

Topias Kiiskinen

# Gremlinin vasta-aineiden tuotto ja karakterisointi

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Insinöörityö

28.11.2016

Tekijä Otsikko	Topias Kiiskinen Gremlinin vasta-aineiden tuotto ja karakterisointi
Sivumäärä Aika	24 sivua 28.11.2016
Tutkinto	Insinööri (AMK)
Koulutusohjelma	Bio- ja elintarviketekniikka
Ohjaajat	Dosentti Katri Koli Lehtori Tiina Soininen
<p>Keuhkofibroosi ja mesoteliooma ovat sairauksia, joilla on huono ennuste eikä tehokasta hoitoa. Keuhkofibroosissa keuhkot hiljalleen arpeutuvat, mikä johtaa hapenottokyvyn heikkenemiseen. Elinikäennuste on yleensä noin 3–5 vuotta. Mesoteliooma on enimmäkseen keuhkopussissa esiintyvä aggressiivinen syöpä, jota esiintyy eniten asbestialistuksen seurauksena. Sen keskimääräinen elinikäennuste on 1–2 vuotta.</p> <p>BMP-kasvutekijöiden aktiivisuuden häiriöitä on todettu esiintyvän molempien sairauksien yhteydessä. Yhdeksi syyksi näihin häiriöihin on todettu BMP-antagonisti Gremlinin liiallinen esiintyminen. Normaalisti toimiessaan BMP ehkäisee useiden sairauksien syntyä sekä tasapainottaa TGF-<math>\beta</math>-kasvutekijöiden esiintymistä. Matalan BMP-aktiivisuuden yhteydessä TGF-<math>\beta</math>-aktiivisuus on yleensä huomattavasti koholla. Liiallinen aktiivisuus estää hyvänlaatuisten solujen kasvua, ja syöpäsolut voivat menettää herkkyytensä TGF-<math>\beta</math>:lle.</p> <p>Työn tavoitteena oli löytää potentiaalisia vasta-aineita, jotka estäisivät Gremlinin toiminnan ja näin palauttaisivat BMP:n aktiivisuuden normaalille tasolle. BMP-aktiivisuuden palauttaminen saattaisi toimia hoitokeinona mesotelioomalle ja keuhkofibroosille.</p> <p>Vasta-aineet kasvatettiin esiseulotuissa scFv-AP-vasta-aineita tuottavista <i>Escherichia coli</i>-bakteereista ja puhdistettiin Ni-NTA-kolonneilla. Puhdistuksen onnistumista arvioitiin western blot -menetelmällä, sekä vasta-aineiden pitoisuudet määritettiin myöhempiä kokeita varten. Vasta-aineiden kykyä sitoa Greliniä ja niiden spesifisyyttä testattiin suorilla ja sandwich ELISA-testeillä. Sitoutumista kokeiltiin kahteen eri Greliniin, Gremlin-1:een ja Gremlin-2:een. Kykyä estää Gremlinin toimintaa testattiin dual lusiferaasi -reportterikoikeilla. Kokeissa testattiin vain vasta-aineiden Gremlin-1:n estokykyä, koska ELISA-kokeissa todettiin, että vasta-aineet eivät sitoutuneet mainittavasti Gremlin-2:een.</p> <p>ELISA-kokeissa useamman testatun vasta-aineen todettiin sitoutuvan Gremlin-1:een. Dual lusiferaasi-kokeissa ainoastaan yksi näyte osoitti estävänsä Gremlinin toimintaa hyvin kaikilla testatuilla pitoisuuksilla. Näin ollen voidaan todeta kokeiden avulla löytyneen ainakin yksi potentiaalinen Gremlin-1 vasta-aine, jota voidaan lähteä tutkimaan tarkemmin.</p>	
Avainsanat	BMP, TGF- $\beta$ , Gremlin, keuhkofibroosi, mesoteliooma

Author Title	Topias Kiiskinen Production and characterization of Gremlin antibodies
Number of Pages Date	24 pages 28 November 2016
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Biotechnology and Food Engineering
Instructors	Katri Koli Adjunct professor Tiina Soininen Senior lecturer
<p>Pulmonary fibrosis and mesothelioma are conditions with a poor prognosis and no effective treatment. In pulmonary fibrosis lung tissue slowly converts into scar tissue, resulting in impaired oxygen uptake. The prognosis is usually 3–5 years. Mesothelioma is an aggressive cancer found most frequently in pleura and is usually related to asbestos exposure. Average prognosis for mesothelioma is 1–2 years.</p> <p>Interference in the activity of BMP growth factors has been found in both conditions. Overexpression of BMP antagonist Gremlin has been determined to be one reason for irregularities in BMP expression. When working normally, BMP inhibits the development of many diseases and balances the expression of TGF-<math>\beta</math>. Low BMP activity is often related to significant increase in TGF-<math>\beta</math> activity. Excessive TGF-<math>\beta</math> activity inhibits the growth of benign cells and make cancer cells resistant to growth inhibition.</p> <p>The purpose of this thesis was to find potential antibodies that would prevent Gremlin from inhibiting BMP and normalize its activity. Restoring the BMP activity to normal may work as a treatment for mesothelioma and pulmonary fibrosis.</p> <p>Antibodies were grown in pre-screened scFv-AP-antibody producing <i>Escherichia coli</i>-bacteria and purified with Ni-NTA-columns. The success of the purification was assessed with western blotting, and the concentrations of the antibodies were also measured for later experiments. The binding capacity of antibodies and their specificity for Gremlin was tested with direct and sandwich ELISA-tests. The binding was tested with two different Gremlins, Gremlin-1 and Gremlin-2. The ability to inhibit Gremlin was tested with dual luciferase-tests. In these tests, only Gremlin-1 was tested due to the antibodies' low specificity to Gremlin-2 in the ELISA-tests.</p> <p>In the ELISA-tests, several antibodies were found to bind Gremlin-1. In dual luciferase tests, only one of the samples was found to inhibit Gremlin-1 on all tested concentrations. Therefore, it can be concluded that at least one promising Gremlin-1 antibody was found to be suitable for further analysis.</p>	
Keywords	BMP, TGF- $\beta$ , Gremlin, pulmonary fibrosis, mesothelioma

# Sisällys

## Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Taustaa	1
2.1	Keuhkofibroosi ja mesoteliooma	1
2.2	TGF- $\beta$ -kasvutekijäperhe	2
2.3	TGF- $\beta$ -kasvutekijät	3
2.4	BMP ja Gremlin	3
2.5	Lähtökohdat tutkimukselle	4
2.6	Menetelmät	5
3	Materiaalit ja menetelmät	6
3.1	Vasta-aineiden tuotto	7
3.2	Vasta-aineiden puhdistus	8
3.3	Western blot ja dialyysi	9
3.4	Vasta-aineiden testaus	10
3.4.1	Proteiinipitoisuuden määrittäminen	10
3.4.2	Sandwich ELISA	10
3.4.3	Suora ELISA	11
3.5	Reportterikokeet	12
3.5.1	CHO-solut	12
3.5.2	Solujen jako ja transfektio	12
3.5.3	Solujen stimulointi	12
3.5.4	Dual Lusiferaasi -mittaus	13
4	Tulokset	13
4.1	Puhdistus	13
4.1.1	Western blot	13
4.1.2	Proteiinipitoisuus	15
4.2	ELISA	16
4.3	Reportterikokeet	18
5	Yhteenveto	21
	Lähteet	23

## Lyhenteet

BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein.</i> Luun morfogeneettinen proteiini
BSA	<i>Bovine Serum Albumin.</i> Naudan seerumin albumiini
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary.</i> Kiinankääpiöhamsterin munasarja
FBS	<i>Fetal Bovine Serum.</i> Naudan alkion seerumi
IPTG	<i>Isopropyl <math>\beta</math>-D-1-thiogalactopyranoside.</i> Isopropyyli $\beta$ -D-1-tiogalaktopyranosidi
Ni-NTA	<i>Nickel charged Nitrilotriaceticacid.</i> Nikkelivarattu nitrilotrietikkahappo
OD600	<i>Optical Density at wavelength 600 nm.</i> Optinen tiheys aallonpituudella 600 nm
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline.</i> Fosfaatti-puskuroitu suolaliuos
pNPP	<i>P-nitrophenyl phosphate.</i> P-nitrofenyylifosfaatti
ScFv-AP	<i>Single Chain Variable Fragment with Alkaline Phosphatase.</i> Yksiketjuinen muuntuva fragmentti alkaalisella fosfataasilla
TBS	<i>Tris-Buffered Saline.</i> Tris-puskuroitu suolaliuos
TGF- $\beta$	<i>Transforming Growth Factor <math>\beta</math>.</i> Muuntuva kasvutekijä $\beta$
TK	<i>Thymidine Kinase.</i> Tymiiniikinaasi

## 1 Johdanto

Keuhkofibroosi ja mesoteliooma ovat sairauksia, joilla on huono ennuste. Nykyiset hoitokeinot eivät ole erityisen tehokkaita, minkä takia sairauksia on hyvin vaikea parantaa. [1; 2.] Häiriöiden BMP(Bone Morphogenetic protein) -kasvutekijöiden aktiivisuudessa on todettu olevan osallisena keuhkofibroosin ja mesoteliooman etenemisessä. Gremlinit ovat BMP-antagonistiproteiineja, jotka säätelevät BMP:n aktiivisuutta. Gremlinin liiallinen määrä estää BMP:n normaalin toiminnan. [3.] Tämän toiminnan palauttaminen saattaisi auttaa sairauksien hoidossa.

