

Opinnäytetyö (AMK)

Bioanalytiikka

NBIOAK13

2016

Frida Samuelsson

TOLLINKALTAISEN
RESEPTORI 9:N
SOLUNSIÄINEN
LOKALISAATIO
NORMOKSIASSA JA
HYPOKSIASSA

Frida Samuelsson

TOLLINKALTAISEN RESEPTORI 9:N SOLUNSIÄINEN LOKALISAATIO NORMOKSIASSA JA HYPOKSIASSA

Immuunipuolustus on kehon mekanismi puolustautua ulkoisia taudinaiheuttajia vastaan. Luonnollinen immunitaatti puolustaa kehoa osallistumalla esimerkiksi kehon tulehdusreaktion aktivointiin ja säätelyyn.

Tollinkaltaiset reseptorit ovat osa luonnollista immunitaattia. Tollinkaltainen reseptori yhdeksän (TLR9) on solunsisäinen DNA-reseptoriproteiini, jonka ilmenemisellä on todettu olevan vaikutus immunireaktioissa sekä muun muassa lisäävä vaikutus syöpäsolujen aggressiivisuuteen ja invaasioon eri syövissä.

Normoksia on kudostila, jossa hapen osapaine on normaali. Normoksiasta poiketen, hypoksia on kudostila, jossa hapen osapaine on normaalia pienempi. Hypoksiaa esiintyy usein syöpäkasvainten yhteydessä. TLR9:n on osoitettu olevan hypoksia-säädelyä esimerkiksi rintasyöpien yhteydessä, jotka eivät ilmennä estrogeeni-, progesteroni- ja HER2-reseptoria (kolmoisnegatiivinen rintasyöpä). Tästä johtuen hypoksia koetaan keskeiseksi osaksi TLR9-tutkimuksien yhteydessä. TLR9:n vaikutusmekanismeja syöpäsoluissa ei kuitenkaan ole vielä selvitetty.

Opinnäytetyön tarkoitus oli tutkia TLR9:n solunsisäistä sijaintia normoksiassa ja hypoksiassa kolmessa eri pään ja kaulan alueen syöpäsolulinjassa. Tutkimuksessa käytetyt solulinjat olivat UT-SCC-74, UT-SCC-8 ja FaDu. Tutkimuksen tulokset vahvistavat aiemmat tulokset, joiden perusteella TLR9 sijaitsee pääosin sytoplasmassa. Tutkittujen syöpäsolulinjojen välillä oli kuitenkin vaihtelua, ja tulokset osoittivat TLR9:n ilmenevän myös tumassa UT-SCC-74 ja FaDu solulinjoissa, mikä saattaa johtua hypoksian vaikutuksista.

ASIASANAT:

TLR9, Hypoksia, Pään ja kaulan alueen syöpä

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biomedical Laboratory Science | Cell- and molecularbiology

Spring 2016 | 33 (+9)

Frida Samuelsson

CELLULAR LOCALISATION OF TOLL-LIKE RECEPTOR 9 IN NORMOXIA AND HYPOXIA

The immune system is the body's mechanism to defend against external pathogens. The innate immune system defends the body by participating in the activation and regulation of the body's reaction to infection.

Toll-like receptors are part of the innate immune system. Toll-like receptor nine (TLR9) is an intracellular DNA receptor. In addition to immunoreaction, TLR9 has been shown to progressively influence aggression and invasion of cancer cells in different cancers.

In normoxia, the partial pressure of oxygen in the tissue is normal. Apart from normoxia, in hypoxia the oxygen pressure is decreased. Hypoxia is commonly detected in cancer tumors. Previous studies have proven TLR9 to be hypoxia-regulated in connection with breast cancers that lack the expression of estrogen-, progesterone- and HER2-receptors (triple negative breast cancer) and therefore hypoxia is considered an essential part of TLR9 studies. However, the mechanism of action of TLR9 in cancer cells has not yet been established.

The aim of this bachelor's thesis was to examine the intracellular location of TLR9 in three different head and neck cancer cell lines in normoxia and hypoxia. The cell lines included in the study were UT-SCC-74, UT-SCC-8 and FaDu. The results of the study confirmed earlier studies, where TLR9 was located generally in the cytoplasm of the cells. TLR9 was also found in nuclei of UT-SCC-74 and FaDu cell lines, which was hypothesized that variation in localization is induced by hypoxia and is dependent of different characteristics between cell lines.

KEYWORDS:

TLR9, Hypoxia, Head and neck cancer

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET JA SANASTO	7
1 JOHDANTO	8
2 TUTKIMUKSEN TEOREETTINEN TAUSTA	10
2.1 TLR9	10
2.2 Hypoksia	10
2.3 Pään ja kaulan alueen syövät	11
3 TUTKIMUKSEN TARKOITUS JA TAVOITE SEKÄ OPINNÄYTETYÖN KÄYTÄNNÖN TOTEUTUS	12
3.1 Tutkimuksen tarkoitus ja tavoite	12
3.2 Opinnäytetyön käytännön toteutus	12
4 TUTKIMUSMENETELMÄT JA TUTKIMUKSEN KÄYTÄNNÖN TOTEUTUS	13
4.1 Soluviljely	13
4.1.1 Käytetyt solulinjat	13
4.1.2 Soluviljelyn toteutus	14
4.2 Hypoksiakammio	15
4.2.1 Hypoksiakammion käyttö	15
4.3 Proteiinifraktiointi	16
4.3.1 Tumien erotus sytoplasmasta tuma- ja sytoplasmafraktioidilla	16
4.4 Western blot	18
4.4.1 Tuma- ja sytoplasmafraktioiden TLR9 proteiinin määrittäminen Western blot –menetelmällä	21
5 TULOKSET	24
5.1 UT-SCC-74	24
5.2 UT-SCC-8	25
5.3 FaDu	27
6 POHDINTA	29
LÄHTEET	31

LIITTEET

- Liite 1. Toimeksiantosopimus
- Liite 2. Työohje soluviljelyyn
- Liite 3. Solujen lyysaus (irrotus) trypsiini/EDTA –liuoksella ja solujen jakaminen
- Liite 4. Solulaskut hypoksiakoetta varten
- Liite 5. Solujen lyysaus hypoksiakammiossa
- Liite 6. NE-PER tuma- ja sytoplasmafraktion työohje
- Liite 7. Elektrobloittauskasetin kokoaminen

KUVAT

- Kuva 1. UT-SCC-74 (A), FaDu (B) ja UT-SCC-8 (C). Tamiko Ishizu. Solut on värjätty immunosytokemiallisesti TLR9-vasta-aineella ja vastavärjäys on tehty hematoksyliinillä. Tumat erottuvat kuvassa tummina, sytoplasma vaaleampana alueena tuman ympärillä. TLR9 värjäytyy kuvassa ruskeaksi. TLR9 on merkitty nuolilla UT-SCC-74 ja FaDu solulinjoissa. UT-SCC-74 ja FaDu solulinjat on kuvattu 20x suurennoksella, UT-SCC-8 on kuvattu 10x suurennoksella 14
- Kuva 2. Esimerkki hypoksiakammioista (Hypoxxygen 2015) 15
- Kuva 3. LI-COR Odyssey® CLx infrapunakuvantamislaitte (LI-COR 2016) 23
- Kuva 4. UT-SCC-74 solulinjan sytoplasmafraktio IMG305A vasta-aineella. Kaikissa aikapisteissä on havaittavissa selkeä TLR9 signaali noin 90 kDa:n kohdalla. Aikapisteessä 6h TLR9:n ilmeneminen on suurempi kuin muissa aikapisteissä, sillä signaali on paksumpi kuin muut. Latauskontrolli (PDI) näkyy kuvassa vihreänä, jonka mukaan fraktio on onnistunut kaikissa aikapisteissä. Tästä voidaan päätellä solulinjassa olevan TLR9 ilmenemistä sytoplasmassa. 24
- Kuva 5. UT-SCC-74 solulinjan tumafraktio IMG305A vasta-aineella. 80-90 kDa:n kohdalla ei ole havaittavissa selkeää TLR9 signaalia. Latauskontrolli (lamiini) näkyy kuvassa punaisena ja on havainnollistettu valkoisella nuolella. Latauskontrollissa on myös havaittavissa lievää PDI:n ilmenemistä, joka näkyy kuvassa vihreänä, mistä voidaan päätellä fraktioiden mahdollisesti epäonnistuneen. Solulinjassa ei ole havaittavissa selkeää TLR9 ilmenemistä tumassa, mutta tulosten varmistamiseksi koe tulisi toistaa. 25
- Kuva 6. UT-SCC-8 solulinjan sytoplasmafraktio IMG305A vasta-aineella. Fraktion kaikissa aikapisteissä on havaittavissa TLR9 signaali. Latauskontrolli (PDI) näkyy kuvassa vihreänä. Kuvassa on havaittavissa myös lamiinia, joka näkyy kuvassa punaisena. Tästä johtuen fraktioiden voidaan epäillä mahdollisesti epäonnistuneen. Solulinjassa on havaittavissa TLR9 ilmenemistä sytoplasmassa, mutta koe tulisi toistaa tulosten varmistamiseksi. 26
- Kuva 7. UT-SCC-8 solulinjan tumafraktio IMG305A vasta-aineella. 80-90 kDa:n kohdalla ei ole havaittavissa TLR9 signaalia. Latauskontrolli (lamiini) näkyy kuvassa punaisena, jonka mukaan fraktiot ovat onnistuneet. Solulinjassa ei ole havaittavissa TLR9:n ilmenemistä tumassa. 26

Kuva 8. FaDu solulinjan sytoplasmafraktio IMG305A vasta-aineella. Fraktiossa on havaittavissa selkeä TLR9 signaali toivotun kokomarkkerin kohdalla. Signaali on erityisen voimakas hypoksian 8 tunnin aikapisteessä. Latauskontrollin (PDI) mukaan fraktiot ovat onnistuneet, sillä kontrolli näkyy kuvassa vihreänä. Solulinjassa voidaan siis havaita selkeää TLR9:n ilmenemistä sytoplasmassa. 27

Kuva 9. FaDu solulinjan tumafraktio IMG305A vasta-aineella. Lievä TLR9 signaali on havaittavissa 80-90 kDa:n kohdalla. Latauskontrolli (lamiini) näkyy kuvassa punaisena (havainnollistettu nuolella), PDI ilmeneminen näkyy vihreänä. Fraktiot ovat mahdollisesti kontaminoituneet, joten koe tulisi toistaa tulosten varmistamiseksi. 28

KUVIOT

- Kuvio 1. Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter Devices –konsentraatioputki (Mukaillen Merck Millipore Corporation 2016) 17
- Kuvio 2. Vasta-ainesitoutuminen (Mukaillen Thermo Fisher Scientific 2015) 19
- Kuvio 3. Western blot menetelmä (Mukaillen LI-COR 2016) 20
- Kuvio 4. Elektroblottauskasetti. Kasetti (1) pitää geelin (2) ja membraanin (3) yhdessä kahden filtterin ja sienen (4) välissä. Sienet ja filtterit antavat geelille ja membraanille parhaan mahdollisen kontaktin toisiinsa. Kasetti upotetaan kokonaisuudessaan siirtopuskurilla täytettyyn siirtokammioon (5). (Mukaillen AES Electrophoresis Society 2016) 22

