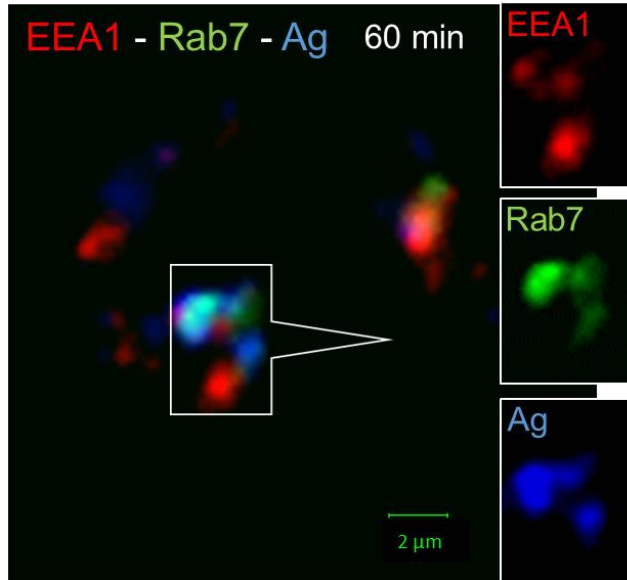
6.3.2 EEA1:n ja Rab7:n vuorovaikutus aktivoiduissa B-soluissa

Tutkittaessa EEA1:llä ja Rab7:llä immunovärjättyjä aktivoituja B-soluja huomattiin, että matkalla kohti Rab-keskittymää osa antigeeniä sisältävistä EEA1-rakkuloista liittyi monirakkulaiseen Rab7-kompleksiin (kuva 15). Olettamuksena on, että myös Rab5 on tässäkin kompleksissa läsnä, mutta tämä jää vielä selvitettäväksi.



Kuva 15. EEA1, Rab7 ja antigeenin lokalisointi ja keskinäinen vuorovaikutus 10 minuutin aikapisteessä. Tasokuva.

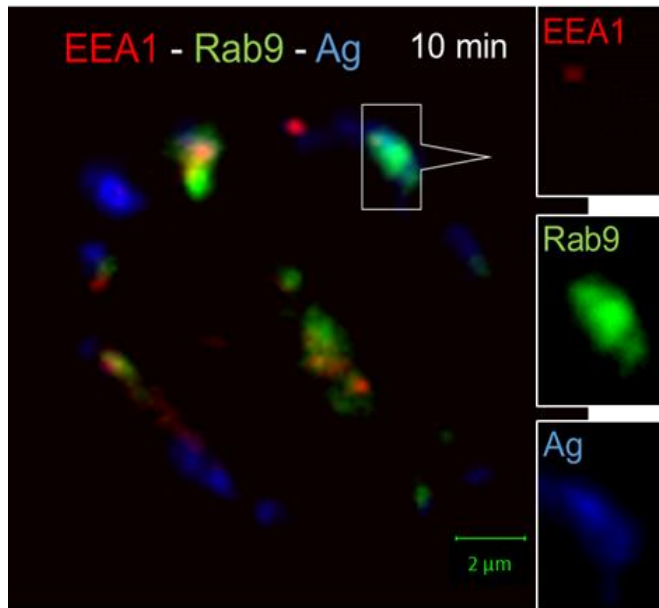
60 minuutin aikapisteessä antigeeni on kasaantunut solun keskelle rakkulakeskittymään, missä antigeeni kolokalisoi hyvin Rab7 kanssa (turkoosi). EEA1 on myös rakkulakeskittymässä, mutta se ei kolokalisoi antigeenin eikä Rab7:n kanssa. (kuva 16)



Kuva 16. EEA1, Rab7 ja antigeenin lokalisointi ja keskinäinen vuorovaikutus 60 minuutin aikapisteessä. Tasokuva.

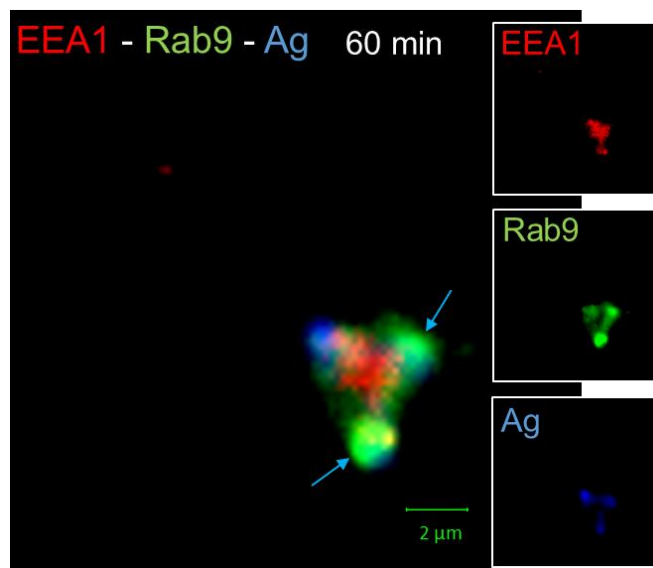
6.3.3 EEA1:n ja Rab9:n vuorovaikutus aktivoituissa B-soluissa

Tutkittaessa EEA1:llä ja Rab9:llä immunovärjättyjä aktivoituja B-soluja huomattiin, että joissain kohdissa Rab9 kolokalisoi selkeästi antigeenin kanssa (turkoosi) suurissa rakkuloissa solukalvon läheisyydessä. Rab9:n ja antigeenin kolokalisoidessa, paikalla ei ole EEA1-proteiinia. Pääosin Rab9 ei kuitenkaan kolokalisoi antigeenin kanssa vielä tässä varhaisessa aikapisteessä. (kuva 17)



Kuva 17. EEA1, Rab9 ja antigeenin lokalisointi ja keskinäinen vuorovaikutus 10 minuutin aikapisteessä. Tasokuva.

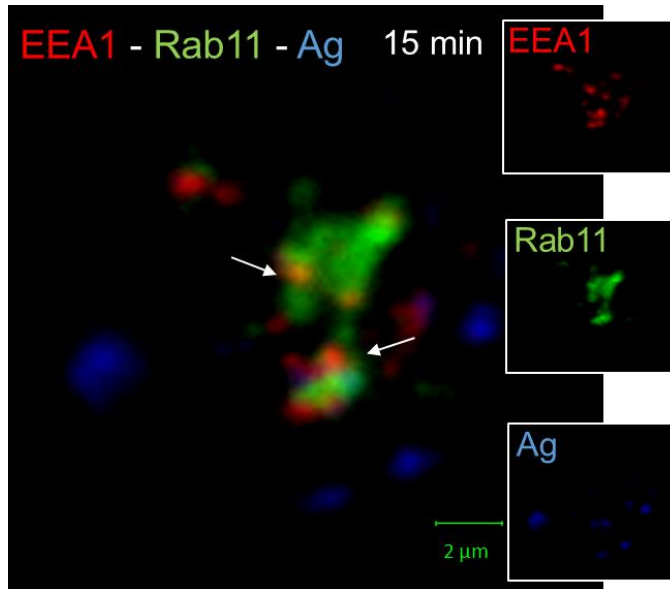
Rab9 on tunnetusti myöhäisten rakkuloiden proteiini, joten havainto 60 minuutin aikapisteessä Rab9:n ja antigeenin kolokalisaatiosta rakkulakeskitymässä, tukee aiempaa olettamusta (kuva 18).



Kuva 18. EEA1, Rab9 ja antigeenin lokalisointi ja keskinäinen vuorovaikutus 60 minuutin aikapisteessä. Tasokuva.