Työn pyrkimyksenä oli puhdistaa ja karakterisoida potentiaalisia vasta-aineita Gremlinille. Tavoitteena oli löytää vasta-aineita, joita voitaisiin myöhemmissä kokeissa tutkia tarkemmin ja selvittää niiden mahdolliset lääketieteelliset sovellukset.

## 2 Taustaa

### 2.1 Keuhkofibroosi ja mesoteliooma

Keuhkofibroosi on sairaus, jossa normaali keuhkokudos hiljalleen arpeutuu eli korvaantuu sidekudoksella. Tästä seuraa ärsytystä, mikä ilmenee kuivana ja pitkäaikaisena yskänä. Sidekudostuminen heikentää keuhkojen kykyä hapettaa verta, mikä aiheuttaa hiljalleen pahenevaa hengenahdistusta. Keuhkofibroosia esiintyy sekä itsesyntyisenä että ulkoisten tekijöiden, kuten kivipölyn tai asbestin, aiheuttamana. Sairautta esiintyy Suomessa kahdella ihmisellä kymmentä tuhatta henkilöä kohti. [2.]

Itsesyntyisen keuhkofibroosin eli idiopaattisen keuhkofibroosin alkusyytä ei tunneta. Sillä tosin vaikuttaa olevan jokin yhteys muihin sidekudossairauksiin, koska sairaus liittyy tavallista useammin esimerkiksi nivelreumaan. [2.] Sairautta voidaan hoitaa lääkkeillä, mutta tällöin sairauden etenemistä lähinnä hidastetaan. Keuhkofibroosia täysin parantavaa lääkehoitoa ei vielä toistaiseksi ole löydetty. Lääkehoito tehoaa vain osaan potilaista. Joissain tapauksissa keuhkonsiirto on ainoa mahdollinen hoitokeino. Keskimääräinen elinikäennuste keuhkofibroosille on 3–5 vuotta, tosin eteneminen voi olla myös huomattavasti hitaampaa. Joissain tapauksissa voi myös esiintyä äkillisiä pahenemisasiähteitä. [1.]

Maligni eli huononlaatuinen mesoteliooma on melko harvinainen ja hyvin aggressiivinen syöpä, joka esiintyy tavallisimmin keuhkopussissa [4]. Keuhkopussi on keuhkoja verhoava kalvo, joka muodostaa sydämen ja keuhkojen toimintaliikkeen sallivan ontelon. Mesoteliooma alkaa yleisimmin keuhkopussin epiteelisoluista. [5.] Mesoteliooma liittyy usein asbestialtistukseen, ja noin 80 %:ssa tapauksista taustalla tiedetään olevan altistuminen asbestille. Lopuissa tapauksista ei ole tiedossa selviä altistumisen lähteitä. Tätä ilmiötä voidaan osittain selittää todetulla geneettisellä alttiudella, mutta taudin alkamiseen liittyy vielä tuntemattomia tekijöitä. Voimakkaasti asbestille altistuneista valtaosalle ei kuitenkaan kehity mesotelioomaa. [6.]

Mesotelioomaan ei ole tiedossa tehokasta hoitoa. Tavallisimmat hoidot, kuten solunsalpaajat, sädehoito ja kirurgiset toimenpiteet, ovat teholtaan huonoja. [7.] Osaltaan juuri tästä syystä mesoteliooman ennuste on hyvin heikko. Tavallisesti maligni mesoteliooma johtaa kuolemaan 1–2 vuoden sisällä diagnoosista [8].

Molempien sairauksien yhteydessä on todettu esiintyvän TGF- $\beta$ -kasvutekijä (Transforming Growth Factor- $\beta$ ) yliekspressiota sekä madaltunutta BMP-aktiivisuutta. Mesotelioomassa TGF- $\beta$ :n liiallinen esiintymisen on huomattu toimivan kasvainten kasvua edistävänä tekijänä. Joitakin TGF- $\beta$ 1:n muutoksia on yhdistetty kasvaneeseen keuhkofibroosin riskiin. BMP-häiriöiden on todettu olevan vahvasti läsnä fibroottisissa sairauksissa, kuten keuhkofibroosissa. BMP:n toiminnasta mesotelioomassa on huomattavasti vähemmän tietoa, mutta esimerkiksi BMP toimintaa estävän Gremlin-1:n yliekspressiota on todettu. [3.]

## 2.2 TGF- $\beta$ -kasvutekijäperhe

TGF- $\beta$  kasvutekijäperheseen kuuluu ihmisellä yli 30 jäsentä. Perheeseen kuuluvat TGF- $\beta$ :t, aktiviinit, nodal, BMP:t, GDF-kasvueroilaistumistekijät (Growth differentiation factor) ja anti-Müllerian-hormoni. Näiden tekijöiden ilmentyminen alkaa yksilön kehityksestä ja jatkuu aikuisiälle. Aikuisella yksilöllä esiintyminen on vähäisempää ja ilmenee lähinnä ylläpitävässä roolissa. [9.] Solutasolla perheen jäsenet kontrolloivat perustavaa laatua olevia prosesseja. Tällaisia ovat muun muassa solujen jakautuminen, erilaistuminen, solukuolema, adheesio, migraatio, sekä tukirangan muodostuminen. [3.] Näiden kasvutekijöiden ollessa keskeisessä roolissa normaalin fysiologian suhteen pidetään niiden poikkeavaa signalointia vahvasti osallisena monissa sairauksissa [9].

### 2.3 TGF- $\beta$ -kasvutekijät

TGF- $\beta$ -kasvutekijöitä on kolmea isomuotoa, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 ja TGF- $\beta$ 3. Nämä isomuodot ovat rakenteeltaan ja toiminnaltaan hyvin samankaltaisia. [10.] TGF- $\beta$ :t osallistuvat moniin toimintoihin normaalissa fysiologiassa. Yleisesti ne mukauttavat tulehdussolujen toimintaa, inhiboivat solujen kasvua, säätelevät erilaistumista ja soluväliaineen muodostusta. TGF- $\beta$ -aktiivisuuden täytyy kuitenkin pysyä tarkasti tasapainossa. [3.] TGF- $\beta$ -proteiinien yli-ilmentyminen on yleinen ilmiö syöpäsoluissa ja lupaa yleensä huonoa ennustetta [10]. Tämä johtuu osittain siitä, että TGF- $\beta$  estää hyvänlaatuisien solujen kasvua ja syövän edetessä syöpäsolut menettävät kykynsä reagoida TGF- $\beta$ :jen kasvua rajoittaviin signaaleihin. TGF- $\beta$  voi myös altistaa syöpäsolut muutoksille, jotka edesauttavat syövän leviämistä etäpesäkkeiden välityksellä. Tosin TGF- $\beta$ :jen rooli syövässä ei ole täysin yksiselitteinen, sillä syöpien alkuvaiheessa ne estävät kasvainten kasvua, solujen kasvua estävien ominaisuuksien ansiosta. [11.]

### 2.4 BMP ja Gremlin

BMP:t ovat TGF- $\beta$  kasvutekijäperheeseen kuuluvia kasvutekijöitä, jotka ovat merkittävässä osassa yksilön kehityksessä ja ylläpidossa. BMP:itä on tunnistettu useita, ja ne toimivat eri vaiheissa yksilönkehitystä. Nimestään huolimatta eri BMP:iden kyky edistää luuston kasvua vaihtelee merkittävästi. BMP:t osallistuvat esimerkiksi solujen jakautumiseen, apoptoosiin ja erilaistumiseen. Häiriöt niiden toiminnassa voivat aiheuttaa monia sairauksia. Sairauksiin voi liittyä BMP antagonistien ylituotantoa, liiallista aktiivisuutta tai signaalireittien komponenttien mutaatioita. On myös todettu, että BMP-reitin häiriöt ovat osallisena fibroottisissa sairauksissa. Tällaisissa tapauksissa BMP-ekspressio on usein matalaa ja TGF- $\beta$ -ekspressio korkea. [3.] Hiirissä BMP-7-aktiivisuuden palauttaminen on vähentänyt fibroosia [12].

Greliniä esiintyy kahdessa muodossa, Gremlin-1:nä ja Gremlin-2:na [3]. Tarkastelu kohdistuu tässä työssä lähinnä Gremlin-1:een, joka on kahdesta Gremlinistä tutkitumpi. Gremlin-1 on solujen ulkopuolelle eritettävä proteiini, joka toimii antagonistina usealle BMP:lle. [13]. Gremlin-1 sitoo ja estää BMP:iden -2, -4 ja -7 toimintaa. Nämä BMP:t ovat kaikki osteogeenisiä eli luunmuodostuksen aloittamiseen kykeneviä. [3; 14.] Kaikkein suurin merkitys Gremlin-1:llä on yksilön kehityksen aikana. Gremlin-1:n BMP-antago-



nismi säätelee raajojen, munuaisten sekä keuhkojen kehitystä. Lisäksi Gremlin-1 on tärkeässä roolissa luuston kehityksessä sikiöaikana ja sen syntymän jälkeisessä ylläpidossa. [3.]