KÄYTETYT LYHENTEET JA SANASTO

FaDu	Ihmisen syöpäsolulinja
Hypoksia	Tila, jossa kudoksen hapen osapaine on normaalia pienempi
Denaturaatio	Proteiinin tertiäärirakenteen hajottaminen
Detektio	Proteiinin määrittäminen membraanilta
Invaasio	Syöpäsolun tunkeutuminen kudokseen
kDa	Kilodalton (kDa), yleisesti molekyyllipainolle käytetty yksikkö
Normoksia	Normaali kudostila, jossa hapen osapaine on normaali
Polypeptidiketju	Proteiineja pienempiä aminohappoketjuja (engl. <i>polypeptide</i>)
PPR	Patogeenin tunnistajareseptori (engl. <i>pattern recognition receptor</i>)
Tertiäärirakenne	Proteiinimolekyylien kolmiulotteinen rakenne (engl. <i>protein tertiary structure</i>)
TLR9	Tollinkaltainen reseptori 9 (engl. <i>Toll-like receptor 9</i>), solunsisäinen DNA-reseptori
UT-SCC-74	Ihmisen syöpäsolulinja
UT-SCC-8	Ihmisen syöpäsolulinja

1 JOHDANTO

Keho puolustautuu ulkoisia patogeeneja vastaan immuunipuolustuksen avulla. Immuni-
nipuolustus koostuu kahdesta osasta; luonnollisesta immuniteetista ja hankitusta immu-
niteetista. Hankittu immuniteetti on elämän aikana hankittu, vieraiden mikrobien ja pato-
geenien muokkaama immuniteetti. Hankitusta immuniteetista poiketen, luonnollinen im-
muniteetti on perinnöllisesti säädelty ja se on synnynnäinen. Luonnollinen immuniteetti
kehittyy jo sikiöaikana ja puolustaa kehoa vieraita patogeeneja vastaan heti syntymän
jälkeen. (Terveyskirjasto 2014.) Luonnollisen immuniteetin patogeenien tunnistusmeka-
nismeihin kuuluu erilaiset patogeenien tunnistajareseptorit (PPR, engl. *pattern recogni-
tion receptor*) (Akira ym. 2006). Tällaiset reseptorit, kuten tollinkaltaiset reseptorit, tun-
nistavat kehoon joutuneen vieraan patogeenin, ja aktivoivat elimistön puolustusjärjestel-
män patogeeneja vastaan (Watters ym. 2007). Tollinkaltainen reseptori 9 (TLR9, engl.
Toll-like receptor 9) on tollin reseptoriperheeseen kuuluva solunsisäinen DNA-reseptori
(Takida & Akira 2005, Tuomela ym. 2012). TLR9 sijaitsee normaalisti muun muassa T-
ja B-lymfosyyttisolussa sekä dendriittisolussa. Toisin kuin muita tollinkaltaisia resepto-
reja, TLR9:ä ei ole havaittu solujen pinnalla. (Leifer ym. 2004.)

B-solujen ja dendriittisolujen lisäksi TLR9:ä on havaittu myös syöpäsoluissa. TLR9:llä on
osoitettu olevan vaikutus invaasion säätelyyn esimerkiksi rintasyövissä, jotka eivät il-
mennä estrogeeni-, progesteroni- ja HER2-reseptoria (kolmoisnegatiivinen rintasyöpä,
engl. *triple-negative breast cancer*). (Tuomela ym. 2012.) Tutkimustulokset ovat osoitta-
neet myös muiden syöpäsolujen, kuten aivo-, keuhko- ja eturauhassyöpäsolujen ilmen-
tävän TLR9:ä (Ilvesaro ym. 2008), ja TLR9:n ilmenemisen on todistettu olevan hypoksia-
säädeltyä esimerkiksi kolmoisnegatiivisen rintasyövän yhteydessä (Tuomela ym. 2012).
Hypoksialla on vahva yhteys syöpäkasvainten aggressiivisuuteen ja leviämiseen ja sen
on todistettu myös tehostavan kasvainten vastustuskykyä syöpähoitoja vastaan. (Tuo-
mela ym. 2010.) Tästä syystä hypoksia on keskeinen syöpähoidon ja syöpäkasvainten
fysiologian tutkimusaihe.

Aiempien tutkimusten perusteella TLR9:n on paikallistettu sijaitsevan normaaliin solujen
sytoplasmassa, mutta tarkkaa sijaintia ja vaikutusta syöpäsoluissa ei ole vielä selvitetty.
Turun yliopiston solubiologian tutkija dosentti Johanna Tuomela tutkimusryhmineen on
pyrkinyt selvittämään, onko TLR9:n sijainti syöpäsoluissa normaalista poikkeavaa ja
onko hypoksialla merkitys TLR9:n solunsisäiseen sijaintiin.

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli tutkia TLR9:n sijaintia kolmessa eri pään ja kaulan alueen syöpäsolulinjassa, hypoksia- ja normoksia-olosuhteissa ja saada mahdollisesti lisätietoa TLR9:n toiminnasta erilaisissa happiolosuhteissa.

2 TUTKIMUKSEN TEOREETTINEN TAUSTA

2.1 TLR9

Tollinkaltaiset reseptorit toimivat osana elimistön luonnollista immuniteettia. Luonnollisen immuniteetin tehtävä on itsenäisesti tunnistaa ja aktivoida elimistön puolustusjärjestelmä vieraita patogeeneja vastaan. Tollinkaltaiset reseptorit toimivat osana tätä tunnistus- ja aktivointijärjestelmää. (Takida & Akira 2005.) Reseptorit tunnistavat elimistölle vieraita patogeeneja ja pahanlaatuisia soluja, auttaen siten elimistöä toimimaan infektiosairauksia ja syöpää vastaan (Wang ym. 2008). Ihmiseltä on löydetty jo 10 tollinkaltaista reseptoria (Takida & Akira 2005).

TLR9 on solunsisäinen reseptoriproteiini, joka toimii patogeenin tunnistajareseptorina (Alberts ym. 2015). TLR9 on erikoistunut tunnistamaan viruksien, bakteerien ja alkueläimien DNA:n molekyyliarakenteita (Barton ym. 2006). TLR9 on suuri proteiini, noin 150 kilodaltonin (kDa) kokoinen, (Ewald ym. 2008) joka sijaitsee normaalisti solun informaation kulusta vastaavassa endolysosomaalisessa järjestelmässä (Repnik ym. 2013, Alberts ym. 2015). Aktivoiduttuaan TLR9 pilkkoutuu pienempiin osiin, mikä aktivoi reseptorin signaalin etenemisen solussa (Ewald ym. 2008.) Solunsisäisen sijainnin tarkoitus on vielä epäselvä (Barton ym. 2006), kuten myös TLR9:n siirtyminen solun sisällä (Ewald ym. 2008). Syöpien yhteydessä reseptoriproteiinien sijainti solussa saattaa olla normaalia poikkeava (Jiao ym. 2007) ja myös muiden proteiinien solunsisäinen sijainti saattaa vaihdella eri syövissä (Rodriguez ym. 2003).

2.2 Hypoksia

Hypoksialla tarkoitetaan tilaa, jossa kudoksen tai solun hapenpuute vaikuttaa solun normaaleihin biologisiin toimintoihin (Alberts ym. 2015). Elimistössä vähähappisuutta voivat aiheuttaa esim. verisuonisairaudet, anemia, hiilidioksidimyrkytys tai muun myrkytyksen aiheuttama solujen hapenkäyttökyvyn aleneminen (Höckel&Vaupel 2001).

Aiemmin uskottiin, että hypoksialla on negatiivinen vaikutus syövän kasvuun, koska sen ajateltiin estävän syöpäsolujen jakautumisen. Uudet tutkimukset ovat kuitenkin osoittaneet, että hypoksia lisää kasvainsolujen jakautumista ja invaasiota (Moen&Stuhr 2012), ja useissa tutkimuksissa on raportoitu kudoksen alentuneen hapen osapaineen lisäävän

malignien, eli pahanlaatuisten solujen määrää. Hapen osapaineen aleneminen aiheuttaa myös useita solutason muutoksia, edistäen syöpäkasvaimen etenemistä ja edesauttaen syöpäkasvaimen kasvua. Hypoksian on myös todettu lisäävän syöpäkasvainten kemoterapia- ja sädehoitoresistenssissä. (Tuomela ym. 2010, Moen&Stuhr 2012.)

Hypoksia on yleinen piirre esimerkiksi eturauhassyövissä (Tuomela ym. 2010) ja sillä on osoitettu olevan kytkös TLR9:n ilmenemiseen esimerkiksi kolmoisnegatiivisen rintasyövän yhteydessä (Tuomela ym. 2012). Hypoksian on myös todettu vaikuttavan TLR9:n välityksellä negatiivisesti kasvaimen ennusteeseen esimerkiksi aivokasvaimissa (Sandholm ym. 2014). Vaikka TLR9:n rooli syöpien ja syöpäsolujen fysiologiassa ei ole täysin selvä, on aikaisempien tutkimustulosten perusteella mahdollista, että TLR9:n ilmeneminen olisi hypoksia-säädelyä myös muissa syöpäkasvaimissa ja syöpäsolulinjoissa.

2.3 Pään ja kaulan alueen syövät

Pään ja kaulan alueen syöpien määrä maailmanlaajuisesti on mittava. Tämän alueen syövät ovat kuudenneksi yleisin syöpätyyppi maailmassa, ja ne ovat yleisiä myös Suomessa. Vuosittain Suomessa todetaan 600-700 uutta pään ja kaulan alueen syöpätaapausta. Näitä syöpiä, kuten kurkunpään, nielun, suuontelon ja huulien syöpää tavataan useammin miehillä ja esiintyvyys lisääntyy merkittävästi 50 ikävuoden ylittäneillä henkilöillä. Tunnettuja riskitekijöitä ovat muun muassa runsas alkoholin käyttö ja tupakointi. Myös ihmisen papilloomavirus on todettu riskitekijäksi etenkin suuontelon ja nielun syövässä. (Grénman&Joensuu 2011.) Aikainen diagnosointi ja hoidon aloittaminen ovat oleellisia potilaan toipumisen kannalta. Peräti 75% länsimaissa diagnosoiduista suusyöpätapauksista olisi ennaltaehkäistävässä elintapa- ja ruokavaliomuutoksilla. (Käypähoito 2012.)

TLR9 ilmenemistä on havaittu muun muassa eturauhas-, rinta-, keuhko- ja aivosyöpien solulinjoissa (Ilvesaro ym. 2008), ja korkean TLR9:n ilmenemisen on todettu esimerkiksi lyhentävän elinajanodotetta glioblastooma aivokasvaimissa (Sandholm ym. 2014). Kun taas kolmoisnegatiivisen rintasyövän yhteydessä, kasvaimen alhaisella TLR9 ilmenemisellä on negatiivinen vaikutus elinajan ennusteeseen (Tuomela ym. 2012). TLR9:n vaikutusta on tutkittu laajemmin vasta rintasyövässä (Tuomela ym. 2012), joten on epäselvää, onko TLR9:n ilmenemisellä vaikutus myös pään ja kaulan alueen syövässä.

3 TUTKIMUKSEN TARKOITUS JA TAVOITE SEKÄ OPINNÄYTETYÖN KÄYTÄNNÖN TOTEUTUS

3.1 Tutkimuksen tarkoitus ja tavoite

Tämän opinnäytetyön tarkoitus oli tutkia TLR9 reseptoriproteiinin solunsisäinen sijainti pään ja kaulan alueen syöpäsoluissa sekä määrittää hypoksian ja normoksian vaikutus TLR9:n sijaintiin. Tutkimus perustui Turun yliopiston dosentti Johanna Tuomelan ryhmän aiempiin tutkimuksiin.

3.2 Opinnäytetyön käytännön toteutus

Opinnäytetyön toimeksiantajina toimivat Turun yliopiston solubiologian dosentti Johanna Tuomela, solubiologian ja anatomian oppiaineen professori Juha Peltonen sekä biolääketieteen laitosjohtaja professori Pirkko Härkönen. Opinnäytetyön ohjaavana opettajana toimi lehtori Sanna Virtanen. Tutkimuksen käytännön osuus toteutettiin Turun Yliopiston solubiologian ja anatomian oppiaineen tiloissa dosentti Johanna Tuomelan laboratoriossa ja käytännön toteutuksen ohjaajana toimi tohtorikoulutettava Tamiko Ishizu. Tutkimuksen käytännön osuus toteutettiin keväällä 2016 ja opinnäytetyö valmistui keväällä 2016.