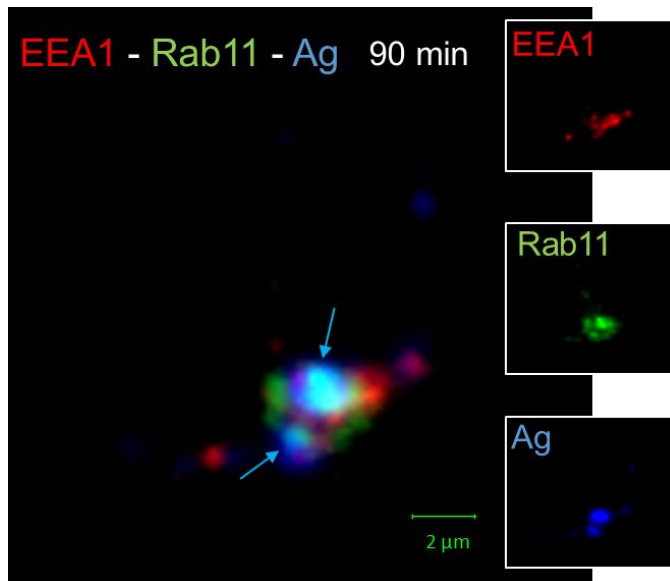
6.3.4 EEA1:n ja Rab11:n vuorovaikutus aktivoiduissa B-soluissa

Rab11:n ja EEA1:n vuorovaikutusta tutkittaessa huomattiin, että ne eivät kolokalisoi keskenään, mutta ovat toistensa läheisyydessä rakkulakeskittymässä (kuva 19).



Kuva 19. EEA1, Rab11 ja antigeenin lokalisointi ja keskinäinen vuorovaikutus 15 minuutin aikapisteessä. Tasokuva.

Rab11-proteiinin tiedetään toimivan myöhäisessä kierrätyksessä. Tutkimuksessa havaittiin Rab11:n ja antigeenin kolokalisoivan (turkoosi) 90 minuutin aikapisteessä, mikä tukee kirjallisuudessa esitettyä tietoa (kuva 20).



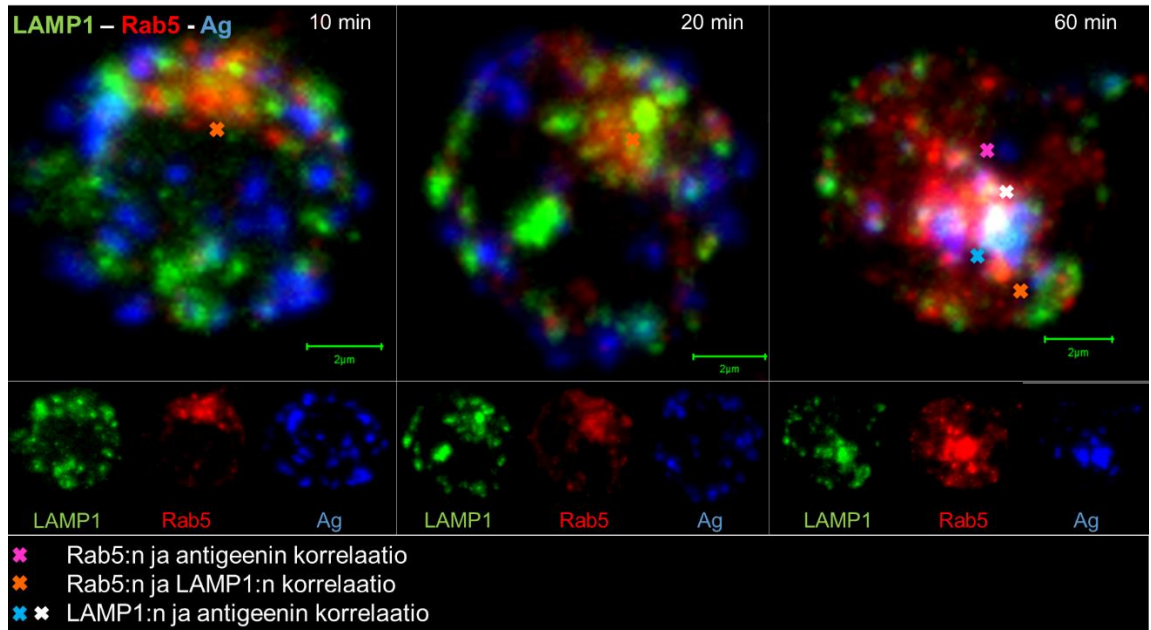
Kuva 20. EEA1, Rab11 ja antigeenin lokalisointi ja keskinäinen vuorovaikutus 90 minuutin aikapisteessä. Tasokuva.

6.4 Rab5/7/9:n ja LAMP1:n lokalisaatio ja keskinäinen vuorovaikutus aktivoituissa B-soluissa

LAMP1-proteiinien tiedetään toimivan myöhäisten endosomien ja lysosomien merkkiaineina. Tutkimuksessa haluttiin selvittää Rab-proteiinien luonne B-soluissa ja määrittää, mitkä Rab-proteiineista toimivat yhdessä LAMP1:n kanssa aktivoituissa B-soluissa. Näiden välistä vuorovaikutusta tutkittiin immunovärjäyksin ja kuvantamalla värjäytyt solut spinning disk -konfokaalimikroskoopilla. Kuvista tehtiin korrelaatioanalyysit, joissa tutkittiin kahden eri kanavan välistä korrelaatiota. Aikapisteiden 10, 20 ja 60 minuutin korrelaatiot koottiin kuvaajiin 1...9. Analysoituja soluja oli 6...8 olosuhdetta kohden. Korrelaatiotaulukot on esitelty liitteessä 1.

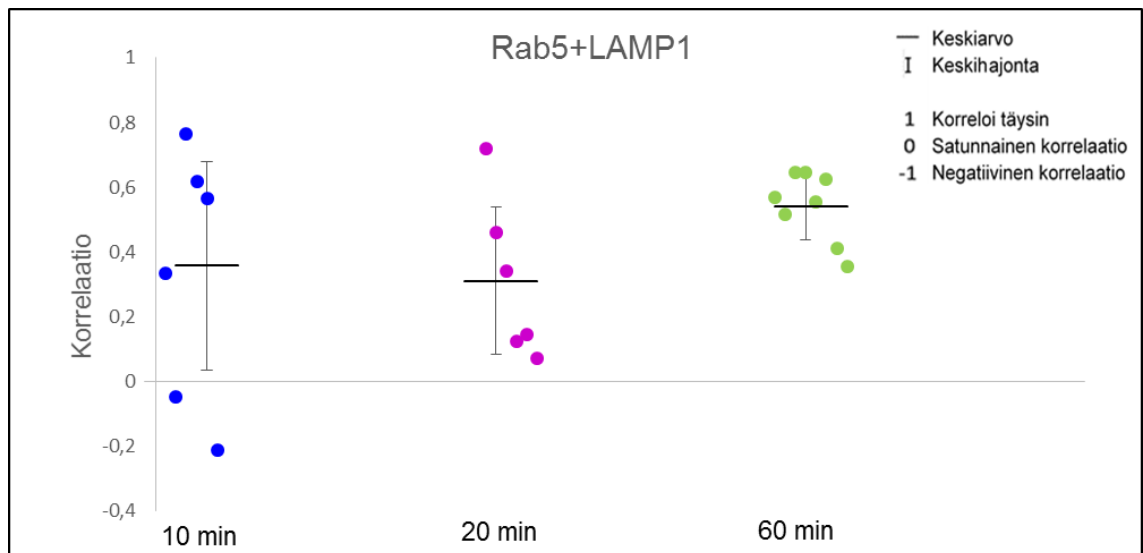
6.4.1 LAMP1:n ja Rab5:n vuorovaikutus aktivoituissa B-soluissa

Olettamuksena oli, että Rab5 ja antigeeni korreloivat kaikissa aikapisteissä. Tutkimuksessa kuitenkin havaittiin, että Rab5 ja antigeeni eivät korreloi vielä 10 ja 20 minuutin aikapisteissä (kuva 21). 60 minuutin kohdalla korrelaatio näkyy pinkkinä (kuva 21). Kuvien perusteella tehtiin korrelaatioanalyysit, jotka on esitetty kuvaajissa 1...3. Hypoteesin ja tulosten eroa on pohdittu tarkemmin luvussa 7.