Aikuisen yksilön kudoksissa Gremlin-1:n esiintyminen on varsin vähäistä. Terveissä aikuiskudoksissa on havaittu jonkin tasoista ekspressiota esimerkiksi munuaisissa, ihossa ja luuytimessä. [14.] Gremlin-1:n ja muiden BMP-antagonistien poikkeavan esiintymisen on havaittu vaikuttavan monien sairauksien ja häiriöiden syntyyn [3]. Gremlin-1:n yliekspressiota esiintyy esimerkiksi idiopaattisen keuhkofibroosin yhteydessä, jossa Gremlin-1 heikentää huomattavasti BMP-4:n aktiivisuutta. Juuri keuhkofibroosin yhteydessä BMP-4:n on todettu suojaavan kudoksia fibroosilta. [15.] Samankaltaista suojaavaa vaikutusta on todettu myös mesoteliooman yhteydessä [16].

## 2.5 Lähtökohdat tutkimukselle

On todettu, että BMP-aktiivisuudet keuhkofibroosissa ja mesotelioomassa ovat matalia, sekä Gremlin-1 on molemmissa tapauksissa yliekspressoitu. Tämän epätasapainon korjaaminen saattaisi toimia hoitokeinona näille sairauksille, joille ei tällä hetkellä ole tehokasta hoitoa. Gremlin-1:n toiminnan estäminen ja siten BMP-aktiivisuuden palauttaminen voisi toimia tällaisena hoitona. Yksi tapa olisi Gremlin-1 spesifisen vasta-aineen löytäminen. Vasta-aine estäisi Gremlin-1:n sitoutumisen BMP:hen, pitäen siten yllä BMP:n normaalia aktiivisuutta. Synteettisen vasta-ainekirjaston käyttö mahdollistaa soveltuvien vasta-aineiden seulomisen tehokkaasti.

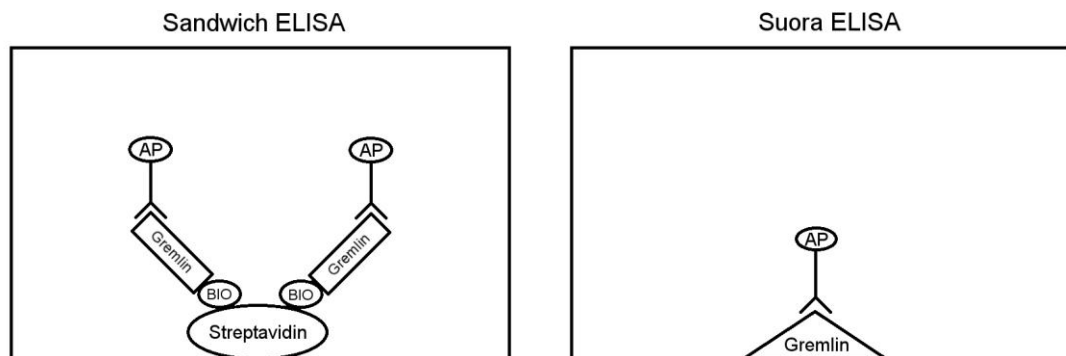
Soveltuvan vasta-aineen löytäminen luonnollisesti esiintyvien joukosta voi olla erittäin aikaa vievää ja haastavaa. Synteettinen vasta-ainekirjasto mahdollistaa huomattavasti laajemmat mahdollisuudet potentiaalisten vasta-aineiden löytämiselle. Tässä työssä testattiin vasta-aineita, jotka oli esiseulottu tällaisesta synteettisestä kirjastosta. Seulotut vasta-aineet olivat muuttuvien osien fuusiovasta-aineita (scFv-AP, Single Chain Variable Fragment with Alkaline Phosphatase). Nämä vasta-aineet koostuvat kahdesta peräkkäin liitetystä vasta-ainefragmentista, raskaasta ja kevyestä muuntuvasta osasta.

## 2.6 Menetelmät

Vasta-aineiden ominaisuuksien arviointi perustuu kahteen erilaiseen ELISA-testiin, sekä dual lusiferaasi-reportterikokeisiin.

ELISA-kokeilla haluttuun testata vasta-aineiden kykyä sitoutua Gremlin-1:een ja Gremlin-2:een. Suorassa ELISA:ssa keskitytään pelkästään Gremlin-1 sitoutumiskyvyn tutkimiseen. ELISA-kokeiden perusteella ei pystytä arvioimaan vasta-aineiden kykyä estää Gremlinin toimintaa, ainoastaan niiden sitoutumiskykyä.

Sandwich ELISA:ssa toisen vasta-aineen ja antigeeniä sitovan proteiinin käyttäminen tarjoaa tutkittaville vasta-aineille enemmän mahdollisuuksia sitoutua näytekuppiin kuin suorassa ELISA:ssa. Tästä seuraa signaalivahvistusta, jonka takia sandwich ELISA antaa yleisesti huomattavasti korkeampia absorbanssi-arvoja. Juuri signaalivahvistuksen takia sandwich ELISA on herkempi kuin suora ELISA. Kuvassa 1. on esitetty kuvaus suorasta ja sandwich ELISA:sta.



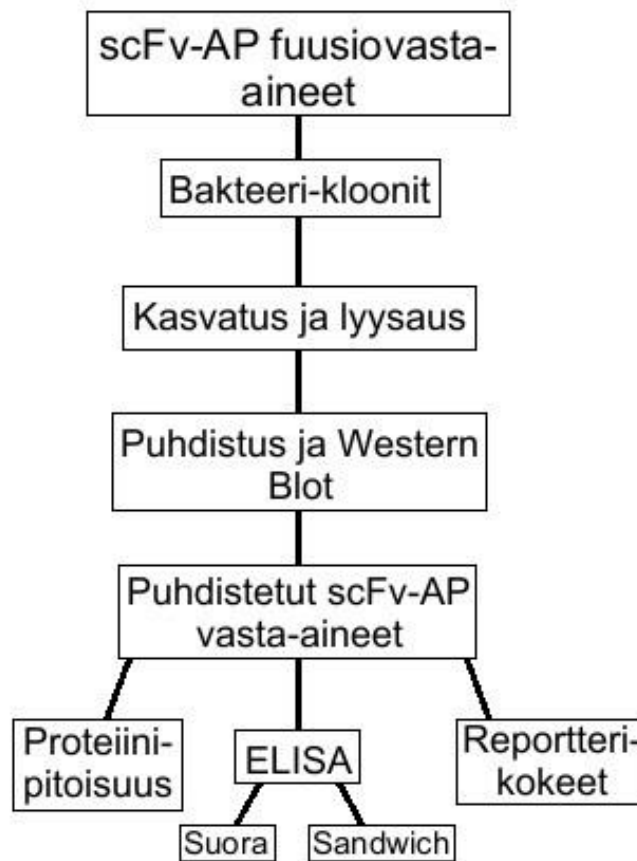
Kuva 1. Suora ja sandwich ELISA. Sandwich ELISA:ssa pohjaan kiinnitettyyn streptavidiiniin sitoutuu biotinyloitu Gremlin, johon vuorostaan sitoutuu tutkittava scFv-AP-vasta-aine. Suorassa ELISA:ssa scFv-AP-vasta-aine sitoutuu suoraan pohjaa kiinnitettyyn Gremliniin.

Vasta-aineiden varsinaista kykyä estää Gremlinin toimintaa arvioidaan Dual lusiferaasi-reportterikokeilla. Näissä kokeissa kiinanhamsterin munasarjasoluihin transfektoidaan (Bre)2-Luc-reportteriplasmidi, joka saa solut tuottamaan Firefly-lusiferaasia riippuen näytteen BMP-aktiivisuudesta. Firefly-lusiferaasin määrä on verrannollinen näytteen BMP-aktiivisuuteen. Lisäksi soluihin transfektoidaan TK-Renilla reportteriplasmidi, joka tuottaa Renilla-lusiferaasia soluissa esiintyvän thymidiinikinaasin läsnäollessa. Thymidiinikinaasia voidaan olettaa esiintyvän kaikissa soluissa, joten Renilla-lusiferaasin avulla

voidaan tasata muun muassa solumääristä johtuvat erot näytteiden välillä. Tämä tapahtuu vertailemalla näytteiden Firefly-lusiferaasin ja Renilla-lusiferaasin suhteita. Näin näytteistä saadaan vertailukelpoisia ja enemmän soluja sisältävät näytteet eivät anna automaattisesti isompia arvoja.

### 3 Materiaalit ja menetelmät

Potentiaalisia Gremlin-1-vasta-aineita tuotettiin valmiiksi esisulotuissa *Escherichia coli* -bakteereissa. Vasta-aineet eristettiin, puhdistettiin, sekä niiden kykyä sitoutua Gremliniin ja estää sen toimintaa arvioitiin ELISA-testeillä sekä lusiferaasi-reportterikokeilla. Työn tarkempi toteutusjärjestys on esitetty kuvassa 2.



Kuva 2. Virtauskaavio työn toteutusjärjestyksestä.