4 TUTKIMUSMENETELMÄT JA TUTKIMUKSEN KÄYTÄNNÖN TOTEUTUS

4.1 Soluviljely

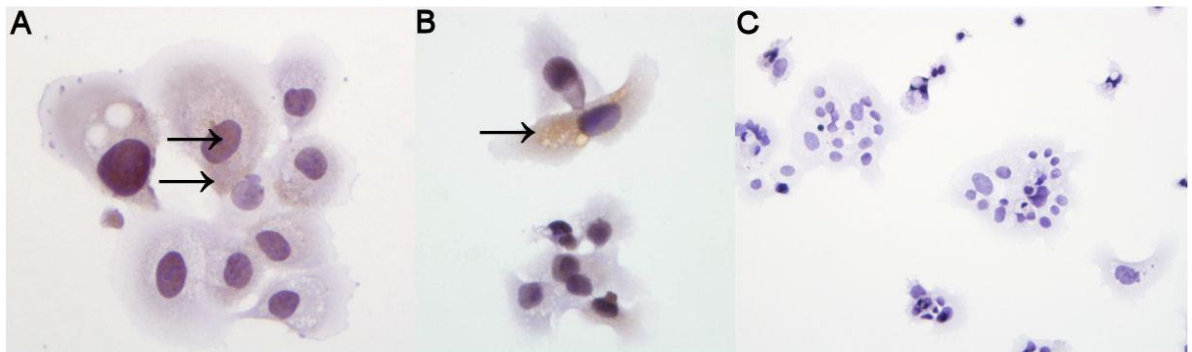
Soluviljely tarkoittaa primaariviljelmästä, eli alkuperäisestä kudoksesta, mekaanisesti, entsyymaattisesti tai kemiallisesti erotettujen solujen viljelmää. Viljelyyn voi käyttää myös tietyistä solukannoista tai solulinjoista olevia soluja, jotka ovat yleensä yhden solun kloonveja. (Freshney, 2006.)

Soluviljelyn tarkoitus on viljellä soluja tarkasti kontrolloiduissa elinolosuhteissa, mahdollistaen siten solujen ja solujen toimintojen tutkimisen. Erilaisia soluja, kuten eläin- ja kasvisoluja voidaan viljellä laboratorio-olosuhteissa. Tätä kutsutaan nimityksellä *in vitro*. *In vitro* tutkimuksissa soluja viljellään ja tutkitaan elävän organismin ulkopuolella. Elävän organismin sisäpuolella tehtyä tutkimusta kutsutaan nimityksellä *in vivo*; nämä tutkimukset ovat yleensä koe-eläintutkimuksia (Alberts ym. 2015.)

In vitro tutkimukset ovat yleensä helpompia ja halvempia toteuttaa kuin *in vivo* tutkimukset. *In vivo* tutkimuksissa on myös eettisiä näkökulmia, jotka tulee ottaa huomioon eläinkokeita suorittaessa. *In vitro* tutkimuksissa eettisiä kysymyksiä ei yleensä ole, ellei kyse ole primaariviljelmällä tehty tutkimus. Koeputkiolosuhteet eivät kuitenkaan koskaan vastaa elävässä organismissa vallitsevia olosuhteita. Tästä johtuen, *in vivo* ja *in vitro* tutkimuksien tutkimustuloksia ei voi verrata tai soveltaa suoraan keskenään, sillä koeolosuhteet poikkeavat toisistaan liikaa. (Alberts ym. 2015.)

4.1.1 Käytetyt solulinjat

Opinnäytetyön tutkimukseen käytetyt solulinjat olivat ihmisen pään ja kaulanalueen syöpäsoluja. Käytettyjä solulinjoja oli kolme: UT-SCC-74, UT-SCC-8 ja FaDu. UT-SCC-74 solulinja on suun karsinoomasyövän soluja (Ruutu ym. 2005). UT-SCC-8 ja FaDu ovat okasolusyövän soluja; UT-SCC-8 pään ja kaulan alueen (Jääskelä-Saari ym. 1996) ja FaDu nielun alueen (Ma ym. 2011). Solulinjat on esitetty kuvassa 2.



Kuva 1. UT-SCC-74 (A), FaDu (B) ja UT-SCC-8 (C). © Tamiko Ishizu. Solut on värjätty immunosytokemiallisesti TLR9-vasta-aineella ja vastavärjäys on tehty hematoksyliinillä. Tummat erottuvat kuvassa tummina, sytoplasma vaaleampana alueena tumman ympärillä. TLR9 värjäytyy kuvassa ruskeaksi. TLR9 on merkitty nuolilla UT-SCC-74 ja FaDu solulinjoissa. UT-SCC-74 ja FaDu solulinjat on kuvattu 20x suurennoksella, UT-SCC-8 on kuvattu 10x suurennoksella

4.1.2 Soluviljelyn toteutus

Soluviljelytyöskentely suoritettiin laminaarikaapissa aseptisia työtapoja noudattaen (Liite 2, työohje).

Soluviljelyä varten sulatettiin kustakin solulinjasta -150°C :ssa säilytetty ampulli. Ensin solujen DMSO:ta (dimetyylisulfoksidi, engl. *dimethylsulfoxide*) sisältävä pakastusliuos pestiin pois PBS-puskuriliuoksella (fosfaattipuskuroitu suolaliuos, engl. *phosphate-buffered saline*). Soluja inkuboitiin viljelymediumissa CO_2 -inkubaattorissa ($+37^{\circ}\text{C}$, 21% O_2 ja 5% CO_2). Solujen peittäessä noin 70% viljelypullon pohjasta, solut irrotettiin trypsiini/EDTA-liuoksella ja siirrettiin falconputkiin (Liite 3, työohje). Soluja sentrifugoitiin 5 min x 1000rpm 20°C , jonka jälkeen trypsiini/EDTA-liuos poistettiin putkista ja solut jaettiin viljelymediumissa 10cm^2 soluviljelymaljoille. Kustakin solulinjasta jaettiin kuusi maljaa vastaamaan hypoksiakokeen aikapisteitä; kolme tuntia, kuusi tuntia, kahdeksan tuntia, 24 tuntia, 48 tuntia ja normoksiamalja ($1,5 \times 10^6$ solua/malja). Solujen kokonaismäärä laskettiin Bürkerin kammiolla ja solut jaettiin maljoille liitteen 4 laskujen mukaan.

4.2 Hypoksiakammio

Eri tutkimukset ovat osoittaneet kudoksen hapen osapaineella olevan suuri vaikutus solujen toimintaan ja kasvuun. Jotta soluja ympäröivän ravintoliuoksen, eli mediumin, hapen konsentraatiota voidaan säädellä kontrolloidusti, on solujen viljelyyn kehitetty hypoksiakammio. (Smith 2011.)

Hypoksiakammio on inkubaatiokammio, jonka happipitoisuutta ja lämpötilaa voidaan säädellä (Smith 2011). Hypoksiakammion tarkoitus on luoda hapeton työskentelytila esimerkiksi soluviljelyä varten. Kammion toiminta perustuu ilmatiiviin inkubaatiokammion käyttöön ilmatiiviiden hanskojen ja kaasumanipulaation avulla (Kuva 1). Kammioon liitetyt operointihanskat ja kaasutankki mahdollistavat hypoksisen tilan säilyttämisen aina kammiossa operoidessa. (Wu&Yotnda 2011.)



Kuva 2. Esimerkki hypoksiakammioista (Hypoxygen 2015)

4.2.1 Hypoksiakammion käyttö

Soluja inkuboitii hypoksiakammiossa (37°C, 1% O₂, 5% CO₂, 94% typi) kunkin aikapisteen mukaisen ajan. Aikapistettä asetettiin aiempien kokeiden perusteella kolmesta tunnista 48:an tuntiin. Normoksiassa viljellyt solut toimivat kontrollina. Jokaisen aikapisteen täytyttyä, maljoista irrotettiin solut trypsiini/EDTA -liuoksella hypoksiakammiossa

(Liite 5, työohje). Solut kerättiin putkiin ja asetettiin jäähauteeseen proteiinifraktiointia varten. Normoksiamaljan solut irrotettiin laminaarikaapissa soluviljelytilassa.

4.3 Proteiinifraktiointi

Proteiinifraktiointi tarkoittaa proteiinien erottamista solusta omiin fraktioihinsa. Proteiinit voidaan erottaa solusta eri menetelmin, kuten osmoottisten- tai ultraäänivärähtelyjen avulla. (Alberts ym. 2015.) Edellä mainitut menetelmät rikkovat useat solun membraaneista kappaleiksi, jotka membraanin hajoamisen jälkeen sulkeutuvat erillisiksi rakkuloiksi. Fraktioinnin onnistuessa jäävät solun eri organellit, eli soluelimet, kuten mitokondriot, tuma, Golgin laite, peroksisomit ja lysosomit suurelta osin ehjäksi, ja soluelinten biokemialliset ominaisuudet säilyvät ennallaan fraktioinnin jälkeen. (Alberts ym. 2015.)

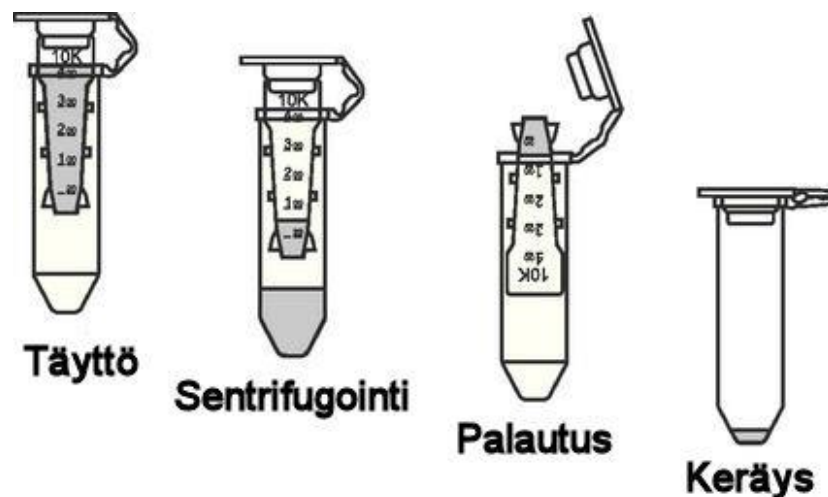
Tutkimuksessa tehtiin proteiinifraktiointi, jotta Western blot-menetelmällä voitiin erikseen tarkastella solun tuman ja sytoplasman, eli soluliman, proteiineja. Jotta tumaa ja sytoplasmaa voitiin tarkastella erikseen, piti solujen tumat erottaa sytoplasmaasta; tätä kutsutaan tuma- ja sytoplasmafraktioinniksi.