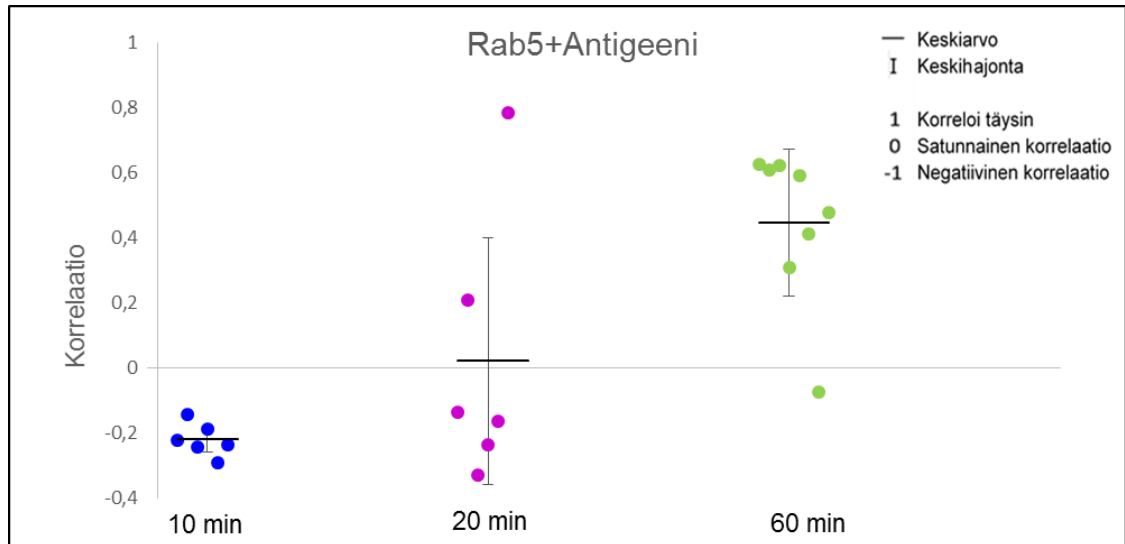
Kuva 21. LAMP1-Rab5-Antigeenin lokalisointi ja keskinäinen vuorovaikutus 10, 20 ja 60 minuutin aikapisteessä. Yhdistetyt tasokuvat.

Tutkimuksessa huomattiin, että Rab5 ja LAMP1 korreloivat kaikissa aikapisteissä (kuvaaja 1). Hajonta 10 minuutin kohdalla on iso, kuten myös 20 minuutin kohdalla (kuvaaja 1). Rab5:n ja LAMP1:n korrelaatio näkyy oranssina (kuva 21).



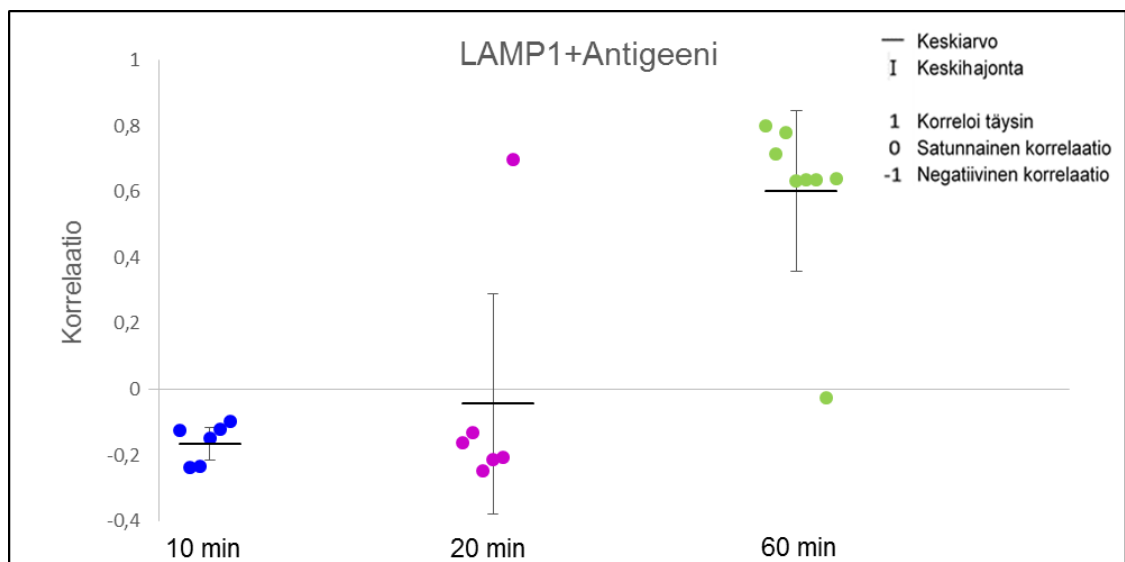
Kuvaaja 1. Rab5–LAMP1-korrelaatio.

Rab5 ja antigeeni näyttäisivät korreloivan vain 60 minuutin aikapisteessä. 20 minuutin kohdalla muutaman solun kohdalla näytti olevan korrelaatiota, mutta valtaosalla korrelaatio oli negatiivinen (kuvaaja 2). Rab5:n ja antigeenin korrelaatio näkyy pinkkinä (kuva 21).



Kuvaaja 2. Rab5–Antigeeni-korrelaatio.

LAMP1 ja antigeenin kohdalla nähdään, että ne korreloivat keskenään 60 minuutin aikapisteessä (kuvaaja 3). LAMP1:n ja antigeenin korrelaatio näkyy turkoosina (kuva 21).

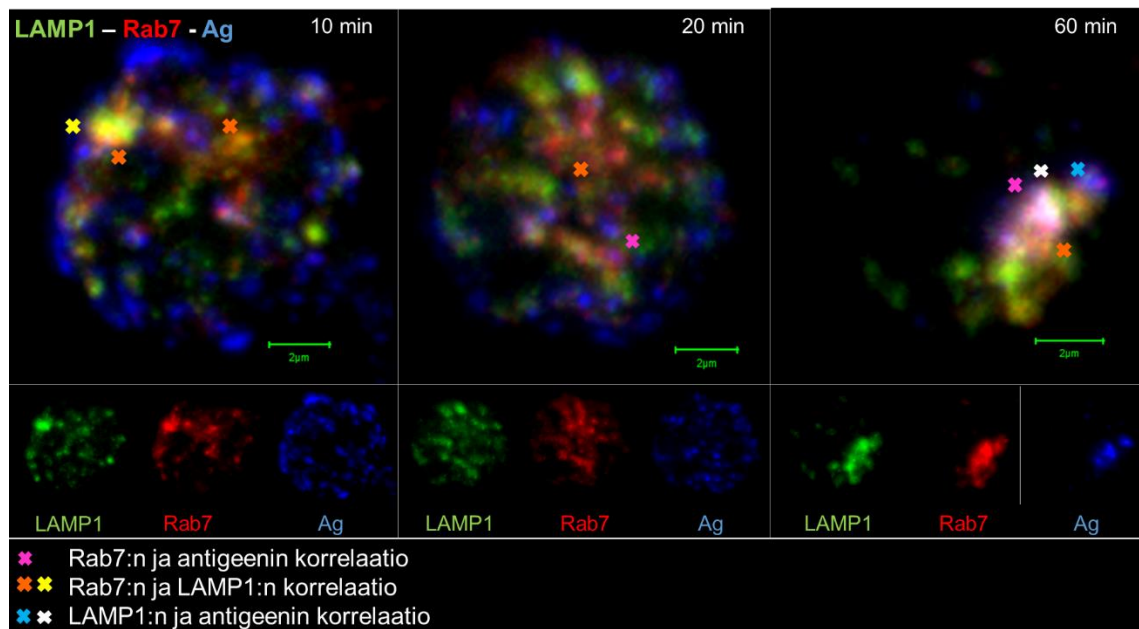


Kuvaaja 3. LAMP1–Antigeeni-korrelaatio.