Näytteitä käsiteltiin numerolla ja koodinimellä, jotka olivat peräisin näytteiden esiseulonasta. Näytteiden numerointi ei ole järjestyksessä, koska esiseulonasta valittiin vain

potentiaalisen oloiset näytteet. Käytännön syistä näytteet käsiteltiin kahdessa koesarjassa. Taulukossa 1. on esitettyinä näytteiden numero ja koodinimi sekä koesarjat.

Taulukko 1. Näytteiden numerot ja koodinimet.

Koesarja 1		Koesarja 2	
Numero	Koodi	Numero	Koodi
3.	EB44-A3-A11	36.	EB46-D3o-A03
5.	EB44-A3-B09	40.	EB46-D3-B11
6.	EB44-A3-C01	43.	EB46-D3-C09
7.	EB44-A3-C05	49.	EB46-D3o-F05
16.	EB44-A3o-F03	51.	EB46-D3o-F11
17.	EB44-A3o-F12	57.	EB46-D3o-G12
26.	EB45-B3-C12	58.	EB46-D3o-H01
33.	EB45-B3o-G09	59.	EB46-D3o-H03

### 3.1 Vasta-aineiden tuotto

Bakteerit siirrostettiin -70 °C:ssa säilytetystä glyserolistokista LA (Lysogeny argar) -maljoille, joissa oli 0,5 % glukoosia, 100 µg/ml ampicilliiniä ja 10 µg/ml tetrasykliiniä. Maljoja kasvatettiin yön yli 30 °C:ssa ja seuraavana päivänä, kunnes pesäkkeet olivat sopivan kokoisia siirrostettaviksi.

Esikasvatusta varten maljoilta siirrostettiin pesäke 5 ml SB (Super Broth) -mediumia, jossa oli 1,0 % glukoosia ja 100 µg/ml ampicilliiniä. Bakteerit kasvatettiin ravistelussa yön yli 30 °C:ssa ja 300 rpm:n kierrosnopeudella.

Pääkasvatukset siirrostettiin seuraavana aamuna lisäämällä esikasvatusta siten, että OD600 (Optical Density 600 nm) -arvo pääkasvatuksen alkaessa oli 0,0125. Pääkasvatukset tehtiin 20 ml:ssa SB-mediumia, jossa oli 0,05 % glukoosia ja 100 µg/ml ampicilliiniä. Kasvatus ravistelussa (30 °C, 250 rpm), kunnes kasvatusten OD600 -arvo oli välillä 0,6–1,0. Tällöin scFv-AP-tuotto indusoitiin lisäämällä kasvatuksiin 20 µl 100 mM IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) -liuosta. Indusoimisen jälkeen bakteereja kasvatettiin yön yli (26 °C, 250 rpm). Indusoinnin jälkeinen kasvatus pyrittiin pitämään mahdollisimman lyhyenä sijoittamalla indusointi iltapäivään ja solujen kerääminen heti seuraavaan aamuun.

Seuraavana aamuna solut kerättiin sentrifugoimalla (3220xg, 4 °C) 40 minuuttia. Supernatantti poistettiin ja solut säilytettiin -20 °C:ssa puhdistukseen asti.

### 3.2 Vasta-aineiden puhdistus

Bakteereissa tuotetut scFv-vasta-aineet puhdistettiin Thermo Fischerin HisPur Ni-NTA (Nickel charged Nitrilotriaceticacid) purification 1ml resin -kitillä. Bakteerien joukkoon lisättiin 2 ml lyysipuskuria (PBS (Phosphate Buffered Saline), jossa oli 0,4 mg/ml Lysozymiä ja 10 mM MgCl<sub>2</sub>:ta). Bakteerit lyysattiin vuorotellen pakastamalla 20 minuuttia -70 °C:ssa ja lämmittämällä 10 minuuttia 40 °C:ssa. Pakastussulatussykli suoritettiin kolmesti. Lysaatti sentrifugoitiin (8200 x g, 45 minuuttia). Jatkettiin supernatantilla, josta kerättiin näyte western blottia varten. Lysaatin viskoosisuuden vähentämiseksi lyysipuskuuriin voidaan lisätä 40U/ml bentsonaasia. Tehdyissä puhdistuksissa bentsonaasia ei kuitenkaan käytetty.

Kolonneista valutettiin pois säilytysliuos ja tasapainotettiin lisäämällä 40 mM imidatsolia sisältävää PBS-puskuria, joka myös valutettiin pois. Supernatanttiin lisättiin 40 mM imidatsolia ja se siirrettiin kolonniin. Kolonni asetettiin keinusekoittajaan 30 minuutiksi huoneenlämpöön pyrkimyksenä saada histidiini-merkityt vasta-aineet kiinnittymään resiiniin. Kolonnin annettiin tasaantua hetken ja lysaatti valutettiin ulos. Läpivirtauksesta otettiin näyte western blottia varten.

Kolonni pestiin kolmesti 2 ml:lla 40 mM imidatsolia PBS-puskurissa. Kolonneista otettiin kolme eluutiota, lisäämällä 1 ml eluutiopuskuria, joka sisältää 500 mM imidatsolia PBS:ssä. Kerättiin kaikki kolme eluutiota talteen.

Loput kolonniin sitoutuneista proteiineista poistettiin lisäämällä 1 ml 800 mM imidatsolia sisältävää PBS-puskuria. Puskurin annettiin valua läpi ja siitä otettiin näyte western blottia varten.

### 3.3 Western blot ja dialyysi

Western blottauksen pyrkimyksenä oli määrittää, mitkä puhdistuksessa kerätyistä eluutioista sisälsivät eniten vasta-ainetta ja siten määrittää, mitkä näistä valitaan dialysoitaviksi. Analyysiin käytettiin puhdistuksessa kustakin puhdistusvaiheesta kerättyjä näytteitä (lysaatti, läpivaluma, eluutiot 1–3 ja loppueluutio).

Näytteet ajettiin ensin SDS-PAGE-geeliin redusoivissa olosuhteissa. Näytepuskurina käytettiin BioRad 4x Laemmli -puskuria, johon lisättiin 10 % 2-merkaptotetanolia. Näytepuskuriin lisättiin näytteet ja kuumennettiin 98 °C:ssa 2 minuuttia. Siirrettiin 15 µl näytteitä geeleihin. Ajot tehtiin BioRadin Mini-PROTEAN TGX 4–15 % -geeleille ja ajopuskurina käytettiin BioRadin Tris Glycine SDS -puskuria. Ajettiin 170 V:n jännitteellä noin 40 minuuttia.

Proteiinit siirrettiin geeliltä Bioradin Trans-Blot turbo -kalvoille BioRadin Trans-Blot turbo -laitteella. Näytteitä ajettiin 3 minuuttia, 2,5 ampeerin virralla. Kalvoille siirtyneet proteiinit värjättiin Ponceau-S-värillä siirtymisen varmentamiseksi. Epäspesifisen sitoutumisen estämiseksi kalvot blokattiin 5-prosenttisessä maidossa, laimennettuna 1x TBS-puskuriin (Tris-Buffered Saline), joka oli laimennettu 0,05 % Tween 20 -liuokseen. Inkuboitiin 1 tunti huoneenlämmössä, kevyessä sekoituksessa. Pestiin kahdesti 0,05 % Tween 20-TBS-liuoksella.

Primäärivasta-aineena käytettiin hiiressä tuotettua Tetra-His -vasta-ainetta 1:5000-laimennoksena, laimennettuna 5 % BSA (Bovine Serum Albumin)- 0,05 % Tween 20-TBS-liuokseen. Inkuboitiin tunnin ajan huoneenlämmössä, kevyessä sekoituksessa. Pestiin kahdesti 0,5 % Tween 20-TBS-liuoksessa, joista jälkimmäinen pesu oli 10 minuuttia sekoituksessa. Pestiin kerran 0,05 % Tween 20-TBS-liuoksessa, 10 minuuttia sekoituksessa.

Sekundäärivasta-aineena käytettiin Dakon Polyclonal Rabbit anti-mouse Immunoglobulins -vasta-ainetta, 1:10 000-laimennoksena 5 % BSA-0,05 % Tween 20-TBS-liuoksessa. Inkuboitiin 30 minuuttia huoneenlämmössä kevyessä sekoituksessa. Pestiin kolmesti 0,5 % Tween 20-TBS-liuoksessa, joista kaksi jälkimmäistä pesua olivat 10 minuuttia sekoituksessa. Pestiin kerran 0,05 % Tween 20-TBS-liuoksessa ja kerran PBS-liuoksessa, molemmat 10 minuuttia sekoituksessa.

Detektio tapahtui WesternBright Quantum Chemiluminescent HRP -reagenssilla. Kuvantaminen tehtiin Li-Cor Odyssey Fc -laitteella, jolla kuvattiin markkerit aallonpituudella 700 nm ja näytteet kemiluminesenssi-kanavalla. Molempien kanavien valotusaika oli 30 sekuntia.

Western blotin perusteella valittiin eluutiot dialysoitavaksi imidazolen poistamiseksi näytteistä. Dialyysimembraanina käytettiin SpectrumLabsin spectrapor I dialyysimembraania. Näytteet pipetoitiin kostutettuihin membraaneihin ja annettiin dialysoitua yön yli 4 °C kevyessä magneettisekoituksessa, kolminkertaisessa PBS-liuoksessa. Näytteet kerättiin seuraavana aamuna.