4.3.1 Tumien erotus sytoplasmaasta tuma- ja sytoplasmafraktioinnilla

Tuma- ja sytoplasmafraktioinnissa käytettiin kaupallista Thermo Scientificin NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Reagents –kittiä. Fraktiointi toteutettiin mukautetusti kitin ohjeiden mukaan (Liite 6, työohje). Ensin näyteputkista poistettiin solujen irrotukseen käytetty trypsiini/EDTA -liuos sentrifugoimalla putket jäädytetyssä (4°C) mikrosentrifugissa 500xg viisi minuuttia. Sentrifugoinnin jälkeen trypsiini/EDTA –liuos poistettiin putkista, ja solut pestiin PBS-puskurilla sentrifugoimalla niitä uudelleen 500xg kolme minuuttia. Jäljelle jäänyt PBS-liuos poistettiin mahdollisimman hyvin, varoen putkien pohjalle jäävää solupellettiä. Seuraavaksi pelletin päälle lisättiin jäähauteessa säilytettyä CER I –reagenssia, joka sekoitettiin solupelletin kanssa vorteksoimalla vähintään 15 sekunnin ajan. Tämän jälkeen putki laitettiin jäähauteeseen 15 minuutiksi. Inkubaation jälkeen putkiin lisättiin kylmää CER II –reagenssia, jonka jälkeen putkia vorteksoitiin viiden sekunnin ajan. Tämän jälkeen putket laitettiin jälleen jäähauteeseen minuutiksi. Inkuboinnin jälkeen putkia vorteksoitiin vähintään viiden sekunnin ajan, jonka jälkeen putket laitettiin jäädytettyyn mikrosentrifugiin ja sentrifugoitiin täydellä teholla (13 200 rpm) seitsemän minuutin ajan. Sentrifugoinnin jälkeen pinnalle jäänyt sytoplasmafraktio poistettiin putkista ja siirrettiin

omiin, asianmukaisesti merkattuihin putkiinsa -80°C :en. Jäljelle jääneet putket sisälsivät tumafraktiot ja ne pestiin PBS-puskuriliuksella ja sentrifugoitiin täydellä teholla kolmen minuutin ajan. PBS-liuos poistettiin varovasti rikkomatta putkien pohjalla olevaa tumista koostuvaa pellettiä. Pellettien päälle lisättiin kylmää NER –reagenssia. Kaikki putket vorteksoitiin vähintään 15 sekunnin ajan. Putket asetettiin jäähautteeseen, ja putkia vorteksoitiin vähintään 15 sekunnin ajan joka kymmenes minuutti 40 minuutin ajan. Tämän jälkeen putket sentrifugoitiin täydellä teholla kymmenen minuutin ajan, ja putkista poistettiin tumafraktiot erillisiin asianmukaisesti merkattuihin putkiin ja laitettiin -80°C :en. Solut fraktioitiin välittömästi irrotuksen jälkeen.

Fraktioinnista saadut tuma- ja sytoplasmafraktiot konsentroitiin. Proteiinikonsentroidin tarkoitus on väkevöittää näytteen proteiinipitoisuus pienentämällä näytteen nestetilavuutta. Tutkimuksessa päädyttiin tekemään proteiinikonsentroidin, koska TLR9 :n määrä eri fraktioissa vaihtelee ja määrät olivat liian alhaiset mitattavaksi sellaisenaan. Tuma- ja sytoplasmafraktiot sulatettiin jäähautteella konsentroidin varten ja siirrettiin erillisiin merkattuihin konsentraatioputkiin. Konsentroidin varten käytettiin kaupallisia Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter Devices –konsentraatioputkia (Kuvio 3). Konsentraatioputkien suodattimessa olevan membraanin ansiosta sentrifugoitaessa proteiinit jäivät putkissa olevaan suodatinosaan kokonsa perusteella.



Kuvio 1. Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter Devices –konsentraatioputki (Mukaillen Merck Millipore Corporation 2016)

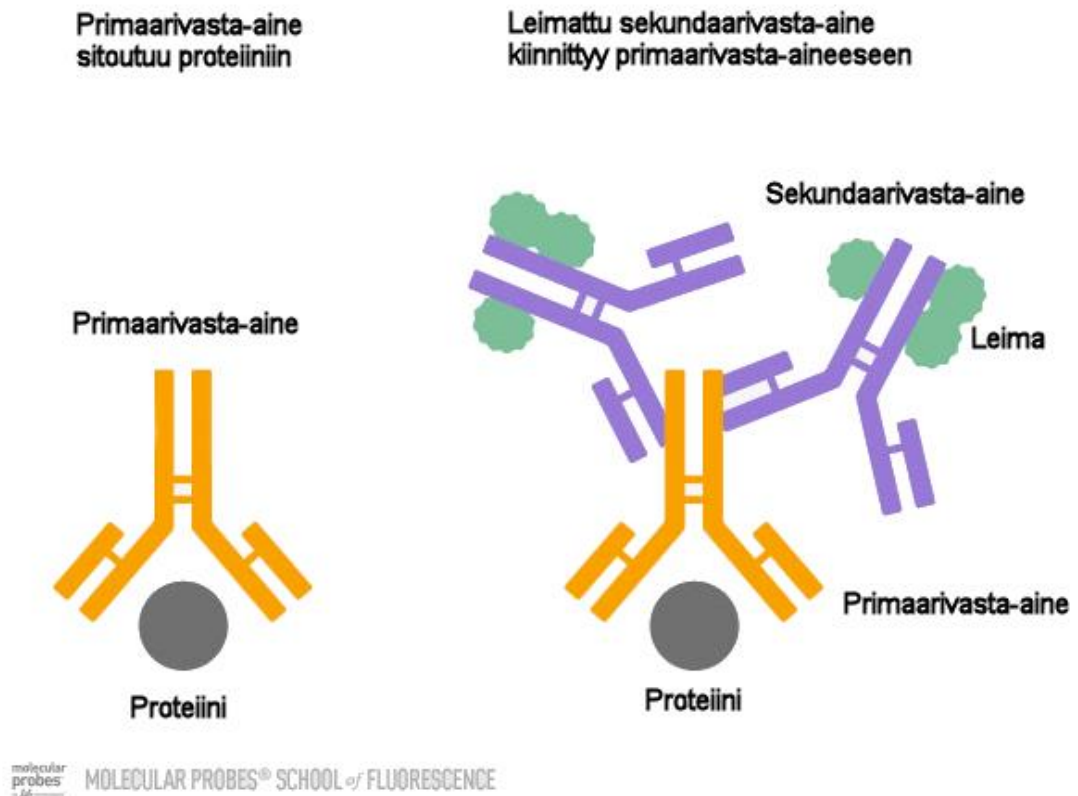
Näytteet sisältäneet konsentraatioputket asetettiin esijäähdytettyyn mikrosentrifugiin (4°C) ja sentrifugoitiin täydellä teholla 30 minuutin ajan. Sentrifugoinnin jälkeen suoda-

tinosa käännettiin ohjeen mukaisesti ylösalaisin puhtaisiin putkiin. Suodatinosan sisältävät putket sentrifugoitii uudelleen kahden minuutin ajan teholla 2000g, jotta suodatinosan proteiinit saatiin kerättyä suodattimesta ja putket siirrettiin pakkaseen. Fraktioiden proteiinikonsentraatiot mitattiin ja näytteet laimennettiin saman vahvuisiksi ennen Western blot –ajoa.

4.4 Western blot

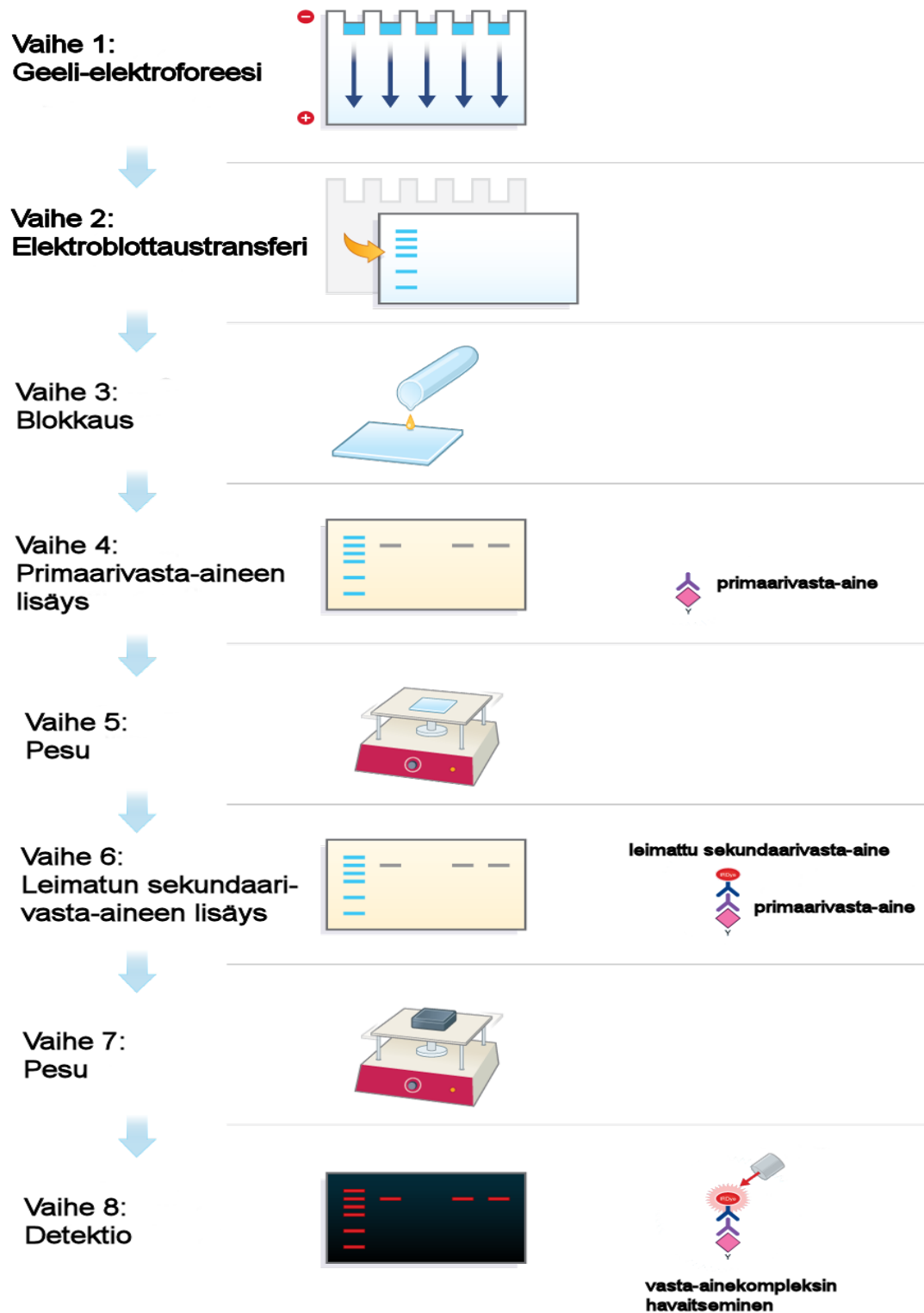
Immunoblottaus (Western blot) on proteiinien tunnistusmenetelmä, jossa käytetään vasta-aineita proteiinien tunnistamiseen. Menetelmä perustuu proteiinien erottamiseen koon perusteella proteiinin tertiäärirakenteen tai polypeptidiketjun pituuden mukaan, ja halutun proteiinin havaitsemiseen vasta-aineiden avulla. Jotta proteiinit voitaisiin erotella toisistaan koon perusteella, tulee proteiinien rakenne hajottaa, eli denaturoida. Denaturointi saadaan aikaiseksi asettamalla proteiinit niille epäsuotuisiin olosuhteisiin, kuten liian kuumaan lämpötilaan tai liian emäksisiin tai happamiin olosuhteisiin. Denaturointi mahdollistaa vasta-aineen kiinnittymisen proteiineihin. (Voet&Voet 2011.)

Geeli-elektroforeesissa, eli SDS-PAGE (engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) menetelmässä denaturoidut proteiinit siirretään geelille ja geeliltä huokoiselle membraanille, josta ne voidaan vasta-aineiden avulla tulkita koon perusteella (Voet&Voet 2011). Proteiinien lisäksi geelille lisätään kokomarkkeri, jonka avulla varmistetaan, että havaittu kohdeproteiini on oikean kokoinen (Abcam 2016). Proteiinien siirryttyä membraanille ne tunnistetaan primaarivasta-aineella, joka vastaavasti tunnistetaan leimatulla sekundaarivasta-aineella (Kuvio 1). Vasta-aineiden epäspesifinen sitoutuminen membraaniin estetään käyttämällä blokkausta. Blokkina toimii usein maitoliuos tai nautaeläimen seerumin albumiinista tehty liuos. (Wilson&Walker 2010.)