6.4.2 LAMP1:n ja Rab7:n vuorovaikutus aktivoituissa B-soluissa

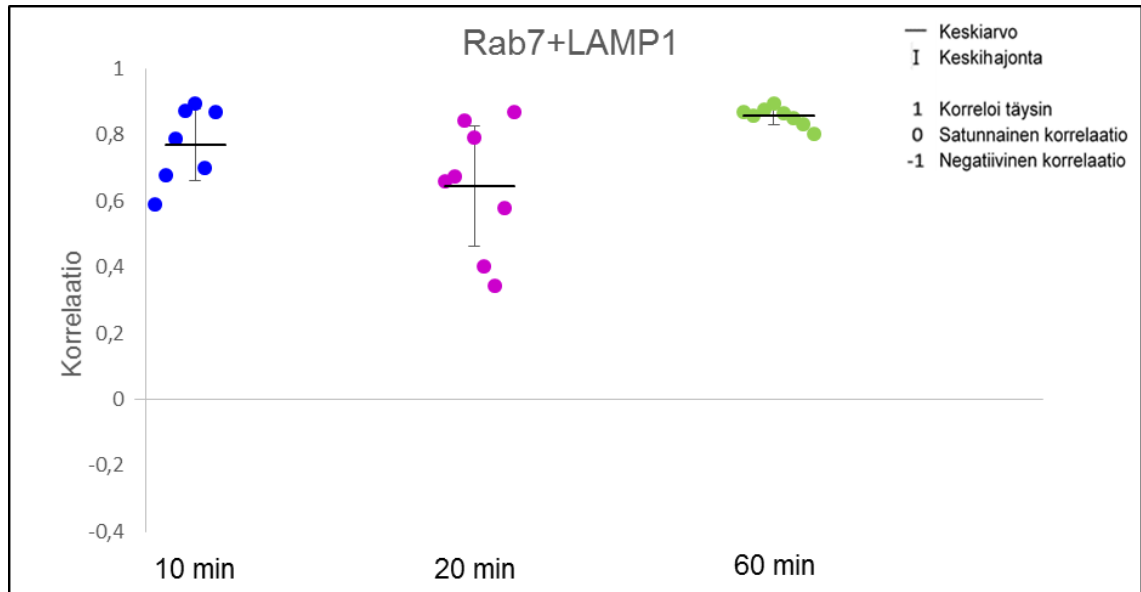
LAMP1 ja Rab7 vasta-aineilla immunovärjättyjen aktivoitujen B-solujen kuvista tehtiin korrelaatioanalyysit, jotka on esitetty kuvaajissa 4...6.

Olettamuksena oli, että LAMP1 ja Rab7 toimivat yhdessä. Tutkimuksessa havaittiin, että Rab7 ja LAMP1 korreloivat kaikissa aikapisteissä (oranssi), mikä tukee olettamusta. Rab7 ja antigeeni korreloivat vahvasti vain 60 minuutin aikapisteessä (pinkki). Tämä tukee tietoa, jonka mukaan Rab7:n tiedetään olevan hajottava myöhäisten endosomien ja lysosomien proteiini. 20 minuutin kohdalla Rab7-Ag-korrelaatio on pääosin satunnaista, mutta heikkoa korrelaatiota voi havaita. LAMP1 ja antigeeni korreloivat selvästi vain 60 minuutin aikapisteessä (turkoosi/valkoinen). (kuva 22)



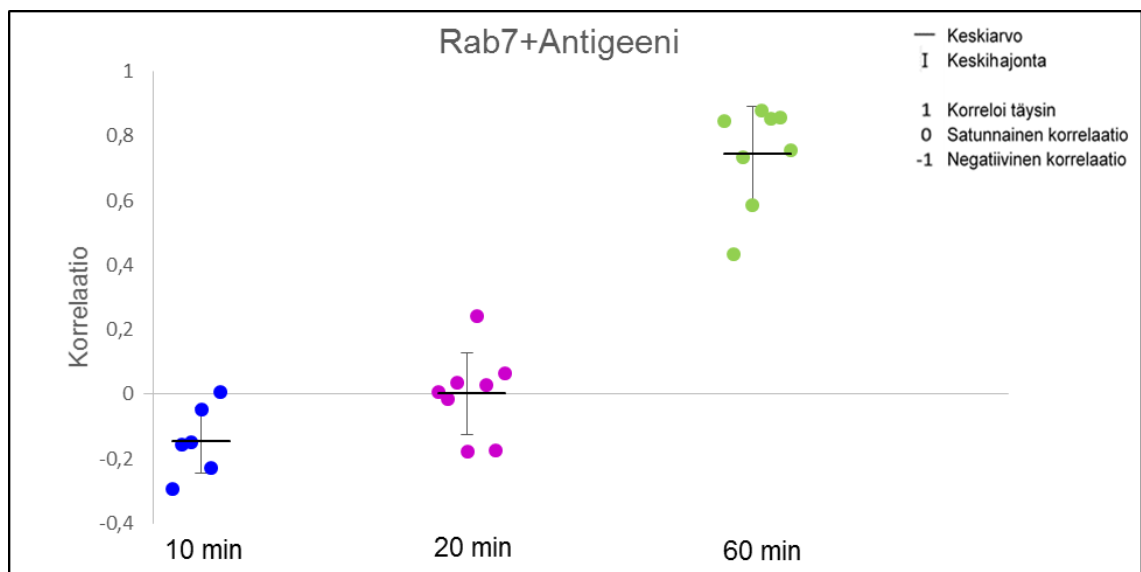
Kuva 22. LAMP1-Rab7-Antigeenin lokalisointi ja keskinäinen vuorovaikutus 10, 20 ja 60 minuutin aikapisteessä. Yhdistetyt tasokuvat.

Rab7 ja LAMP1 välinen korrelaatio aikapisteissä 10 ja 20 minuuttia on melko korkea. Näissä aikapisteissä on kuitenkin myös korkea hajonta, erityisesti 20 minuutin kohdalla. Osittain korkea hajonta selittyy analysoitujen solujen vähäisestä määrästä. 60 minuutin kohdalla Rab7 ja LAMP1 korreloivat vahvasti ja hajonta on pieni. (kuva 22 ja kuvaaja 4)



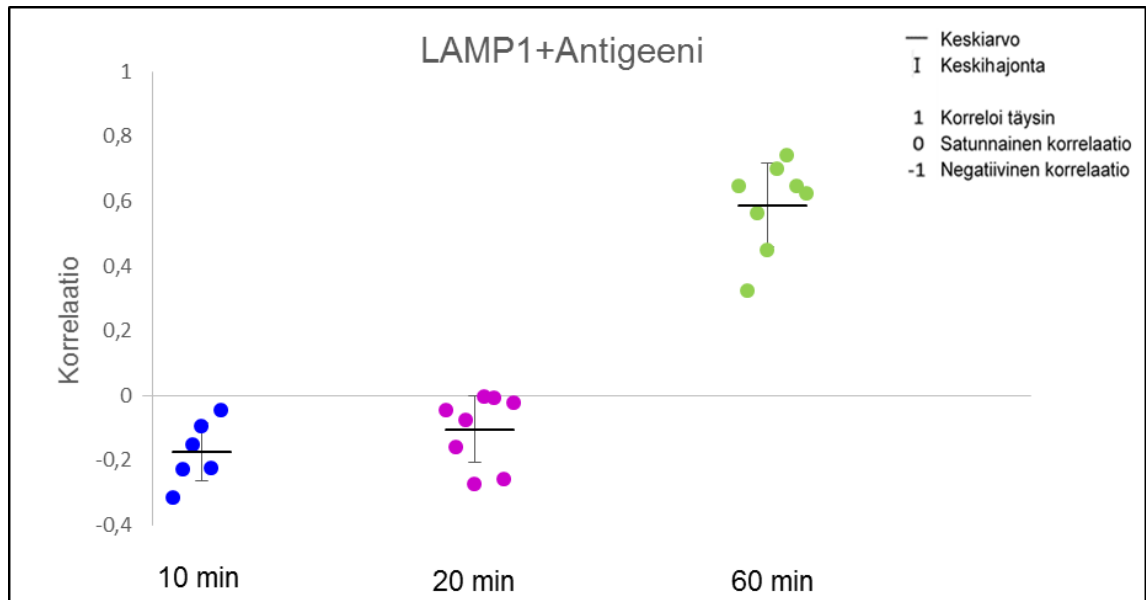
Kuvaaja 4. Rab7–LAMP1-korrelaatio.