### 3.4 Vasta-aineiden testaus

Puhdistettuja vasta-aineita karakterisoitiin ELISA-testeillä ja CHO(Chinese Hamster Ovary) -reportterikokeilla. Lisäksi näitä kokeita varten määritettiin näytteiden proteiinipitoisuus.

#### 3.4.1 Proteiinipitoisuuden määrittäminen

Dialysoitujen näytteiden proteiinipitoisuus määritettiin Pierce BCA Protein Assay -kitillä. Näytteitä verrattiin BSA-standardien perusteella tehtyyn standardisuoraan. Standardilaimennoksina käytettiin 1000, 500, 125, 62,5 ja 31,25 µg/ml.

Standardeja ja näytteitä pipetoitiin 10 µl/kuoppa ja kaikkiin kuoppiin lisättiin 100 µl 1-kertaiseksi laimennettua kitin Working Reagenssia. Inkuboitiin 35–40 minuuttia 50 °C:ssa. Jäähdytettiin levy huoneenlämpöön ja mitattiin absorbanssi aallonpituudella 540 nm.

#### 3.4.2 Sandwich ELISA

Sandwich ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) tehtiin Kaivogenin biotinyloiduille Streptavidin microtitration plate -liuskoille. Kuopat esipestiin scFv-ALP ELISA Wash -puskurilla.

Lisättiin 100 µl, biotinyloitua ihmisen Gremlin 1:tä pitoisuudessa 400 ng/ml ja biotinyloitua ihmisen Gremlin 2:tä pitoisuudessa 800 ng/ml. Inkuboitiin rauhallisessa sekoituksessa 30 minuuttia huoneenlämmössä. Pestiin neljästi edellä mainitulla pesupuskurilla.

Kuoppiin lisättiin 80 µl scFv-ALP Screening Assay -puskuria sekä tutkittavia vasta-aineita siten, että kuopan vasta-ainepitoisuudeksi tuli 5 µg/ml. Inkuboitiin kevyessä sekoituksessa 1 tunti huoneenlämmössä. Pesu neljästi ELISA Wash -puskurilla.

Lisättiin 100 µl pNPP (p-nitrophenyl phosphate)-detektiopuskuria, jossa 1 mg/ml pNPP:tä. Inkuboitiin 1 tunti kevyessä sekoituksessa huoneenlämmössä. Mitattiin absorbanssi aallonpituudella 405 nm. Absorbanssi mitattiin myös 2 ja 3 tuntia aloituksesta, sekä seuraavana aamuna, noin 20 tuntia inkuboinnin aloittamisen jälkeen.

### 3.4.3 Suora ELISA

NUNC Maxisorp 96-kuoppalevyille kiinnitettiin PBS-liuokseen laimennettua ihmisen rekombinantti Gremlin 1:tä, 100 ng/kuoppa. Kiinnitys yön yli 4 °C:ssa.

Pestiin kuopat kahdesti 0,05 % Tween 20-PBS-pesupuskurilla. Kuopat blokattiin 120 µl:lla 5 % PBS-liuosta, joka oli laimennettu pesupuskuriin. Blokattiin 2 tuntia huoneenlämmössä, kevyessä sekoituksessa.

Pestiin kerran pesupuskurilla. Lisättiin tutkittavia vasta-aineita 500 ng/kuoppa, laimennettuna 1 % BSA-liuokseen, joka oli laimennettu 0,05 % Tween 20-PBS -pesupuskuriin. Kokonaistilavuus 100 µl/kuoppa. Inkubaatio 2 tuntia huoneenlämmössä.

Inkubaation jälkeen kuopat pestiin kolmesti pesupuskurilla, joista kaksi jälkimmäistä 5 minuuttia sekoituksessa. Pesu kerran 1x PBS-liuoksella. Detektio pNPP-puskurilla, jossa oli 1mg/ml pNPP:tä. Detektio-liuosta lisättiin 100 µl per kaivo. Inkuboitiin valolta peitettyä yön yli. Näytteiden absorbanssit mitattiin aallonpituudella 405 nm seuraavana aamuna, noin 17 tunnin inkuboinnin jälkeen.



### 3.5 Reportterikokeet

#### 3.5.1 CHO-solut

Kaikki reportterikokeet tehtiin käyttäen ATCC:n (American Type Culture Collection) CCL-61 kiinankääpiöhamsterin munasarjasoluja, eli CHO-soluja. Kasvumediumina käytettiin Sigman Minimun Essential Medium Eagle -mediumia, johon lisättiin 10 % FBS:ää (Fetal Bovine Serum). Lisäksi mediumiin lisättiin Gibcon 100-kertaista liuosta siten, että loppuliseksi määriksi saatiin 100 yksikköä penisilliiniä, 100 µg streptomysiiniä ja 0,292 mg/ml L-glutamiinia. Soluja kasvatettiin 37 °C:ssa ja 5-prosentin hiilidioksidipitoisuudessa, ja jaettiin kasvunopeudesta riippuen 2–3 kertaa viikossa.

#### 3.5.2 Solujen jako ja transfektio

Reportterikokeita varten CHO-soluja jaettiin 96-kuoppalevylle 10 000 solua per kuoppa, 100 µl:aan kasvatusmediumia. Solut jaettiin transfektiota edeltävänä päivänä.

Transfektiota varten yhtä kuoppaa kohti käytettiin 0,3 µl Fugene HD Transfection reagenssia, sekä 0,01 µg pRL-TK (Thymidine Kinase) Renilla ja 0,05 µg (BRE) 2-luc -reportteriplasmideja. Reagensseista valmistettiin ”transfektio-mix” lisäämällä levylle tarvittavat määrät reagensseja 100 µl Sigman MegaCell RPMI-1640 mediumiin ja annettiin inkuboitua 15 minuuttia. Transfektio-mix täydennettiin solujen normaalilla kasvumediolla siten, että sitä riitti tarvittaviin kuoppiin 100 µl. Transfektion annettiin tapahtua yön yli.

#### 3.5.3 Solujen stimulointi

Transfektoituja soluja stimuloitiin vaihtelevilla pitoisuuksilla ja kombinaatioilla ihmisen rekombinantti BMP-2:ta ja ihmisen rekombinantti Gremlin-1:tä. BMP-2:n pituisuutena käytettiin 5 ng/ml ja Gremlin-1:n pitoisuuksina 10 ng/ml ja 20 ng/ml. Soluille lisättiin myös puhdistettuja vasta-aineita. Tutkittavia vasta-aineita testattiin pitoisuuksilla 2500 ng/ml, 5000 ng/ml, 10000 ng/ml.

Kaikki stimulaatiot tehtiin solujen normaaliin kasvatusmediumiin, johon oli lisätty vain penisilliinin, streptomysiinin ja glutamiinin sekoitusta, ei FBS:ää. Stimulaatioaika pyrittiin pitämään mahdollisimman lyhyenä sijoittamalla stimulaation ajankohta iltapäivään ja lusiferaasi-mittaus seuraavaan aamuun.

### 3.5.4 Dual Lusiferaasi -mittaus

Lusiferaasi-mittaukseen käytettiin Promega Dual-Luciferase Reporter Assay System -kittiä. Varsinainen mittaus tehtiin luminometrillä. Stimuloidut solut pestiin kerran 100 µl:lla PSB:ää ja llysaattiin lisäämällä 40 µl kitin Passive Lysis Bufferia, sekä asettamalla 15 minuutiksi huoneenlämpöön ravisteluun. Näyteputkiin siirrettiin 20 µl llysaattia, taustaputkeen 20 µl pelkkää llysipuskuria.

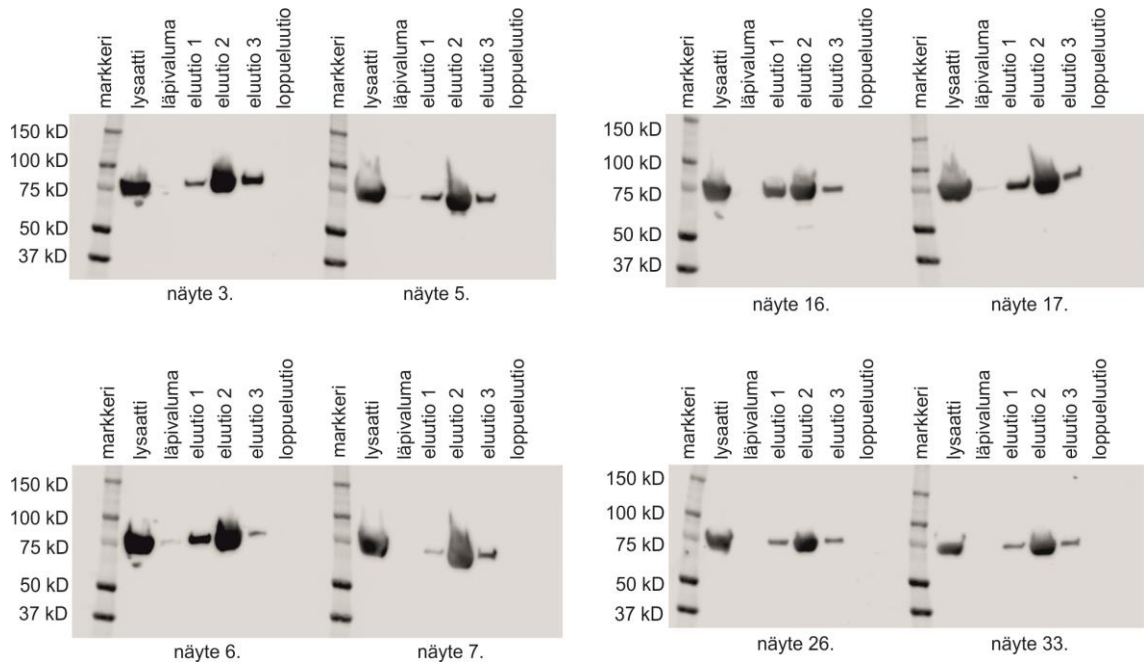
Luminometrimittaus suoritettiin lisäämällä näyteputkeen ensin 100 µl kitin LAR II -puskuria ja mittaamalla Firefly-lusiferaasi-aktiivisuus. Ensimmäisen mittauksen jälkeen putkeen lisättiin 100 µl kitin Stop&Glo-puskuria, ja mitattiin Renilla-lusiferaasi-aktiivisuus. Molempien mittausten kesto oli 10 sekuntia. Mittausten tulokset kerättiin RLU (Relative Light Unit) -yksiöissä.