Kuvio 2. Vasta-ainesitoutuminen (Mukaiillen Thermo Fisher Scientific 2015)

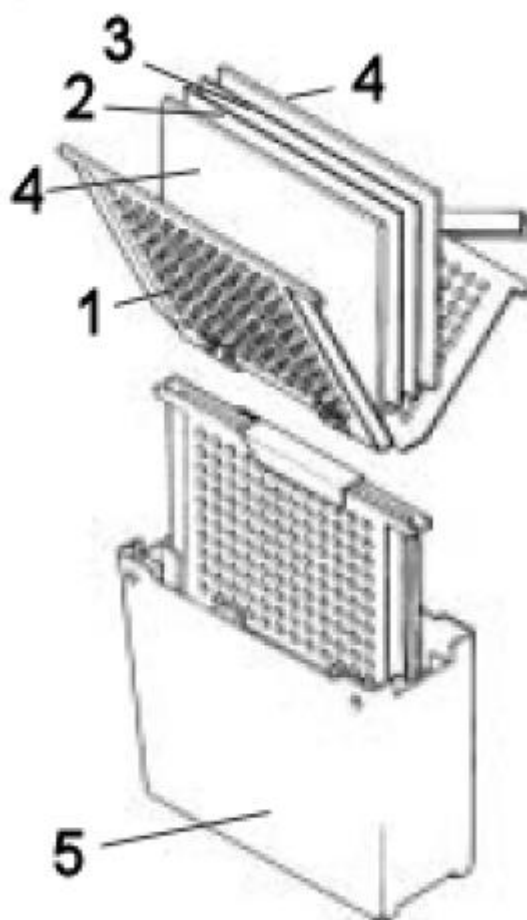
Proteiinien havaitsemista membraanilta kutsutaan detektioksi. Detektion voi tehdä esimerkiksi käyttämällä piparjuuriperoksidaasilla leimattua sekundaarivasta-ainetta (HRP, engl. *horseradish peroxidase*), joka voidaan havaita membraanilta tehostetun kemiluminesenssireaktion, ECL-reaktion (engl. *enhanced chemiluminescence*) avulla. Kemiluminesenssireaktiossa vetyperoksidin (H_2O_2) avulla hapettunut HRP reagoi luminolin kanssa. Reaktio emittoi sinistä valoa 428 nm aallonpituudella, joka on havaittavissa esimerkiksi röntgenfilmin avulla. (Mahmood & Chang 2012.) Membraanin detektio voidaan tehdä myös suoraan erityisillä kuvantamislaitteilla ilman erillisiä valoa emittoivia aineita. Kuvantamislaitteet hyödyntävät esimerkiksi infrapunavaloa ja lasereita havaitsemalla proteiineihin sitoutuneet vasta-aineet suoraan membraanilta. Kuvantamislaitteen membraanilta havaitsema signaali on suoraan verrannollinen proteiinin määrään. (LI-COR Inc. 2016.) Kuviossa 2 havainnollistetaan Western blot-menetelmän periaate.



Kuvio 3. Western blot menetelmä (Mukaiillen LI-COR 2016)

4.4.1 Tuma- ja sytoplasmafraktioiden TLR9 proteiinin määrittäminen Western blot – menetelmällä

Fraktioiden TLR9:n proteiinin määrittämiseksi tehtiin Western blot –ajot. Näytteisiin lisättiin latauspuskuria, jonka jälkeen näytteet denaturoitiin kuumentamalla +95°C:ssa viiden minuutin ajan. Denaturoinnin jälkeen putket sentrifugoitiin nopeasti, jotta putkien korkeihin mahdollisesti haihtuneet näytepisarat saatiin putkien pohjalle. Tämän jälkeen näytteet pipetoitiin valmiiksi tehdyille geeleille. Alageelien vahvuus valittiin TLR9 kohdeproteiinin koon mukaisesti. Näytemäärät pidettiin yhdenmukaisena luotettavien tulosten varmistamiseksi lataamalla yhtä paljon näytettä jokaiseen kaivoon. Näytteitä pipetoitiin ylägeelien kaivoihin, ja yhteen kaivoon pipetoitiin kokostandardi, jotta proteiinit voitaisiin tulkita koon mukaan. Geeli ajettiin Bio-Rad:in Mini-Trans-Blot® geelinajolaitteilla ensin 65 V teholla 15 minuutin ajan, jonka jälkeen teho nostettiin 100 V:iin. Ajoa jatkettiin noin tunti, kunnes proteiinit ja kokostandardi olivat ajautuneet geelin alareunaan asti. Ajon jälkeen koottiin proteiinitransferikasetti, eli elektroblottauskasetti (Kuvio 4), työohjeen mukaisesti (Liite 7, työohje) proteiinien siirtoa varten. Elektroblottauskasetti sekä jääblokki asetettiin siirtopuskurilla täytettyyn siirtokammioon, ja astia asetettiin jäähauteeseen. Kammioon laitettiin magneettisauva ja ajolaite siirrettiin magneettisekoittajan päälle, jonka jälkeen siirtolaitteeseen kytkettiin virta 100 V. Proteiinien annettiin siirtyä tunnin ajan, kunnes virta katkaistiin ja siirtolaite purettiin.



Kuvio 4. Elektrobloittauskasetti. Kasetti (1) pitää geelin (2) ja membraanin (3) yhdessä kahden filtlerin ja sienen (4) välissä. Sienet ja filttrit antavat geelille ja membraanille parhaan mahdollisen kontaktin toisiinsa. Kasetti upotetaan kokonaisuudessaan siirtopuskurilla täytettyyn siirtokammioon (5). (Mukaillen AES Electrophoresis Society 2016)

Elektrobloittauksen jälkeen membraanit asetettiin 50ml:n falconputkiin. Putkiin lisättiin blokkaukspuskuria (TBS-T, engl. *tris-buffered saline and tween*), joka sisälsi 5% maitoa ja 0,1% Tween-20:stä, jonka jälkeen membraaneja inkuboitiin huoneenlämmössä rullasekoittimella tunnin ajan. Inkuboinnin jälkeen blokkaukspuskuri poistettiin ja tilalle pipetoiittiin TBS-T:hen laimennettu TLR9 primaarivasta-aine. Membraaneja inkuboitiin rullasekoittajassa yön yli +4°C kylmäkaappissa. Inkubaation jälkeen primaarivasta-aine otettiin talteen ja membraanit pestiin TBS-T-liuoksella kolme kertaa 10 minuutin välein. Pesun jälkeen putkiin lisättiin TBS-T:hen laimennettua sekundaarivasta-ainetta. Putket asetettiin inkuboitumaan rullasekoittimeen huoneenlämpöön tunnin ajaksi. Inkubaatiojakson jälkeen sekundaarivasta-aine otettiin talteen ja membraanit pestiin TBS-T-liuoksella kolme kertaa 10 minuutin välein.

Vasta-ainekäsittelyn jälkeen membraanit kuvattiin LI-COR Odyssey® CLx infrapunakuvantamislaitteella (Kuva 3) (LI-COR Odyssey® CLx Infrared Imaging System).



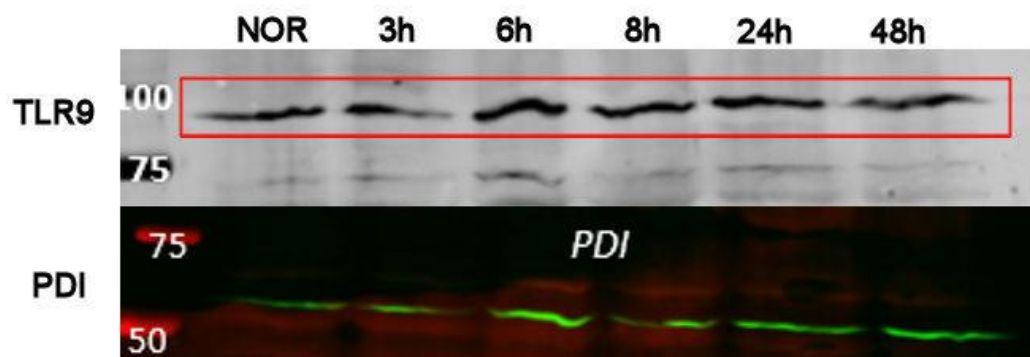
Kuva 3. LI-COR Odyssey® CLx infrapunakuvantamislaitte (LI-COR 2016)

5 TULOKSET

Latauskontrollina käytettiin lamiini a/c:tä ja PDI:tä. Lamiinia käytettiin tumafraktioissa ja PDI:tä sytoplasmafraktioissa niiden tuma- ja sytoplasmaspesifisyyden vuoksi. Latauskontrollin tarkoitus oli varmistaa fraktioiden puhtaus sekä näytteiden latauksen onnistuminen.

5.1 UT-SCC-74

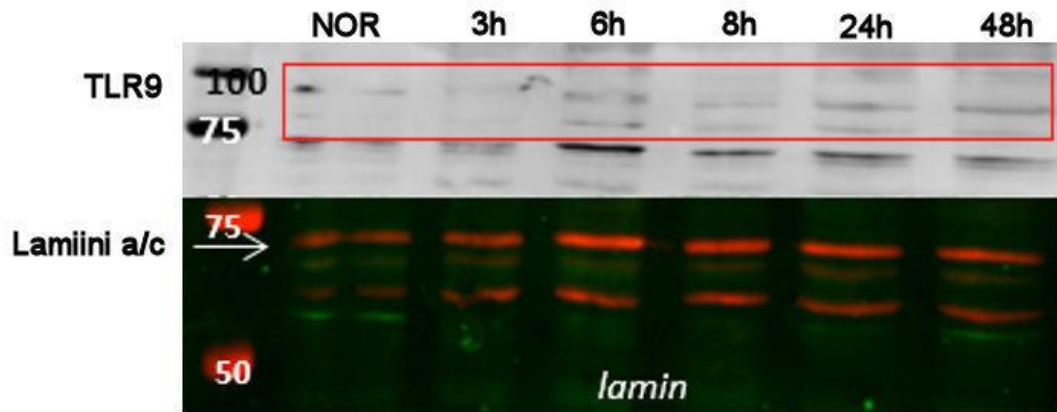
Kuvassa 4 on esitetty UT-SCC-74 solulinjan Western blot-ajon tulos IMG305A TLR9-vasta-aineella sytoplasmafraktiossa. Sytoplasmafraktiossa oli selkeästi havaittavissa TLR9 signaali kaikissa hypoksian aikapisteissä sekä normoksiassa noin 90 kDa:n kohdalla. Hypoksia-aikapisteessä 6h TLR9:n ilmeneminen oli suurempi kuin muissa aikapisteissä, mikä näkyi paksumpana signaalina kuvassa. Latauskontrolli (PDI) näkyi selkeästi kuvassa ilman epäpuhtauksia, joten kaikkien aikapisteiden fraktiot voitiin tulkita onnistuneiksi.



Kuva 4. UT-SCC-74 solulinjan sytoplasmafraktio IMG305A vasta-aineella. Kaikissa aikapisteissä on havaittavissa selkeä TLR9 signaali noin 90 kDa:n kohdalla. Aikapisteessä 6h TLR9:n ilmeneminen on suurempi kuin muissa aikapisteissä, sillä signaali on paksumpi kuin muut. Latauskontrolli (PDI) näkyy kuvassa vihreänä, jonka mukaan fraktio on onnistunut kaikissa aikapisteissä. Tästä voidaan päätellä solulinjassa olevan TLR9 ilmenemistä sytoplasmassa.