Rab7-proteiinin ja antigeenin korrelaatio on korkea vain 60 minuutin kohdalla, mutta tässä aikapisteessä on kuitenkin myös hajontaa (kuvaaja 5). 10 minuutin kohdalla kuvaajan mukaan korrelaatiota ei ole tai se on satunnaista (kuvaaja 5). Ei kuitenkaan voida sanoa, etteikö Rab7 ja antigeeni korreloisi varhaisissa vaiheissa ollenkaan keskenään (kuva 15, kuva 22). 20 minuutin kohdalla voidaan havaita jo jonkin verran korrelaatiota (kuva 22), kun taas kuvaajan 5 mukaan korrelaatio on satunnaista, mutta korrelaation trendi on nouseva.



Kuvaaja 5. Rab7–Antigeeni-korrelaatio.

LAMP1-proteiinin ja antigeenin korrelaatiokuvaaja näyttää, että 60 minuutin kohdalla korrelaatio on korkea, mutta myös hajonta on melko suuri. Nähdään, että LAMP1 ja antigeeni eivät korreloi keskenään 10 ja 20 minuutin aikapisteissä. 10 minuutin kohdalla antigeeni on vielä solukalvolla ja 20 minuutin pisteessä antigeeni on vasta osittain internalisoitunut. (kuvaaja 6 ja kuva 22)

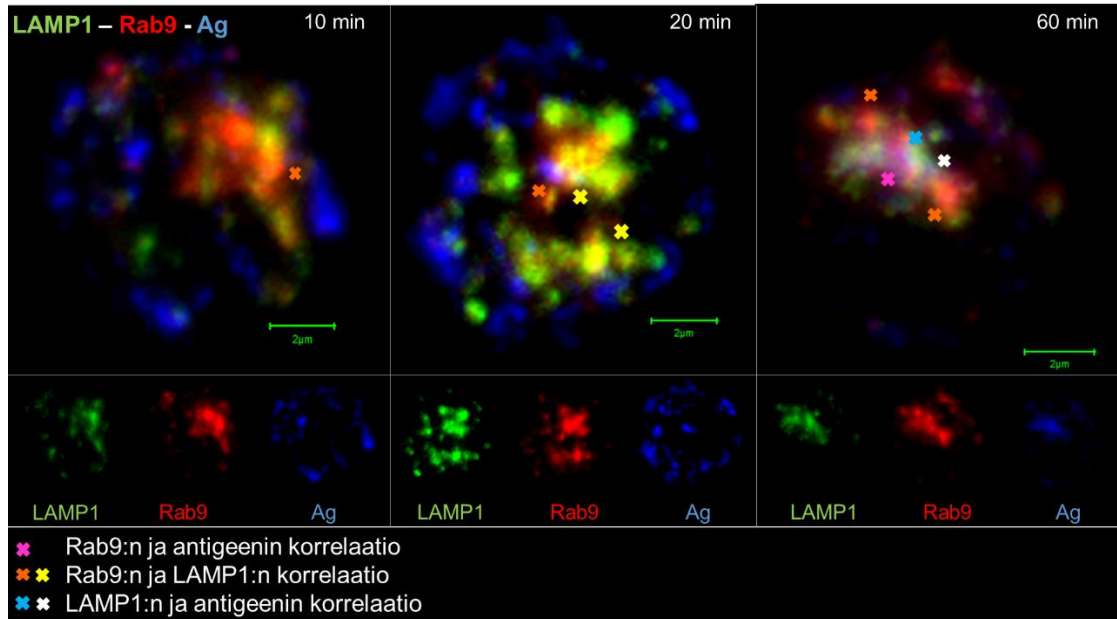


Kuvaaja 6. LAMP1–Antigeeni-korrelaatio.

6.4.3 LAMP1:n ja Rab9:n vuorovaikutus aktivoiduissa B-soluissa

LAMP1:n ja Rab9:n kanssa immunovärjättyjen aktivoitujen B-solujen kuvista tehtiin korrelaatioanalyysit, jotka on esitetty kuvaajissa 7...9.

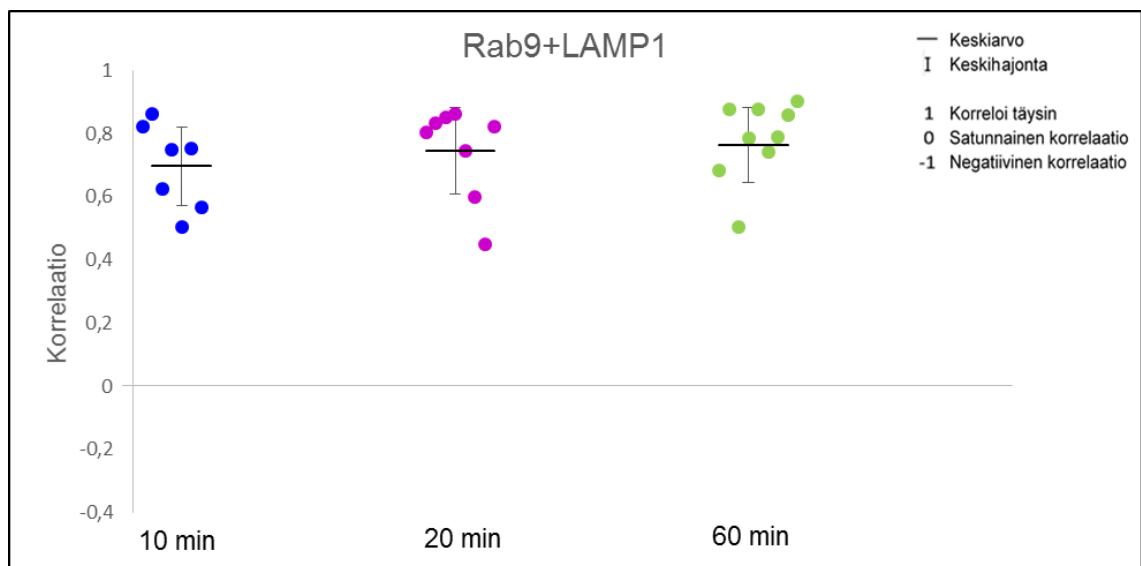
Tutkimuksessa havaittiin, että Rab9 ja LAMP1 korreloivat kaikissa aikapisteissä (oranssi). Rab9 ja antigeeni korreloivat vahvasti vain 60 minuutin kohdalla (pinkki). 20 minuutin kohdalla korrelaatio on pääosin satunnaista, mutta heikkoa korrelaatiota on havaittavissa. LAMP1 ja antigeeni korreloivat kuvaajan mukaan selvästi vain 60 minuutin aikapisteessä (keltainen/oranssi). (kuva 23)



Kuva 23. LAMP1-Rab9-Antigeenin lokalisointi ja keskinäinen vuorovaikutus 10, 20 ja 60 minuutin aikapisteissä. Yhdistetyt tasokuvat.