## 4 Tulokset

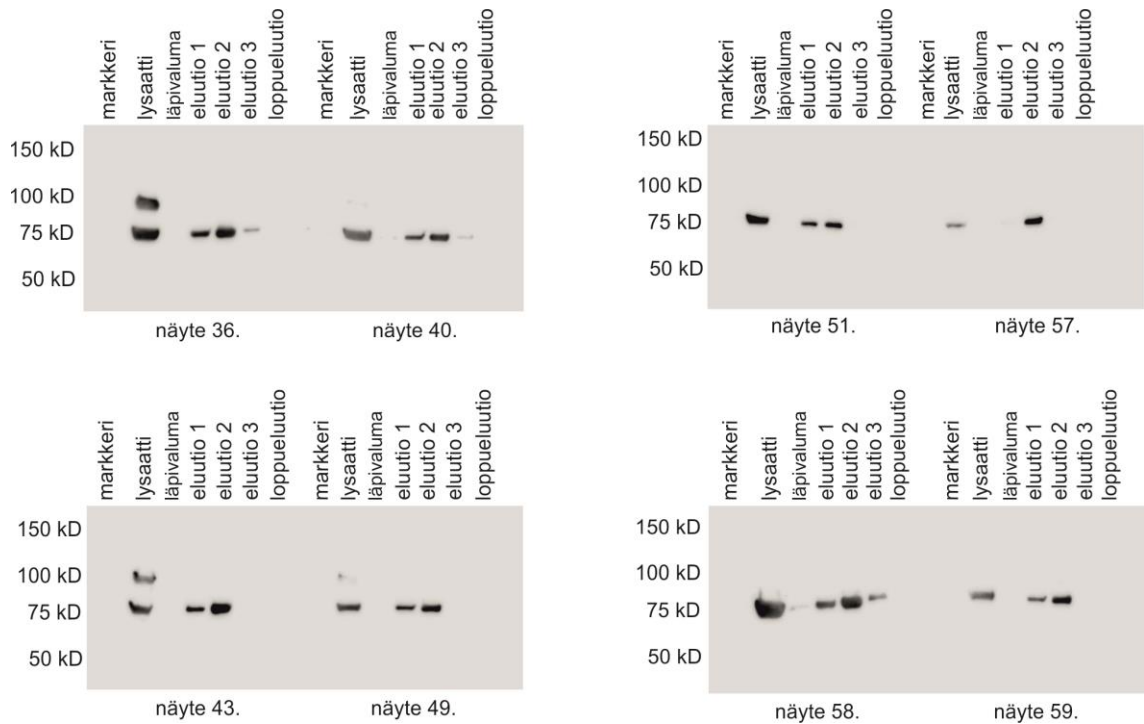
### 4.1 Puhdistus

#### 4.1.1 Western blot

Western blot -menetelmällä voidaan tunnistaa vasta-aine-proteiinit näytteistä käyttäen HIS-tag:n tunnistavia vasta-aineita. Vahva bandi kuvissa viittaa suurempaan vasta-ainepitoisuuteen. Tällä tavoin voidaan arvioida puhdistuksen onnistumista ja sitä, mitkä puhdistuksessa kerätyistä näytteistä sisältävät eniten vasta-ainetta. Lisäksi kyetään myös arvioimaan scFv-AP-fragmenttien kokoluokkaa. Aikaisempien vastaavien kokeiden perusteella vasta-aineiden kooksi odotettiin noin 75 kD. Llysaatti-näytteissä näkyy vasta-aineiden kokonaismäärä ennen puhdistusta. Läpivaluma-näytteistä voidaan päätellä, sitoutuiko kaikki vasta-aine kolonniin vai valuiko sitä hukkaan. Eluutio-näytteistä haluttiin selvittää, mihin eluutioihin on irronnut eniten vasta-ainetta. Loppueluutio-näytteillä haluttiin varmistaa, että monikäyttöisissä kolonneissa ei enää ollut jäämiä vasta-aineista.



Kuva 3. Kemiluminesenssikuvat näytteistä 3, 5, 6, 7, 16, 17, 26 ja 33. 30 sekunnin valotusaika kemiluminesenssikanavalla.



Kuva 4. Kemiluminesenssikuvat näytteistä 36, 40, 43, 49, 51, 57, 58 ja 59. 30 sekunnin valotusaika kemiluminesenssikanavalla.

Lysaatti-näytteistä saatiin näkyviin bandi kaikissa bloteissa (kuvat 3 ja 4) odotetun vahvasti, tosin odottamattomasti kuvan 4 näytteissä 36 ja 43 näkyi selkeä ylimääräinen bandi 100 kD:n kohdalla. Näytteessä 49 (kuva 4) näkyy hyvin haalea vastaava bandi.

Näitä kolmea bandia lukuun ottamatta kaikki bandit olivat noin 75 kD:n kokosia. Näytteen 57 (kuva 4) lyaatti-näytteessä näkyi hyvin haalea bandi, todennäköisimmin viitaten melko matalaan saantoon. Näytteen 6 (kuva 3) läpivaluma-näytteessä näkyy hyvin haalea bandi, josta päätellen osa vasta-aineesta ei ole sitoutunut kolonniin, tai lähtömateriaalia on ollut runsaasti. Muissa läpivaluma-näytteissä ei havaittu bandeja. Kaikkien näytteiden kolmesta eluutio-näytteestä eluutio 2 näkyi voimakkaimmin. Näytteen 57 (kuva 4) tapauksessa eluutio 2 oli ainoa näkynyt eluutio. Siksi eluutio 2 valittiin kaikista näytteistä dialysoitavaksi.

Kuvien 3 ja 4 näytteiden välillä on havaittavissa näkyvää eroa. Kuvan 4 näytteet olivat samoilla valotusajoilla huomattavasti haaleampia kuin kuvan 3 näytteet, jotka osittain valottuivat jopa hieman liikaa.

#### 4.1.2 Proteiinipitoisuus

Puhdistettujen vasta-aineiden mitatut proteiinipitoisuudet on esitetty taulukossa 2. Vasta-aineiden tilavuussaanto oli dialyysin jälkeen hieman alle 1 ml. Kahdeksan ensimmäisen ja kahdeksan viimeisen näytteen pitoisuuksien välillä oli varsin paljon eroa. Näytteet olivat peräisin eri puhdistuseristä, ja tämä voisi selittää mainittavat erot näytteiden välillä. Matalan proteiinipitoisuuden seurauksena näytteitä 43 ja 57 päätettiin olla käyttämättä testeissä, koska käytettäessä näiden näytteiden liian suuri tilavuus vasta-aine-liuosta olisi saattanut vaikuttaa tulosten luotettavuuteen.