UT-SCC-74 solulinjan tumafraktion tulokset käyvät ilmi kuvassa 5. Tumafraktiossa TLR9:n oletetun koon (80-90 kDa) kohdalla ei havaittu selkeää TLR9:n signaalia. Latauskontrolli (lamiini) oli havaittavissa selkeästi kuvassa, mutta myös PDI:n ilmenemistä

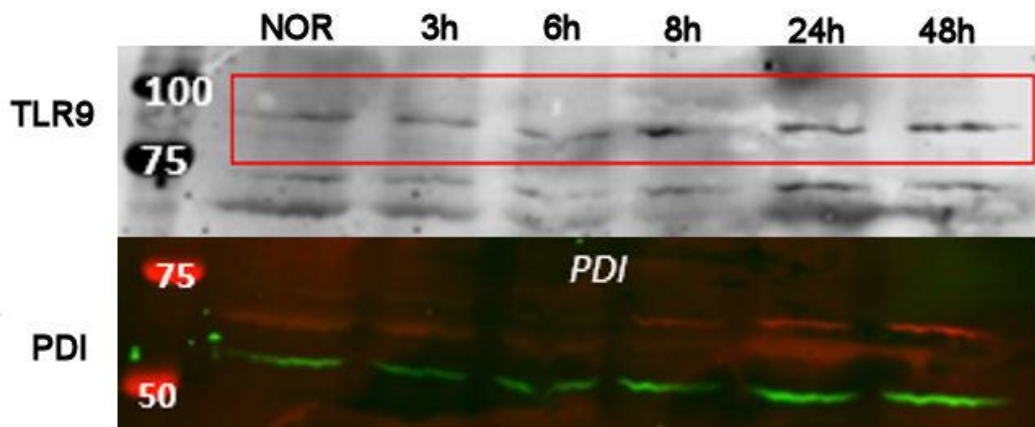
oli nähtävissä. Tästä johtuen oli syytä epäillä fraktioiden mahdollisesti epäonnistuneen ja koe tulisi toistaa tulosten varmistamiseksi.



Kuva 5. UT-SCC-74 solulinjan tumafraktio IMG305A vasta-aineella. 80-90 kDa:n kohdalla ei ole havaittavissa selkeää TLR9 signaalia. Latauskontrolli (lamiini) näkyy kuvassa punaisena ja on havainnollistettu valkoisella nuolella. Latauskontrollissa on myös havaittavissa lievää PDI:n ilmenemistä, joka näkyy kuvassa vihreänä, mistä voidaan päätellä fraktioiden mahdollisesti epäonnistuneen. Solulinjassa ei ole havaittavissa selkeää TLR9 ilmenemistä tumassa, mutta tulosten varmistamiseksi koe tulisi toistaa.

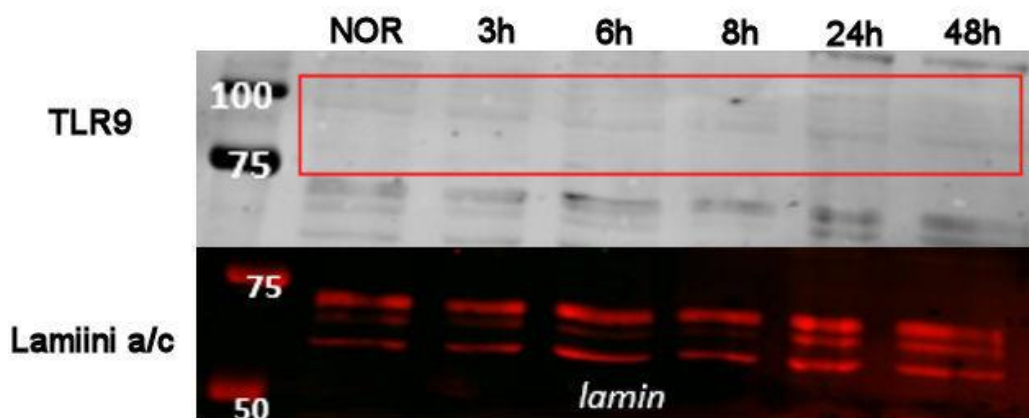
5.2 UT-SCC-8

Kuvassa 6 on esitetty UT-SCC-8 solulinjan sytoplasmafraktion tulokset. TLR9 signaali oli havaittavissa kaikissa hypoksian aikapisteissä sekä normoksiassa. Latauskontrollissa (PDI) oli havaittavissa hieman lamiinin ilmenemistä, minkä perusteella voitiin epäillä fraktioiden mahdollisesti kontaminoituneen ja siten epäonnistuneen. Koe tulisi toistaa tulosten varmistamiseksi.



Kuva 6. UT-SCC-8 solulinjan sytoplasmafraktio IMG305A vasta-aineella. Fraktion kaikissa aikapisteissä on havaittavissa TLR9 signaali. Latauskontrolli (PDI) näkyy kuvassa vihreänä. Kuvassa on havaittavissa myös lamiinia, joka näkyy kuvassa punaisena. Tästä johtuen fraktioiden voidaan epäillä mahdollisesti epäonnistuneen. Solulinjassa on havaittavissa TLR9 ilmenemistä sytoplasmassa, mutta koe tulisi toistaa tulosten varmistamiseksi.

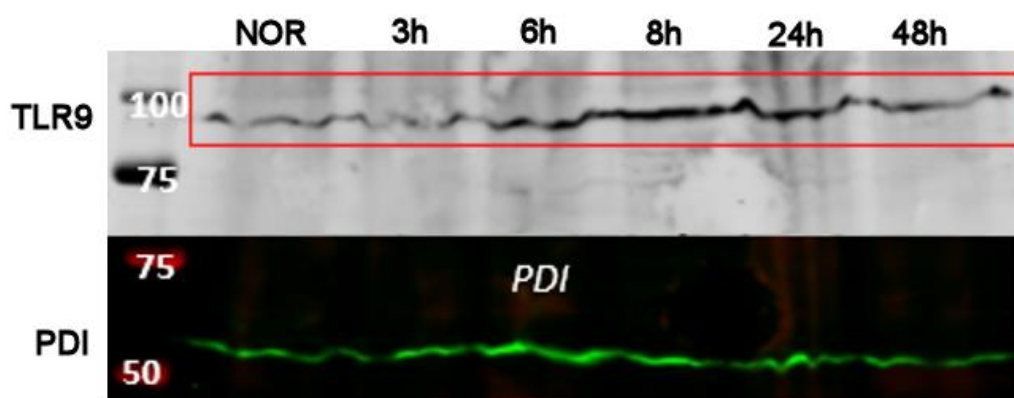
UT-SCC-8 solulinjan tumafraktion tulokset on esitetty kuvassa 7. Tuloksissa ei havaittu TLR9 signaalia 80-90 kDa:n kohdalla. Latauskontrolli näkyi kuvassa selkeästi ilman epäpuhtauksia, joten fraktioiden voitiin päätellä onnistuneen. Tämän perusteella solulinjassa ei esiintynyt TLR9 ilmenemistä tumassa.



Kuva 7. UT-SCC-8 solulinjan tumafraktio IMG305A vasta-aineella. 80-90 kDa:n kohdalla ei ole havaittavissa TLR9 signaalia. Latauskontrolli (lamiini) näkyy kuvassa punaisena, jonka mukaan fraktiot ovat onnistuneet. Solulinjassa ei ole havaittavissa TLR9:n ilmenemistä tumassa.

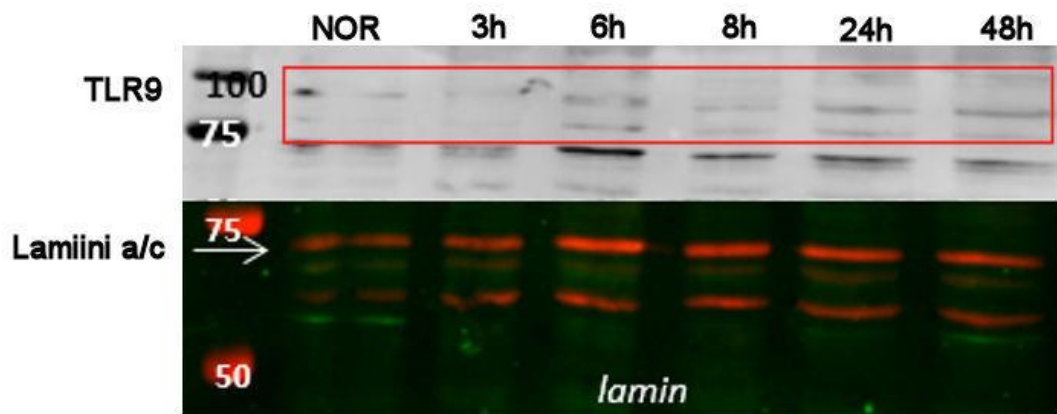
5.3 FaDu

FaDu solulinjan sytoplasmafraktiossa oli selkeästi havaittavissa TLR9 signaali kaikissa hypoksian aikapisteissä sekä normoksiassa. Tulokset on esitetty kuvassa 8. Latauskontrollin (PDI) tuloksen mukaan fraktiot olivat puhtaita, eli kontaminaatiota ei ollut, sillä latauskontrolli oli selkeästi havaittavissa kuvassa ilman epäpuhtauksia. Solulinjan sytoplasmassa esiintyi TLR9 ilmenemistä voimakkaasti etenkin 8 tunnin aikapisteen kohdalla.



Kuva 8. FaDu solulinjan sytoplasmafraktio IMG305A vasta-aineella. Fraktiossa on havaittavissa selkeä TLR9 signaali toivotun kokomarkkerin kohdalla. Signaali on erityisen voimakas hypoksian 8 tunnin aikapisteessä. Latauskontrollin (PDI) mukaan fraktiot ovat onnistuneet, sillä kontrolli näkyy kuvassa vihreänä. Solulinjassa voidaan siis havaita selkeää TLR9:n ilmenemistä sytoplasmassa.

Solulinjan tumafraktiossa ei ollut nähtävissä selkeää TLR9 signaalia 80-90 kDa:n kohdalla, mutta lievä signaali oli havaittavissa. Tulokset käyvät ilmi kuvassa 9. Latauskontrollissa (lamiini) oli näkyvissä hieman PDI:n ilmenemistä, mikä kieli fraktioiden mahdollisesti kontaminoituneen. Koe tulisi toistaa tulosten varmistamiseksi.



Kuva 9. FaDu solulinjan tumafraktio IMG305A vasta-aineella. Lievä TLR9 signaali on havaittavissa 80-90 kDa:n kohdalla. Latauskontrolli (lamiini) näkyy kuvassa punaisena (havainnollistettu nuolella), PDI ilmeneminen näkyy vihreänä. Fraktiot ovat mahdollisesti kontaminoituneet, joten koe tulisi toistaa tulosten varmistamiseksi.

6 POHDINTA

Syöpätutkimuksien ajankohtaisuus teki opinnäytetyön aiheesta erittäin mielenkiintoisen ja motivoi perehtymään laajaan teoreettiseen viitekehykseen ja vieraaseen aihealueeseen. Perehtyminen antoi vahvan pohjan ymmärtää tutkimuksen lähtökohdat ja se helpotti tutkimuksen tavoitteiden hahmottamista. Tutkimuksen käytännön toteutus, eli soluviljely ja muut käytetyt menetelmät, olivat entuudestaan suurelta osin tuntemattomia. Vieraiden asioiden opettelu toi haastetta tutkimuksen tekoon, ja johti myös väistämättä virheisiin tutkimuksen toteutuksen eri vaiheissa. Virheet kuitenkin myös opettivat huolellisuuteen laboratoriotöitä suoritettaessa, ja samalla kun kokeita toistettiin, laboratoriorutiini, itseluottamus ja itsenäinen työskentelykyky paranivat merkittävästi.

Monien käytettyjen menetelmien virheherkkyys saattoi vaikuttaa tutkimuksen tuloksiin, esimerkkinä Western blot, joka on menetelmänä erittäin aikaa vievä ja moniosainen. Pienikin virhe yhdessä toteutuksen osassa saattoi aiheuttaa käyttökelvottoman tuloksen, ja virhe selvisi yleensä vasta saadun tuloksen myötä. Tämä oli ongelmana useassa ajossa, ja virheelliset ajot jouduttiin tekemään alusta loppuun uudelleen, mikä oli aikaa vievää ja hidastutti tulosten saamista. Tutkimusmenetelmän luotettavuutta yritettiin varmistaa lisäämällä solumäärää, varmistaen siten näytemäärien riittävyys kokeiden toistamiseen. Opinnäytetyön kokeiden uusiminen tarpeeksi useasti tarpeeksi samankaltaisin standardein (muun muassa sama tekijä, samat näytteet, samat aineet, samat tilat) vahvistaa tutkimustulosten luotettavuuden ja varmistaa tulosten oikeellisuuden.