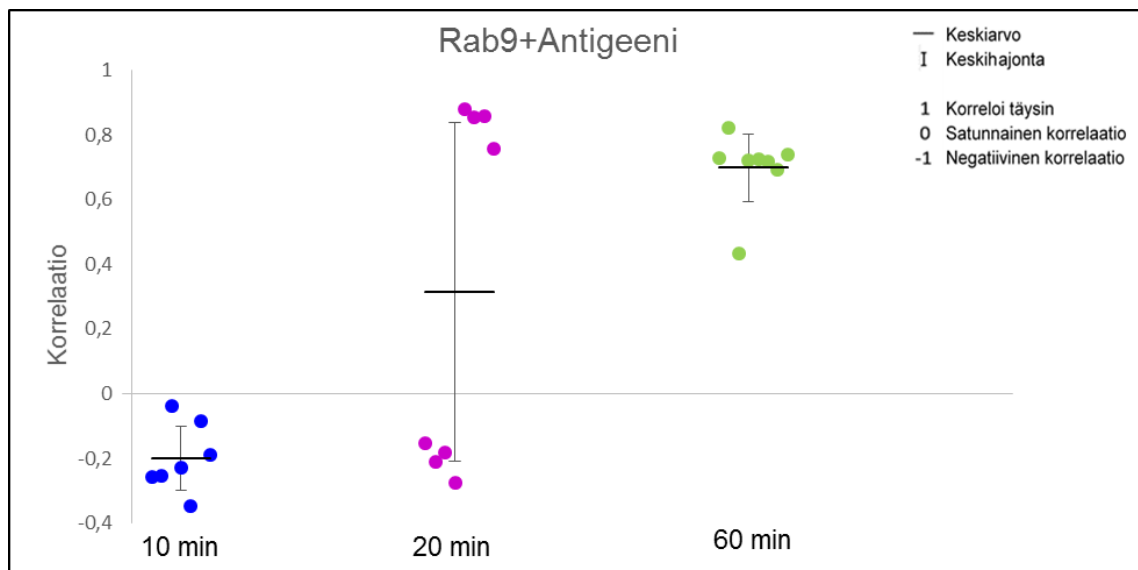
Rab9:n ja LAMP1:n välinen korrelaatio on kaikissa aikapisteissä korkea. Näissä aikapisteissä on kuitenkin myös melko suuri hajonta. (kuvaaja 7)

60 minuutin kohdalla Rab9 ja LAMP1 ovat molemmat pääosin rakkulakeskikertymässä, mutta LAMP1 on myös jonkin verran solukalvolla. 10 minuutin kohdalla nähdään, että Rab9 on melko pieninä ja ei niin selvinä rakkuloina. (kuva 23)



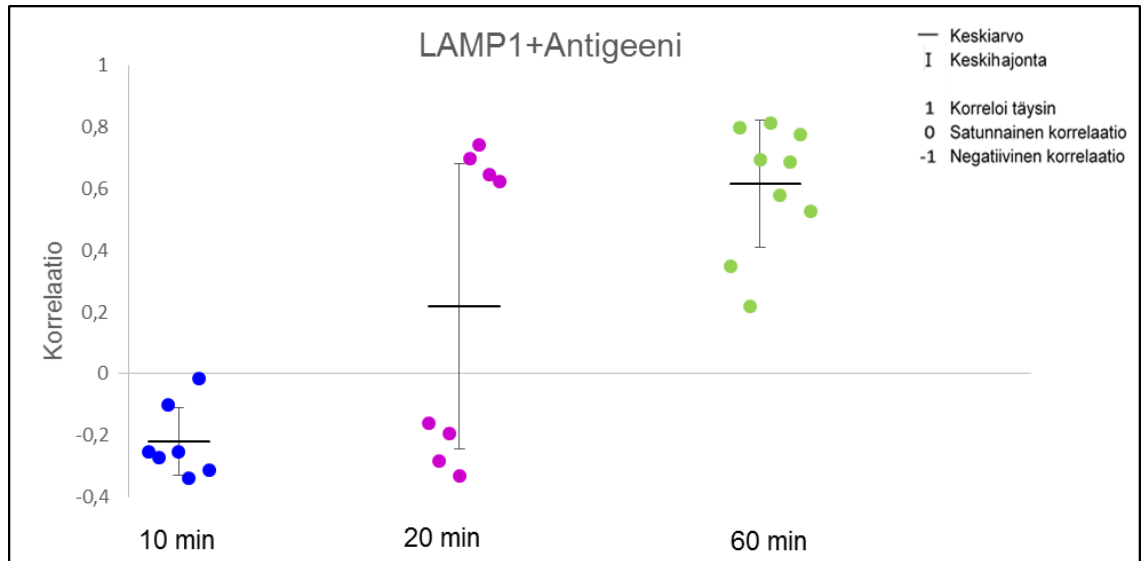
Kuvaaja 7. Rab9–LAMP1-korrelaatio.

Rab9:n ja antigeenin kohdalla nähdään, että 60 minuutin aikapisteessä on vahvaa korrelaatiota, ja 20 minuutin aikapisteessä nähdään, että noin puolet populaatiosta korreloi vahvasti ja puolessa on pieni negatiivinen korrelaatio (kuvaaja 8). 20 minuutin aikapisteessä osassa soluista Rab9 ja antigeeni saattavat kolokalisoida solukalvolla, kuten nähtiin EEA1-Rab9-Ag kohdalla 10 minuutin aikapisteessä (kuva 17). Osassa taas Rab9 ei kulkeudu solukalvolle, vaan on kerääntynyt rakkulakeskittymään (kuva 23, kuva 24).



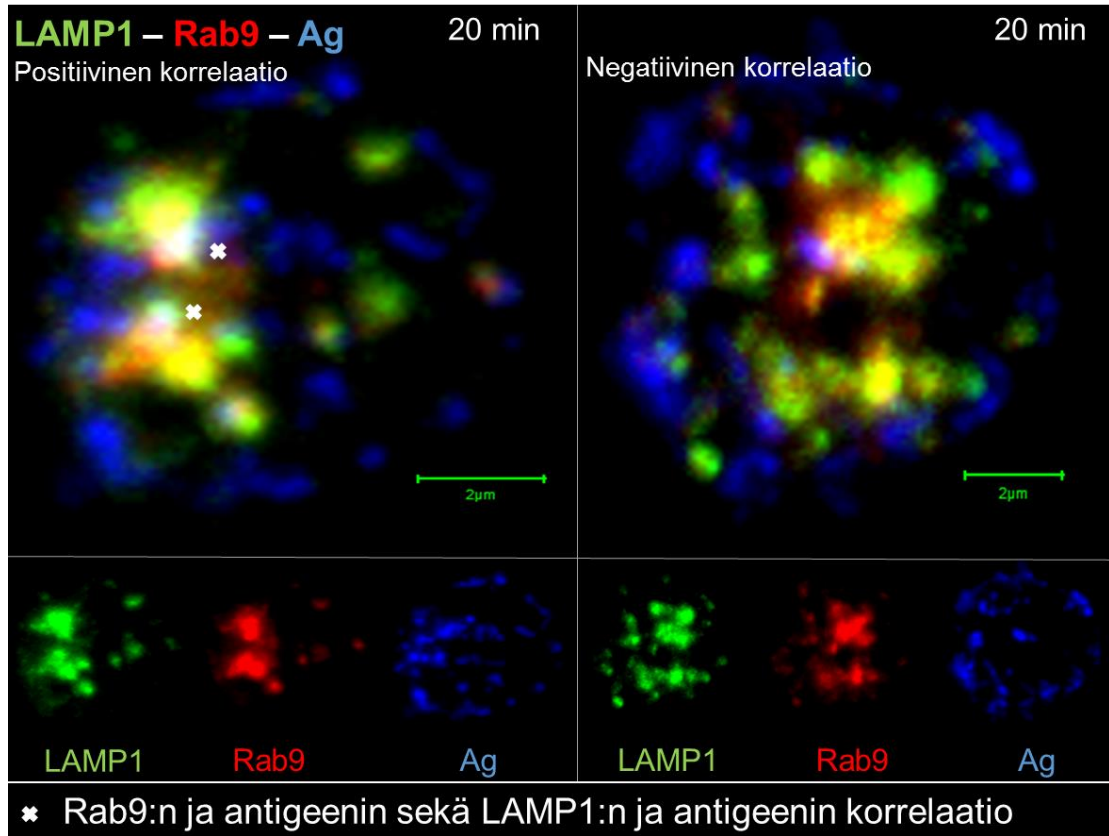
Kuvaaja 8. Rab9–Antigeeni-korrelaatio.

LAMP1:n ja antigeenin korrelaatio vastaa hyvin paljon edellä esitettyä Rab9 ja antigeenin korrelaatiota. Tässäkin tapauksessa 20 minuutin kohdalla on selvästi kaksi eri populaatiota, joista toiset korreloivat vahvasti ja toisilla korrelaatio on lievästi negatiivinen (kuvaaja 9 ja kuvat 23 ja 24).



Kuvaaja 9. LAMP1–Antigeeni-korrelaatio.