Taulukko 2. Proteiinipitoisuus

Vasta-aine	Pitoisuus	Vasta-aine	Pitoisuus
3. EB44-A3-A11	318 µg/ml	36. EB46-D3o-A03	293 µg/ml
5. EB44-A3-B09	394 µg/ml	40. EB46-D3-B11	159 µg/ml
6. EB44-A3-C01	489 µg/ml	43. EB46-D3-C09	75 µg/ml
7. EB44-A3-C05	688 µg/ml	49. EB46-D3o-F05	121 µg/ml
16. EB44-A3o-F03	437 µg/ml	51. EB46-D3o-F11	119 µg/ml
17. EB44-A3o-F12	495 µg/ml	57. EB46-D3o-G12	65 µg/ml
26. EB45-B3-C12	415 µg/ml	58. EB46-D3o-H01	517 µg/ml
33. EB45-B3o-G09	485 µg/ml	59. EB46-D3o-H03	147 µg/ml

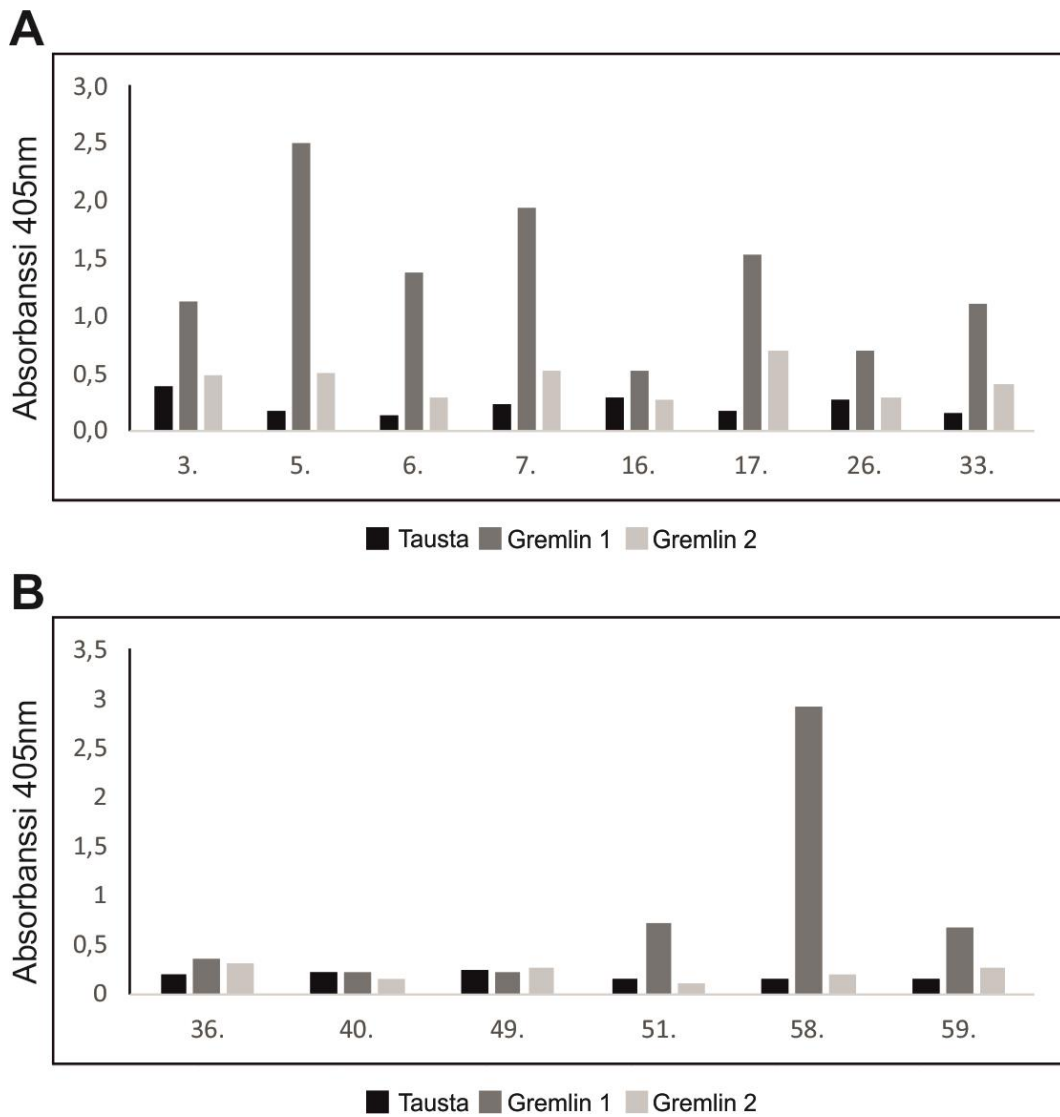
## 4.2 ELISA

Vasta-aineiden sitoutumiskykyä arvioitiin sandwich ELISA:lla ja suoralla ELISA:lla. Sandwich ELISA:n tulokset on esitetty kuvaajissa A ja B (kuva 5.) ja suoran ELISA:n tulokset kuvassa 6.

Kuvan 5 kuvaaja A:ssa kaikki tutkitut näytteet tunnistivat Gremlin-1:tä ainakin jonkin ver-  
ran, runsaimmin näytteet 5 ja 7. Vain osa näytteistä tunnisti Gremlin-2:ta, mutta Gremlin-  
1:een verrattuna ei erityisen merkittävästi.

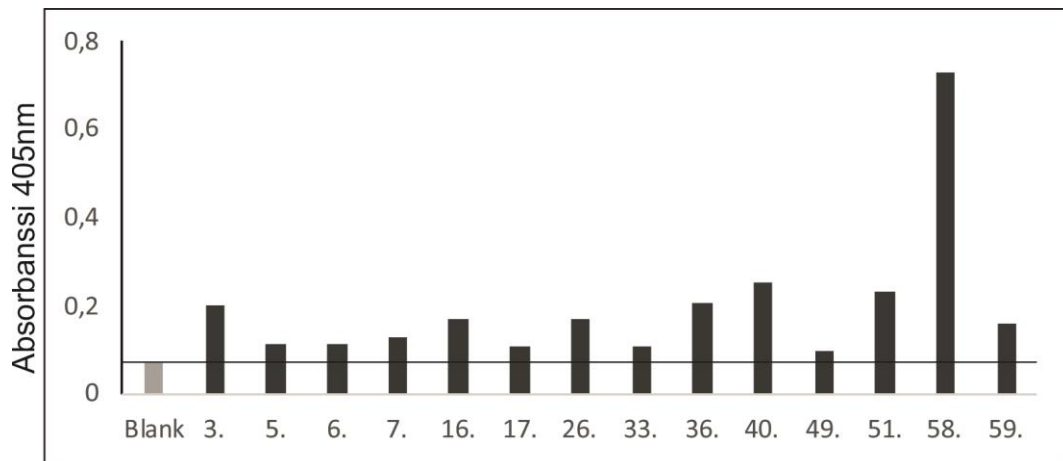
Kuvaajan B (kuva 5) näytteistä ainoastaan näytteessä 58 havaittiin kohtuullista sitoutu-  
mista Gremlin-1:een. Näytteissä 51 ja 59 havaittiin sitoutumista ainoastaan jonkin ver-  
ran. Loput näytteet eivät näyttäneet sitoutuvan mainittavasti. Yhdenkään kuvaajan B  
näytteistä ei havaittu merkittävästi sitoutuneen Gremlin-2:een.

Koska kaikkien näytteiden sitoutuminen Gremlin-2:een oli hyvin vähäistä, ei sitä nähty  
aiheelliseksi käyttää reportterikokeissa tai suorassa ELISA:ssa.



Kuva 5. Sandwich ELISA. Absorbanssi aallonpituudella 405 nm. Kuvaajan A mittaus 20 h inkuboinnin jälkeen. Kuvaajan B mittaus 21 h inkuboinnin jälkeen. Kuvaajassa on esitettyä rinnakkaisen mittauksen keskiarvot. Kaikista näytteistä tehtiin kaksi rinnakkaista mittausta.

Suoran ELISA:n (kuva 6) perusteella ainoa vasta-aine, jonka havaittiin sitoutuvan Gremlin-1:een runsaasti, oli näyte 58. Näytteissä 40 ja 51 voidaan havaita jonkin asteista sitoutumista.