Tutkimuksen suurin virhelähde oli fraktioiden mahdolliset kontaminaatiot. Kontaminaatiot johtuivat suurella todennäköisyydellä tekijän kokemattomuudesta. Tästä johtuen kokeet tulisi toistaa tulosten varmistamiseksi ja mahdollisten virhelähteiden poissulkemiseksi.

TLR9:n on erittäin lupaava syövän diagnostiikan ja lääkekehityksen tutkimuskohde. Aiempien tutkimuksien osalta TLR9 on osoittautunut vaikuttavaksi tekijäksi kolmoisnegatiivisten rintasyöpäkasvaimien fysiologiassa. TLR9:n tehtävä pään ja kaulan alueen syöpäsoluissa on tärkeä jatkotutkimuskohde, sillä aiheesta ei ole juurikaan tietoa.

Tähän asti TLR9 on havaittu lähes ainoastaan syöpäsolujen sytoplasmassa. Alustavien hypoksisissa olosuhteissa tehtyjen tutkimuksien mukaan, TLR9:n on havaittu sijaitsevan sytoplasmassa lisäksi myös solujen tumassa. Tämän opinnäytetyön tulokset osoittivat

TLR9:n sijaitsevan tutkituissa solulinjoissa pääosin sytoplasmassa, ja jonkin verran tu-
massa. Solulinjojen vaihtelun ja mahdollisten epäonnistuneiden fraktioiden vuoksi ko-
keet olisi kuitenkin tärkeää toistaa tulosten varmistamiseksi. Jatkotutkimuksissa tulisi sel-
vittää tulosten havainnon biologinen ja kliininen merkitys. Mikäli TLR9:n sijainti korreloi
pään ja kaulan alueen syöpien aggressiivisuuden kanssa, sitä voitaisiin käyttää ennus-
teellisena markkerina ja jopa uutena lääkekehityskohteenä kyseisten syöpien hoitoon.

LÄHTEET

Abcam 2016. Transfer and staining of proteins in western blot. Viitattu 19.4.2016. www.abcam.com > Support > Protocols and troubleshooting > Protocol guides and diagrams > Detailed applications guide > Western blotting guide > Transfer and staining of proteins in western blot.

AES Electrophoresis Society 2016. Western Blotting. Viitattu 8.5.2016. http://www.aesociety.org/areas/western_blot.php

Akira, S. Uematsu, S. & Takeuchi, O. 2006. Pathogen Recognition and Innate Immunity. Cell Press. 124, 783-801.

Alberts, B. Johnson, A. Lewis, J. Morgan, D. Raff, M. Roberts, K. & Walter, P. 2015. Molecular Biology of the Cell. 6. painos. Iso-Britannia: Garland Science.

Barton, GM. Kagan, JC & Medzhitov, R. 2006. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. Nature Immunology. Vol. 7. Number 1.

Ewald, SE. Lee, BL. Wickliffe, KE. Shi, GP. Chapman, HA. & Barton, GM. 2008. The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor. Nature. 456, 658-662.

Freshney, R.I. 2005. Culture of Animal Cells. 5. painos. Yhdysvallat, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.

Grénman, R. & Joensuu, H. 2011. Pään ja kaulan alueen onkologia työryhmä – 20 vuotta moniammatillista toimintaa. Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim. Volume 127(18):1951-2.

Hypoxigen 2015. Hypoxystation H45. Viitattu 21.4.2016. www.hypoxigen.com > Products > Hypoxystation > Hypoxystation H45

Höckel, M. & Vaupel, P. 2001. Tumor Hypoxia: Definitions and Current Clinical, Biologic, and Molecular Aspects. Journal of the National Cancer Institute. Vol. 93, No.4.

Ilvesaro, JM. Merrel, MA. Li, L. Wackhoure, S. Graves, D. Brooks, S. Rahko, E. Jukkola-Vuorinen, A. Vuopala, KS. Harris, KW & Selander, KS. 2008. Toll-Like Receptor 9 Mediates CpG Oligonucleotide-Induced Cellular Invasion. Molecular Cancer Research. 6;1534.

Jiao, W. Lin, H-M. Datta, J. Braunschweig, T. Chung, J-Y. Hewitt, SM. & Rane, SG. 2008. Aberrant nucleocytoplasmic localization of the retinoblastoma tumor suppressor protein in human cancer correlates with moderate/poor tumor differentiation. Oncogene. 27, 3156–3164.

Jääskelä-Saari, HA. Kairemo, KJ. Jekunen, AP. Pekkola-Heino, K. Kulmala, J. Ramsay, HA. & Grenman R. 1996. Cytotoxicity of bleomycin and external radiation in squamous cell cancer cell lines of head and neck. Cancer detection and prevention. 20(4):279-84.

Leifer, CA. Kennedy, MN, Mazzone, A. Lee, CW. Kruhlak, MJ. & Segal, DM. 2004. TLR9 is Localized in the Endoplasmic Reticulum Prior to Stimulation. The Journal of Immunology. 173: 1179 – 1183.

LI-COR 2016. Odyssey® CLx Infrared Imaging System. Viitattu 8.5.2016. www.licor.com > Products > Odyssey CLx.

LI-COR 2016. Typical Workflows for Quantitative Infrared Westerns. Viitattu 25.4.2016. www.licor.com > Workflows > Typical Workflows for Quantitative Infrared Westerns.

Ma, J. Lu, S. Yu, L. Tian, J. Li, J. Wang, H. & Xu, W. 2011. FaDu cell characteristics induced by multidrug resistance. *Oncology Reports*. August 10th 2011. 1189-1195.

Mahmood, T. & Yang, PC. 2012. Western Blot: Technique, Theory and Trouble Shooting. *North American Journal of Medical Sciences*. 4(9): 429–434.

Merck Millipore Corporation 2016. Amicon Ultra-0.5 mL Centrifugal Filters for DNA and Protein Purification and Concentration. Viitattu 2.5.2016. www.merckmillipore.com > Life Science Research > Protein Sample Preparation > Protein Concentration & Dialysis > Sample Prep Centrifugal Filter Units> Amicon Ultra-0.5 mL Centrifugal Filters for DNA and Protein Purification and Concentration.

Moen, I. & Stuhr, L. E. B. 2012. Hyperbaric oxygen and cancer – a review. *Target Oncology*. 7(4): 233–242.

Repnik, U. Česen, MH. & Turk, B. 2013. The Endolysosomal System in Cell Death and Survival. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 5:a008755.

Rodriguez, JA. Au, WWY. & Henderson, BR. 2003. Cytoplasmic mislocalization of BRCA1 caused by cancer-associated mutations in the BRCT domain. *Experimental Cell Research* 293 (2004) 14 – 21.

Ruutu, M. Johansson, B. Grenman, R. & Syrjänen, S. 2005. Two different global gene expression profiles in cancer cell lines established from etiologically different oral carcinomas. *Oncology Reports*. December 1st 2005. 1511-1517.

Sandholm, J. Tuomela, J. Kauppila, JH. Harris, KW. Graves, D. & Selander, KS.2014. Hypoxia regulates Toll-like receptor-9 expression and invasive function in human brain cancer cells in vitro. 2014. *Oncology Letters*. 8:266-274.

Smith, C. 2011. Incubators: Keeping Your Cells in Style. *Biocompare*. Viitattu 9.3.2016. <http://www.biocompare.com/Editorial-Articles/41807-Incubators-Keeping-Your-Cells-in-Style/>

Takida, K. & Akira, S. 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology*. 17 (1): 1-14.

Terveyskirjasto 2014. Elimistön vastustuskyky, immunitaetti. *Lääkärikirja Duodecim*. Viitattu 21.4.2016. http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk01150

Thermo Fisher Scientific 2015. Immunolabeling. Viitattu 21.4.2016. www.thermofisher.com > Applications and Techniques > Life Sciences > Cell Analysis > Molecular Probes School of Fluorescence > Labeling your samples > Immunolabeling

Tuomela, J. Sandholm, J. Kauppila, JH. Lehenkari, P. Harris, KW. & Selander, KS. 2013. Chloroquine has tumor-inhibitory and tumor-promoting effects in triple-negative breast cancer. *Oncology Letters*. Volume 6: 1665-1672.

Tuomela, J. Sandholm, J. Karihtala, P. Ilvesaro, J. Vuopala, KS. Kauppila, JH. Kauppila, S. Chen, D. Pressey, C. Härkönen, P. Harris, KW. Graves, D. Auvinen, PK. Soini, Y. Jukkola-Vuorinen, A. & Selander, KS. 2012. Synnynnäinen immunitaetti säätelee kolmoisnegatiivisen rintasyövän invaasiota. *Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim*. Volume 128(18):1896.

Tuomela, J. Grönroos, TJ. Valta, MP. Sandholm, J. Schrey, A. Seppänen, J. Marjamäki, P. Forsback, S. Kinnunen, I. Solin, O. Minn, H. & Härkönen, PL. 2010. Fast growth associated with aberrant vasculature and hypoxia in fibroblast growth factor 8b (FGF8b) over-expressing PC-3 prostate tumour xenografts. *BMC Cancer*. 10:596.

Tuomela, J. Sandholm, J. Karihtala, P. Ilvesaro, J. Vuopala, KS. Kauppila, JH. Kauppila, S. Chen, D. Pressey, C. Härkönen, P. Harris, KW. Graves, D. Auvinen, PK. Soini, Y. Jukkola-Vuorinen, A.

& Selander, KS. 2012. Low TLR9 expression defines an aggressive subtype of triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*. DOI 10.1007/s10549-012-2181-7.


Voet, D. & Voet, JG. 2011. *Biochemistry*. 4. painos. Yhdysvallat, New Jersey: John Wiley & Sons Inc.

Wang, R-F. Miyahara, Y. & Wang, HY. 2008. Toll-like receptors and immune regulation: implications for cancer therapy. *Oncogene*. 27: 181–189.

Watters, T. Kenny, E. & O'Neill, L. 2007. Structure, function and regulation of the Toll/IL-1 receptor adaptor proteins. *Immunology and Cell Biology*. 85: 411–419.

Wu, D. & Yotnda, P. 2011. Induction and Testing of Hypoxia in Cell Culture. *Journal of Visualized Experiments*. 54: 289

Liite 1. Toimeksiantosopimus



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPINNÄYTETYÖN
TOIMEKSIANTOSOPIMUS

1

OPISKELIJAN TIEDOT

Nimi Frida Samuelsson

Osoite Hagnäsintie 17, 02400 KIRKKONUMMI

Puhelin koti 0400647645 Puhelin työ _____

Sähköposti frida.samuelsson@edu.turkuamk.fi

Koulutusohjelma bioanalytiikan ko.

OPINNÄYTETYÖ

Aihe/ työnimi

Tollinkaltaisen reseptori 9:n solunsisäinen sijainti normeksiassa ja hypoksiassa

Aikataulu Kevät 2016

TOIMEKSIANTAJA

Organisaatio Turun yliopisto, Solubiologian ja anatomian oppiaine

Työn ohjaaja / yhteyshenkilö Dos. Johanna Tuomela

Osoite Tykistökatu 6B, Biocity 4. krs, 20520 Turku

Puhelin +358 504352673 Sähköposti jomitu@utu.fi

OHJAAVAN OPETTAJAN YHTEYSTIEDOT

Ohjaava opettaja Sanna Virtanen

Puhelin _____ Sähköposti sanna.virtanen@turkuamk.fi

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



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPINNÄYTETYÖN TOIMEKSIANTOSOPIMUS

2

OPINNÄYTETYÖN SOPIMUSEHDOT*

OHJAUS JA VASTUUT

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

OIKEUDET

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

TYÖSUHDE JA KUSTANNUKSET

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

TULOSTEN JULKISTAMINEN JA LUOTTAMUKSELLISUUS

Opinnäytetyöstä laaditaan Turun ammattikorkeakoulun ohjeen mukainen kirjallinen raportti.