Kuten edellä jo todettiin, Rab9:n ja antigeenin sekä LAMP1:n ja antigeenin korrelaatioita tutkittaessa huomattiin, että 20 minuutin aikapisteessä muodostuu selkeästi kaksi eri populaatiota. Toisen populaation soluilla oli vahva positiivinen korrelaatio (valkoinen) ja toisessa soluilla oli lievä negatiivinen korrelaatio. (kuva 24)



Kuva 24. LAMP1-Rab9-Ag esimerkkikuvat positiivisesta ja negatiivisesta korrelaatiosta 20 minuutin aikapisteessä. Yhdistetyt tasokuvat.

7 TULOSTEN TARKASTELU JA JOHTOPÄÄTELMÄT

Opinnäytetyön tavoitteena oli tutkia antigeeniä pilkkovaa solunsisäistä reittiä EEA1-proteiinin, LAMP1-proteiinin ja Rab-proteiinien avulla. Tutkittaessa aktivoimattomia B-soluja huomattiin, että Rab5/7/9-proteiinit kerääntyvät eräänlaiseen rakkulakeskittymään. Rakkulakeskittymässä Rab5:n huomattiin olevan epäaktiivisena, Rab9:n olevan aktiivisena ja Rab7:n olleen aktiivisin. Rab7:n huomattiin olevan myös muualla solussa melko aktiivisena ja muodostavan jopa Rab7-säikeitä keskittymästä solukalvolle. EEA1 oli aktivoimattomissa soluissa hyvin epäaktiivisena eikä se kerääntynyt rakkulakeskittymään. EEA1:n todettiin muuttavan lokalisaatiotaan aktivaation myötä; aktivoituissa B-soluissa EEA1 oli hyvin aktiivisena ja kerääntyi vahvasti rakkulakeskittymään. Rakkulakeskittymästä ei ole tiettävästi raportoitu entuudestaan. Se saattaa toimia antigeenin prosessointipaikkana tai yleisenä solun "lajittelukeskuksena". EEA1:llä on mahdollisesti tärkeä rooli antigeenin kuljetuksessa rakkulakeskittymään tai antigeenikuljetuksen ohjauksessa, sillä EEA1 muuttaa vahvasti käyttäytymistään B-solujen aktivaation jälkeen.

Antigeenillä aktivoituja ja immunovärjättyjä B-soluja tutkittiin EEA1- ja Rab5/7/9/11-proteiinien kanssa. EEA1 ja Rab-proteiinit toimivat järjestelmällisesti antigeenin kuljetuksessa B-soluissa. Kirjallisuuteen perustuen oletettiin, että Rab5-proteiini ja EEA1-proteiini toimivat ja kulkevat yhdessä myös B-soluissa. Eri aktivointiaikoja tutkittaessa kuitenkin havaittiin, että EEA1-proteiini on ensimmäinen rakkulaproteiini, joka on kosketuksessa antigeenin kanssa (ilman Rab5 läsnäoloa). EEA1 saattaa toimia jopa antigeeni-BCR reseptorin internalisaatiossa. Rab5 vaikuttaa odottavan aivan solukalvon sisäpuolella EEA1-antigeeni-rakkulan irtautumista solukalvosta. B-solujen aktivointi vaikuttaisi rekrytoivan Rab5:n rakkulakeskittymästä solukalvon tuntumaan, sillä aktivoituissa B-soluissa Rab5 lokalisoiti vähemmän rakkulakeskittymässä kuin lepäävissä soluissa. Rab5-proteiini tarttuneen internalisoituu EEA1-antigeeni-rakkulaan ja kuljettaa tämän mahdollisesti rakkulakeskittymään. Rab7:n havaittiin muodostavan monirakkulaisia Rab7-komplekseja. Osa EEA1-antigeeni-rakkuloista liittyy matkalla rakkulakeskittymään Rab7-kompleksiin. Aikajanallisesti verrattuna vaikuttaa siltä, että myös Rab5 on läsnä näissä monirakkulaisissa komplekseissa, mutta tämä jää vielä selvitetäväksi. Rab11-proteiinin ei havaittu kolokalisoivan EEA1-proteiinin kanssa, mutta ne ovat toistensa läheisyydessä.

Antigeenillä aktivoituja ja immunovärjättyjä B-soluja tutkittiin myös LAMP1- ja Rab5/7/9-proteiinien kanssa. Näistä tuloksista tehtiin lisäksi korrelaatioanalyysit. Rab5:n ja antigeenin odotettiin korreloivan jo 10 ja 20 minuutin kohdalla, mutta kyseisissä tuloksissa korrelaatiota ei näissä aikapisteissä ollut. Rab5 ja antigeeni korreloivat vain 60 minuutin aikapisteessä. Tuloksista huomattiin, että LAMP1-proteiini korreloi kuitenkin kaikissa aikapisteissä (10, 20 ja 60 min) Rab7- ja Rab9-proteiinien kanssa, mikä sopii hyvin muista soluista esitettyyn kirjallisuuteen. Havaittiin myös, että Rab7- ja Rab9-proteiinit korreloivat antigeenin kanssa vahvimmin 60 minuutin aikapisteessä. Rab9-proteiinia pidetään myöhäisen vaiheen rakkulaproteiinina, mutta tutkimuksessa huomattiin, että osassa soluista Rab9 korreloi antigeenin kanssa jo 20 minuutin kohdalla. Tämä sama havainto tehtiin myös EEA1-Rab9-antigeeni-tutkimuksessa sekä Jaakkolan Pro Gradu -tutkimuksessa, jossa Rab9:n havaittiin olevan jo pian antigeenin internalisaation jälkeen läsnä ¹⁰.

Tutkimusryhmä on aiemmin nähnyt antigeenin kuljetuksen seuraavan rakkulakuljetusta, jossa Rab5 assosioi antigeenin kanssa pian (10 min) internalisaation jälkeen. Seuraavaksi Rab5 kuljettaa antigeenin Rab7 lysosomeille ja myöhäisille endosomeille (30...90 min) ja Rab11 kuljettaa antigeenin uudelleen solun pinnalle (90...240 min). On huomattava, että tässä tutkimuksessa analysoitiin ainoastaan pieni määrä soluja, mikä saattaa osaltaan selittää poikkeavan Rab5-antigeeni havainnon. B-solut ovat myös hyvin herkkiä ja jopa pienet muutokset niiden hyvinvoinnissa (esimerkiksi hieman eri mediumkonsentraatiot) saattavat vaikuttaa solujen reseptorisignalointiin ja näin ollen myös antigeenin internalisaatioon tai prosessointiin. Rab5:n ja antigeenin assosiaation varmistamiseksi tulee tehdä lisää kokeita ja soluanalyyskejä.

Rab-proteiineilla havaittiin olevan myös rooleja, jotka poikkeavat yleisestä näkemyksestä: esimerkiksi Rab5:n ja EEA1:n rinnakkainen lokalisaatio (ei päällekkäinen) sekä Rab9 ja antigeenin korrelaatio 10 minuutin kohdalla. Rab-proteiineilla on muissa soluissa raportoitu olevan soluspesifisiä rooleja. On mahdollista, että hienostunut antigeenin prosessointi poikkeaa suuresti yleisestä solujätteenkäsittelystä ja B-soluista löytyy erilaistuneita Rab-rooleja. Näitä rooleja tutkimusryhmä tulee selvittämään jatkossa tarkemmin.

Transfektio tarkoitus oli ilmentää fluoresoiva Rab5-proteiini B-soluissa. Transfektioista ei kuitenkaan saatu tuloksia toimimattomasta puskurista johtuen. 2S-puskuria valmistettiin useita kertoja, mutta sitä ei lukuisten yritystenkään jälkeen saatu toimimaan. Puskuri alkoi kiteytymään valmistuksen jälkeen, mikä saattoi olla yksi syy ongelmaan. Tässä puskurissa lähes kaikki transfektoidut solut kuolivat.

LÄHTEET

1. Hedman K, Heikkinen T, Huovinen P, Järvinen A, Meri S, Vaara M. 2011. Immunologia - mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet, kirja 2. 1st ed. Helsinki: Duodecim.
2. Kurki P, Jalanko H. 1995. Vasta-aineet lääkkeinä. Duodecim. 111(8):788 - 789.
3. Martinez O, Goud B. 1998. Rab proteins. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research. 1404(1-2):101-112.
4. Bhui T, Roy JK. 2014. Rab proteins: The key regulators of intracellular vesicle transport. Exp Cell Res. 328(1):1-19.
5. Pfeffer SR. 2005. Structural clues to rab GTPase functional diversity. The Journal of Biological Chemistry. 280(22):15485-15488.
6. Mellman I. 1996. Endocytosis and molecular sorting. Annual Review of Cell and Developmental Biology. 12:575-625.
7. Solunetti. 2006. Solubiologia, kalvokierto. Viitattu 21.3.2016. http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/varhaiset_endosomit/2/.
8. Grant BD, Donaldson JG. 2009. Pathways and mechanisms of endocytic recycling. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 10:597-608.
9. Solunetti. 2006. Lysosomi. Viitattu 20.4.2016. <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/lysosomi/>.
10. Jaakkola M. 2015. Antigen uptake and intracellular processing in B cells. Turun yliopisto.
11. Harris DC. 2013. Exploring chemical analysis. 5th ed. New York, England: W. H. Freeman and Company.
12. Jenkinson D. 2014. Host/guest complexes containing cyclodextrins and dyes. Viitattu 29.2.2016. <http://www.odinity.com/hostguest-complexes-containing-cyclodextrins-dyes/>.
13. AbD Serotec. 2016. Flow cytometry basics guide chapter 2: Principles of fluorescence fluorescence. Viitattu 13.3.2016. <https://www.abdserotec.com/flow-cytometry-fluorescence.html>.
14. Huovinen P, Meri S, Peltola H, Vaara M, Vaheri A, Valtonen V. 2003. Mikrobiologia ja infektiosairaudet, kirja 2. Helsinki: Duodecim.
15. Vancells JC. 2016. Direct vs indirect immunofluorescence. Viitattu 2.3.2016. <http://www.abcam.com/secondary-antibodies/direct-vs-indirect-immunofluorescence>.
16. Odell ID, Cook D. 2013. Immunofluorescence techniques. Journal of Investigative Dermatology. 133(1):1-4.
17. Rainey AM, Davidson MW. Yokogawa spinning disk scanning unit. Viitattu 2.3.2016. <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/tutorials/spinningdisk/yokogawa/indexflash.htm>.
18. Gräf R, Rietdorf J, Zimmermann T. 2005. Live cell spinning disk microscopy. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. 95:57-75.
19. Michigan State University. Antigen recognition. Viitattu 28.2.2016. <https://www.msu.edu/~brooks/antigenrecog.htm>

Korrelaatiotaulukot

Rab5-LAMP1-Ag; 10, 20 ja 60 min korrelaatiot, keskiarvot ja keskihajonnat.

Korrelaatio, 10 min			
Solu	Rab5-LAMP1	Rab5-Ag	LAMP1-Ag
1-1	0,33	-0,22	-0,12
1-2	-0,05	-0,14	-0,24
1-3	0,77	-0,24	-0,23
1-4	0,62	-0,19	-0,15
2-1	0,56	-0,29	-0,12
2-2	-0,21	-0,24	-0,10
2-3	0,59	-0,21	-0,13
2-4	0,25	-0,28	-0,19
Keskiarvo	0,36	-0,23	-0,16
Keskihajonta	0,32	0,04	0,05

Korrelaatio, 20 min			
Solu	Rab5-LAMP1	Rab5-Ag	LAMP1-Ag
2-3	0,07	-0,14	-0,16
1-2	0,15	0,21	-0,13
1-3	0,12	-0,33	-0,25
1-4	0,34	-0,24	-0,21
1-5	0,46	-0,16	-0,21
2-1	0,72	0,78	0,70
Keskiarvo	0,31	0,02	-0,04
Keskihajonta	0,23	0,38	0,33

Korrelaatio, 60 min			
Solu	Rab5-LAMP1	Rab5-Ag	LAMP1-Ag
1-1	0,57	0,63	0,80
1-2	0,52	0,61	0,72
1-3	0,65	0,62	0,78
1-4	0,64	0,31	0,63
1-5	0,55	0,59	0,64
1-6	0,62	0,41	0,64
2-1	0,41	-0,08	-0,02
2-2	0,35	0,48	0,64
Keskiarvo	0,54	0,45	0,60
Keskihajonta	0,10	0,22	0,25

Rab7-LAMP1-Ag; 10, 20 ja 60 min korrelaatiot, keskiarvot ja keskihajonnat.

Korrelaatio, 10 min			
Solu	Rab7-LAMP1	Rab7-Ag	LAMP1-Ag
1-1	0,59	-0,29	-0,31
1-2	0,68	-0,15	-0,23
1-3	0,79	-0,15	-0,15
1-4	0,87	-0,05	-0,09
2-1	0,89	0,69	0,50
2-2	0,70	-0,23	-0,22
2-3	0,87	0,01	-0,04
Keskiarvo	0,77	-0,02	-0,08
Keskihajonta	0,11	0,31	0,25

Korrelaatio, 20 min			
Solu	Rab7-LAMP1	Rab7-Ag	LAMP1-Ag
2-3	0,87	0,01	-0,04
1-2	0,58	-0,02	-0,16
1-3	0,34	0,03	-0,08
1-4	0,40	-0,18	-0,27
1-5	0,79	0,24	0,00
2-1	0,84	0,03	-0,01
2-2	0,67	-0,17	-0,26
2-4	0,66	0,06	-0,02
Keskiarvo	0,64	0,00	-0,11
Keskihajonta	0,18	0,12	0,10

Korrelaatio, 60 min			
Solu	Rab7-LAMP1	Rab7-Ag	LAMP1-Ag
1-1	0,87	0,85	0,65
1-2	0,86	0,44	0,33
1-3	0,88	0,74	0,56
1-4	0,90	0,58	0,45
1-5	0,86	0,88	0,70
1-6	0,85	0,85	0,74
2-1	0,83	0,86	0,65
2-2	0,80	0,76	0,63
Keskiarvo	0,86	0,75	0,59
Keskihajonta	0,03	0,15	0,13

Rab9-LAMP1-Ag; 10, 20 ja 60 min korrelaatiot, keskiarvot ja keskihajonnat.

Korrelaatio, 10 min			
Solu	Rab9-LAMP1	Rab9-Ag	LAMP1-Ag
1-1	0,82	-0,26	-0,25
2-4	0,86	-0,25	-0,27
1-3	0,62	-0,04	-0,10
1-4	0,75	-0,23	-0,26
2-1	0,50	-0,35	-0,34
2-2	0,75	-0,09	-0,01
2-3	0,57	-0,19	-0,31
Keskiarvo	0,70	-0,20	-0,22
Keskihajonta	0,12	0,10	0,11

Korrelaatio, 20 min			
Solu	Rab9-LAMP1	Rab9-Ag	LAMP1-Ag
1-1	0,82	-0,15	-0,16
1-2	0,45	-0,21	-0,28
1-3	0,60	-0,18	-0,19
1-4	0,75	-0,28	-0,33
1-5	0,86	0,88	0,70
1-6	0,85	0,85	0,74
2-1	0,83	0,86	0,65
2-2	0,80	0,76	0,63
Keskiarvo	0,75	0,32	0,22
Keskihajonta	0,14	0,53	0,47

Korrelaatio, 60 min			
Solu	Rab9-LAMP1	Rab9-Ag	LAMP1-Ag
1-1	0,68	0,73	0,35
1-2	0,88	0,82	0,80
1-3	0,50	0,43	0,22
1-4	0,79	0,72	0,70
1-5	0,88	0,73	0,81
1-6	0,74	0,72	0,58
2-1	0,79	0,69	0,69
2-2	0,86	0,74	0,78
2-3	0,90	0,52	0,53
Keskiarvo	0,78	0,68	0,61
Keskihajonta	0,12	0,11	0,21