Mitä liike- tai ammattisalaisuuksiin liittyviä asioita ei esitetä opinnäytetyöraportissa?

Kaikki Frida Samuelssonin valmistelemat tulokset esitetään opinnäytetyöraportissa.

OLEMME YHTEISESTI SOPINEET OPINNÄYTETYÖN TOTEUTUKSESTA YLLÄ ESITETYLLE TAVALLA

21.3.2016

13.5.2016

Opiskelija

Toimeksiantaja

LIITE : OPINNÄYTETYÖSUUNNITELMA

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

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

Liite 2. Työohje soluviljelyyn

1. Työskentele aina laminaarikaapissa käsitellessäsi soluja.
2. Ennen työskentelyä, desinfioi laminaarikaappi 70%:a alkoholilla.
3. Käytä aina hanskoja käsitellessäsi soluja ja työskennellessäsi laminaarikaapissa.
4. Vältä kontaminaatioiden päätymistä laminaarikaappiin; desinfioi aina kaikki laminaarikaappiin vietävät tarvikkeet.
5. Käytä steriilejä, kertakäyttöisiä lasipipettejä ollessa suorassa kontaktissa solujen kasvuliuoksen ja/tai -alustan kanssa.
6. Preparoi ja käsittele aina soluviljelyssä käytettävä liuokset laminaarikaapissa, liekitä pullojen korkit ja suut avaamisen jälkeen ja ennen sulkemista.
7. Liuokset tulee tehdä steriloituihin pulloihin steriilein pipetein kontaminaatioiden välttämiseksi.
8. Pyyhi mahdolliset roiskeet pois välittömästi 70%:a alkoholilla.
9. Työskentelyn päätteeksi, desinfioi laminaarikaappi 70%:a alkoholilla.

Liite 3. Solujen lyysaus (irrotus) trypsiini/EDTA – liuoksella ja solujen jakaminen

1. Medium imetään pois, kallista viljelypulloa niin, ettei pipetin kärki osu pullon pohjaan.
2. Pipetoi pullon alakulmaa tukena käyttäen n. 3-4ml (tai tarpeen mukaan, riippuu viljelypullon suuruudesta) PBS-liuosta pullon pohjalle. Älä kosketa pullon pohjaa.
3. Heiluttele pulloa varovasti edestakaisin, jotta PBS huuhtelee koko pohjan. Vältä PBS:ä joutumasta pullon kaulaan -> kontaminaatoriski!
4. Lisää 3ml 1xtrypsiini/EDTA-liuosta pullon pohjalle ja heiluta pulloa varovasti. Varmista, että trypsiini leviää koko pohjan kattavasti.
5. Laita pullo +37°C:n inkubaattorikaappiin. Tarkastele pullon pohjaa tasaisin väliajoin. HUOM! Solut eivät saa olla liian kauan trypsiinissä, max. 5-10 min riippuen solulinjasta! Jos eivät irtoa -> kaavi solut irti!
6. Kun solut ovat selkeästi irronneet, huuhtelee pullon pohja lisäämällä pulloon 7ml mediumia. Huuhtelee pohja useaan kertaan ennen kuin keräät nesteen 20ml:n falcon-putkeen.
7. Sentrifugoi 1000rpm x 5min, +20°C.
8. Ime trypsiini/medium liuos pois pipetillä. Varo pohjalla olevaa solupellettiä.
9. Irrota solut putken pohjasta vetämällä putki muutama kertaa laminaarikaapin ritilän yli.
10. Lisää tarvittava määrä mediumia (esim. 3 uutta pulloa -> 3ml mediumia, 1ml/pullo)
11. Lisää uusiin, asianmukaisesti merkattuihin pulloihin 1ml solususpensiota/pullo.
12. Lisää 9ml mediumia, tarkista että medium leviää pullon pohjalle, vältä pullon kaulaa.
13. Laita pullot +37°C inkubaatiokaappiin.

HUOM! Solususpension määrä saattaa vaihdella halutun solumäärän mukaan!

Liite 4. Solulaskut hypoksiakoetta varten

8.2.2016

10 cm² maljoille, 1,5x10⁶ solua/malja.

UT-SCC-8:

Pullo 1: Kolmesta neliöstä laskettu solut, siitä keskiarvo: $(43+60+43)/3=48,7$. Arvo kerrottiin 10 000 = soluja 4,87x10⁵ s/ml.

Joten maljalle pipetoitiin $(1,5x10^6)/(4,87x10^5)$ -> solususpensiota n. 3,1 ml, ja maljalle mediumia niin, että lopputilavuus 10 ml, eli tässä tapauksessa 6,9 ml.

Pullo 2: Kolmesta neliöstä laskettu solut, siitä keskiarvo: $(43+54+62)/3=53$. Soluja mil-lissä 5,3x10⁵ s/ml. Maljalle pipetoitiin $(1,5x10^6)/(5,3x10^5)$ -> solususpensiota n. 2,8 ml + 7,2 ml medium.

Pullo 3: Tässä pullossa neljä ruutua laskettu, koska tullut melko isoja eroja solumää-rissä/ruutu: $(48+63+32+60)/4=50,75$. Soluja siis 5,1x10⁵ s/ml. Maljalle pipetoi-tiin $(1,5x10^6)/(5,1x10^5)$ -> solususpensiota n. 2,9 ml + 7,1 ml mediumia.

Kaikki seuraavat laskut toteutettiin samalla tavalla kuin yllä.

FaDu:

Pullo 1: Soluja $(90+83+93)/3=8,87x10^5$ s/ml. Maljalle -> solususpensiota n. 1,1 ml + 8,9 ml mediumia.

UT-SCC-74A:

Pullo 1: Soluja $(90+83+93)/3=8,87x10^5$ s/ml. Maljalle -> solususpensiota n. 1,7 ml + 8,3 ml mediumia.

Pullo 2: Soluja $(96+84+82)/3=8,73x10^5$ s/ml. Maljalle -> solususpensiota n. 1,7 ml + 8,3 ml mediumia.

10.2.2016

FaDu:

Pullo 1: Soluja $(76+96+73)/3=8,17x10^5$ s/ml. Maljalle -> solususpensiota n. 1,8 ml + 8,2 ml mediumia.

UT-SCC-74A:

Pullo 1: Soluja $(25+29+25)/3=2,63x10^5$ s/ml. Maljalle -> solususpensiota n. 5,7 ml + 4,3 ml mediumia.

Pullo 2: Soluja $(18+23+24)/3=2,17 \times 10^5$ s/ml. Maljalle -> solususpensiota n. 6,9 ml + 3,1 ml mediumia.

Pullo 3: Soluja $(22+24+24)/3=2,33 \times 10^5$ s/ml. Maljalle -> solususpensiota n. 6,4 ml + 4,6 ml mediumia.

UT-SCC-8:

Pullo 1: Soluja $(103+98+76)/3=9,1 \times 10^5$ s/ml. Maljalle -> solususpensiota n. 1,6 ml + 8,4 ml mediumia.

15.2.2016

UT-SCC-74A:

Pullo 1: Soluja $(70+88+90+80)/4=8,2 \times 10^5$ s/ml. Maljalle -> solususpensiota n. 1,8 ml + 8,2 ml mediumia.

Pullo 2: Soluja $(79+96+71)/3=8,2 \times 10^5$ s/ml. Maljalle -> solususpensiota 1,8 ml + 8,2 ml mediumia.

FaDu:

Pullo 1: Soluja $(96+114+100)/3=1,03 \times 10^6$ s/ml. Maljalle -> solususpensiota n. 1,5 ml + 8,5 ml mediumia.

UT-SCC-8:

Pullo 1: Soluja $(82+86+61)/3=7,63 \times 10^5$ s/ml. Maljalle -> solususpensiota n. 2 ml + 8 ml mediumia.

Pullo 2: Soluja $(42+52+49)/3=4,77 \times 10^5$ s/ml. Maljalle -> solususpensiota n. 3,1 ml + 6,9 ml mediumia.

Liite 5. Solujen lyysaus hypoksiakammiossa

Ota mukaan:

- riittävästi solulastoja (yksi lasta/malja + varalastoja)
- 2xtrypsiini/EDTA liuos (n. 1,5 ml /malja)
- jäähaude
- riittävästi putkia (putki/malja)

1. Poista medium kallistamalla maljaa. Älä koske maljan pohjaan.
2. Lisää 2xtrypsiini/EDTA liuos. Kallistele maljaa niin, että trypsiini leviää koko pohjan alalle.
3. Tarkista maljan pohjaa tarkkailemalla, milloin solut irtoavat.
4. Solujen irrottua, kaavi loput solut irti solulastalla.
5. Pipetoi solususpensio putkeen, laita putki jäähauteeseen.
6. Toista.

Liite 6. NE-PER tuma- ja sytoplasmafraktion työohje

1. Pidä näytteet ja reagenssit jäähäuteessa.
2. Sentrifugoi lyysatut näytteet jäähdytetyssä mikrosentrifugissa 500xg viiden minuutin ajan.
3. Poista trypsiini pipetoimalla ja pese solut PBS:llä.
4. Sentrifugoi 500xg 3 minuutin ajan.
5. Poista PBS, jättäen solupelletin mahdollisimman kuivaksi.
6. Lisää kylmää CER I –reagenssia 100 µl.
7. Vorteksoi putki vähintään 15 sekunnin ajan. Aseta putki jäähäuteeseen inkuboitumaan 15 minuutiksi.
8. Lisää kylmää CER II –reagenssia 5,5 µl.
9. Vorteksoi 5 sekunnin ajan ja aseta jäähäuteeseen minuutiksi.
10. Vorteksoi 5 sekunnin ajan ja aseta sentrifugiin seitsemäksi minuutiksi täydellä teholla (13 200rpm).
11. Poista sentrifugoinnin jälkeen sytoplasmafraktio ja säilytä -80°C pakkasessa.
12. Pese solut PBS:llä, sentrifugoi täydellä teholla 3 minuuttia.
13. Poista PBS ja lisää kylmää CER –reagenssia 50 µl.
14. Vorteksoi vähintään 15 sekunnin ajan. Aseta jäähäuteeseen. Vorteksoi vähintään 15 sekunnin ajan joka 10 minuutti 40 minuutin ajan.
15. Sentrifugoi täydellä teholla 10 minuutin ajan.
16. Poista sentrifugoinnin jälkeen tumafraktio ja säilytä -80°C pakkasessa.

LIITE 7. Elektroblottauskasetin kokoaminen

Tarvikkeet

- sieni x 2
- whatmanpaperi x 2
- membraani
- geeli
- kasetti
- blottauspuskuri

1. Aseta membraani, sienet ja whatmanpaperi blottauspuskuriin liikoamaan ennen sandwichin rakentamista.
2. Irrota geeli lasilta.
3. Kokoja kasetti seuraavasti: sieni -> whatmanpaperi -> filtteri -> geeli -> whatmanpaperi -> sieni. Aseta sandwich kasettiin.
4. Aseta kasetti siirtokammiotelineeseen. Kasetin musta puoli telineen mustaa puolta vasten.
5. Lisää siirtokammiotelineen pohjalle magneetti. Aseta teline jääastiaan.
6. Aseta jääastia magneettisekoittajan päälle.
7. Kytke siirtolaitteeseen teho 100V. Anna olla yhden tunnin ajan.
8. Kytke virta pois päältä ja pura siirtolaite ja elektroblottauskasetti.