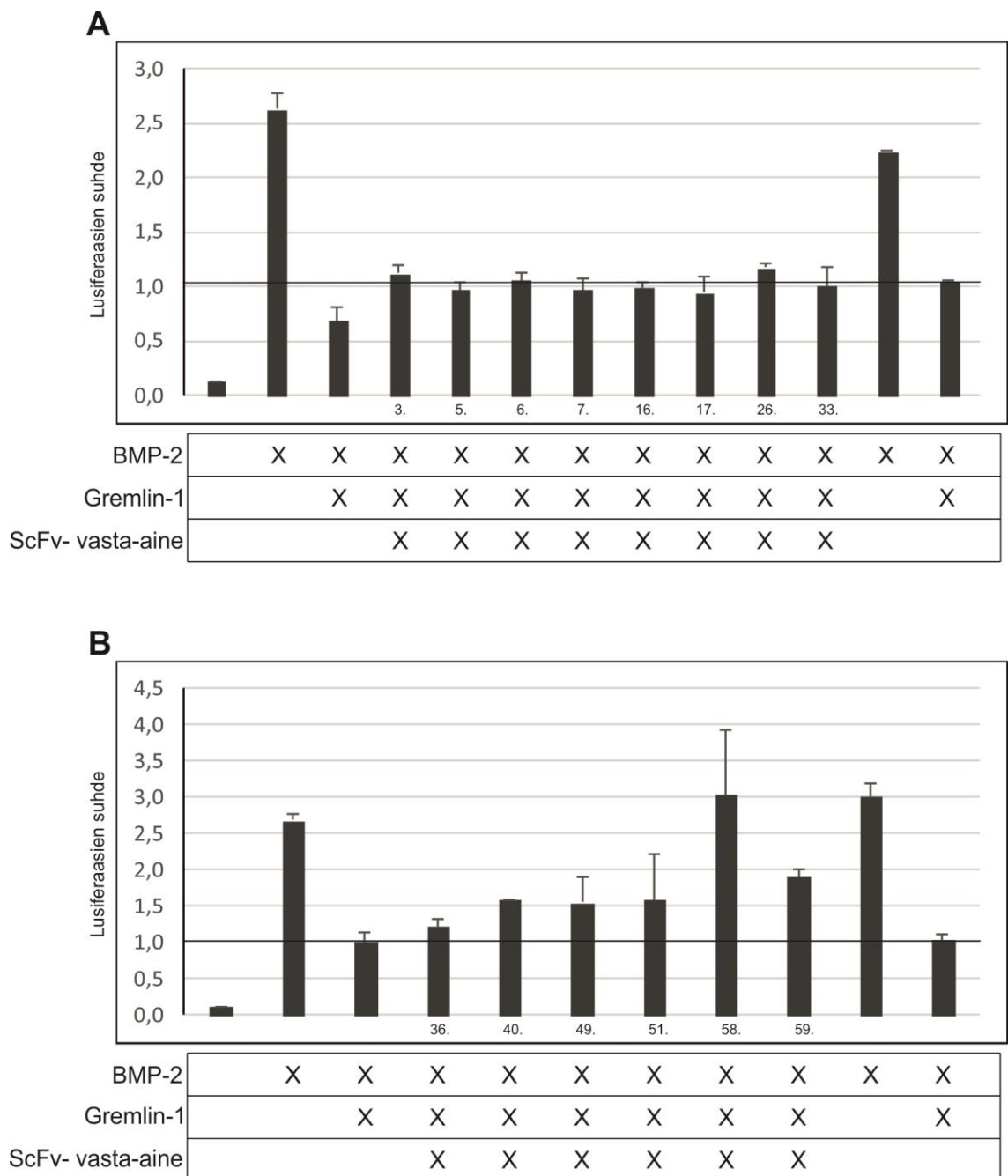


Kuva 6. Suora ELISA. Absorbanssi aallonpituudella 405 nm. Mittaus 17 h inkuboinnin jälkeen. Kuvaajassa on esitettyä rinnakkaisen mittauksen keskiarvot. Kaikista näytteistä tehtiin kaksi rinnakkaista mittausta.

### 4.3 Reportterikokeet

Dual-lusiferaasi-kokeiden tulokset on esitetty kuvissa 7 ja 8. Kuvan 7 kokeessa testattiin kaikkia näytteitä yhdellä vasta-aine-pitoisuudella. Kuvan 8 kokeeseen otettiin mukaan kuvan 7 kokeessa parempia tuloksia antaneita näytteitä, joita testattiin kolmella vasta-aine-pitoisuudella.

Kuvan 7. molemmissa kuvaajissa pelkän BMP-2:n lisääminen stimuloi BMP-reportteriaktiivisuutta odotetusti. Vastaavasti Gremlin-1:n lisääminen laski BMP-aktiivisuutta. Kuvan 7. kuvaajassa A yksikään testatuista ScFv-vasta-aineista ei palauttanut BMP-2:n aktiivisuutta mainittavasti. Käytännössä kaikki jäivät samalle tasolle verrattavan Gremlin-1:tä sisältävän näytteen kanssa. Näin ollen voidaan päätellä, ettei mikään vasta-aineista estä Gremlin-1:n toimintaa.

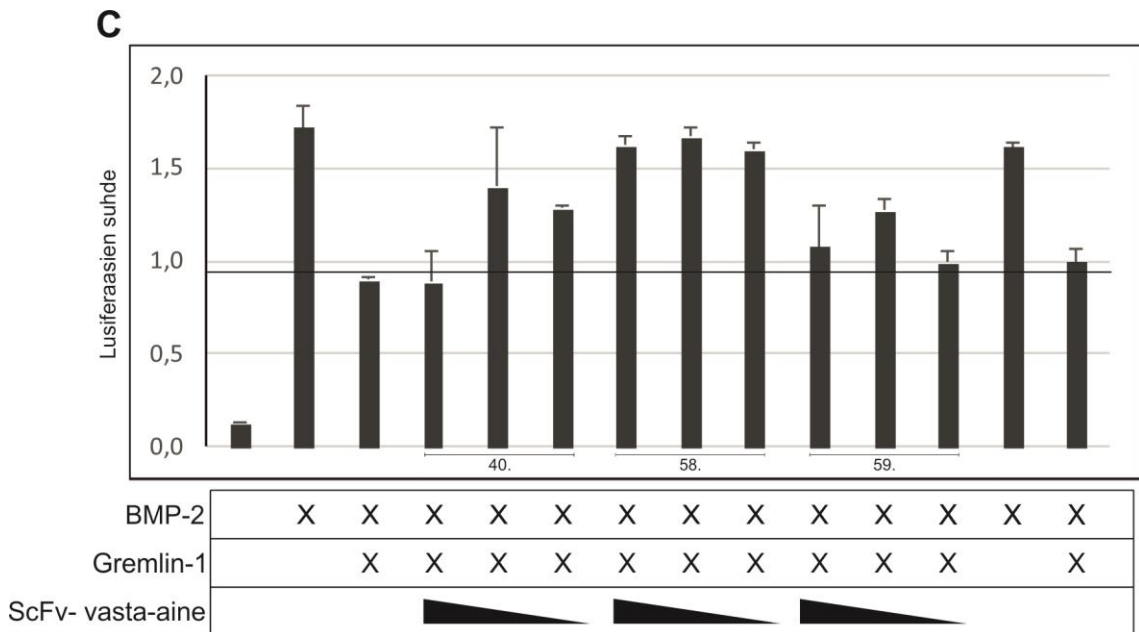


Kuva 7. Dual Lusiferaasi-mittaukset esitettyinä Renilla- ja Firefly-lusiferaasien suhteina ja rinnakkaisten näytteiden keskiarvoina. Kuvaajissa on esitettynä mittausten keskivirhe. BMP-2-pitoisuus näytteissä 5 ng/ml, Gremlin-1-pitoisuus näytteissä 10 ng/ml. Testattavia vasta-aineita käytettiin 10000 ng/ml.

Kuvan 7. kuvaajasta B sen sijaan voidaan nähdä, että näyte 58 on palauttanut BMP-aktiivisuuden takaisin samalle tasolle BMP-2-vertailunäytteiden kanssa. Myös muutamat muut vasta-aineet palauttivat aktiivisuutta jossakin määrin. Tuloksen varmentamiseksi koe toistettiin näytteellä 58 ja kahdella muulla vasta-aineella, käyttäen useampaa pitoisuutta kustakin. Toiseksi vasta-aineiksi valittiin vasta-aineet 40 ja 59. Vasta-aine 59,



koska sen tulos oli edeltävässä kokeessa toiseksi paras ja vasta-aine 40 hieman heikomman tuloksen antaneena vertailukohtana.



Kuva 8. Dual Lusiferaasi-mittaukset esitettyinä Renilla- ja Firefly-lusiferaasien suhteina ja rinnakkaisten näytteiden keskiarvoina. Kuvaajassa on esitettynä mittausten keskiarvo. BMP-2-pitoisuus näytteissä 5 ng/ml, Gremlin-1-pitoisuus näytteissä 10 ng/ml. Testattavien vasta-aineiden pitoisuuksina käytettiin 10000 ng/ml, 5000 ng/ml ja 2500 ng/ml.

Kuvan 8 perusteella voidaan huomata kaikkien näytteen 58 pitoisuuksien estävän Gremlin-1:n sitoutumista ja palauttavan BMP-2-aktiivisuuden takaisin vertailutasolle. Vasta-aine 40, joka aikaisemmassa kokeessa (kuva 7, kuvio B) ei inhiboinut Gremlin-1:tä kovin tehokkaasti, palautti BMP-2-aktiivisuutta jonkin verran enemmän pienemmillä pitoisuuksilla (500 ng/μl ja 250 ng/μl). 500 ng/μl pitoisuus vaikutti palauttavan aktiivisuutta jopa melko runsaasti, mutta rinnakkaisten näytteiden ero oli hyvin suuri. Näyte 59 nosti BMP-2-aktiivisuutta kahdella isommalla pitoisuudella (1000 ng/μl ja 500 ng/μl) samoissa määrin, kuin kuvan 7 kuvion B. kokeessa. Tosin 1000 ng/μl pitoisuudella rinnakkaisilla näytteillä oli paljon hajontaa.

## 5 Yhteenveto

Tulosten perusteella voidaan todeta, että kokeiden avulla löydettiin ainakin yksi potentiainen Gremlin-1-aktiivisuutta estävä vasta-aine. Näyte 58 osoitti sitoutuvansa Gremlin-1:een molemmissa ELISA-testeissä, sekä palauttavansa BMP-aktiivisuutta molemmissa lusiferaasi-kokeissa. Kuvan 8 lusiferaasi-koe osoitti, että vasta-aine toimi hyvin myös pienemmissä pitoisuuksissa. Tulos antaa perusteet lähteä karakterisoimaan vastaainetta tarkemmin ja tutkimaan, voidaanko sitä hyödyntää käytännössä. Muista näytteistä vastaainetta 40 voi olla myös aiheellista tutkia tarkemmin. Se palautti BMP-aktiivisuutta jälkimmäisessä lusiferaasi-kokeessa (kuva 8) matalammilla pitoisuuksilla (5000 ng/ml), tosin rinnakkaisten näytteiden välillä oli varsin suuri hajonta.

Vastaaineet 43 ja 57 päätettiin jättää pois ELISA- ja lusiferaasi-kokeista niiden matalan saannon takia. Kokeiden kokonaistilavuudet olivat melko matalia, ja vastaaineita olisi tarvinnut käyttää suhteellisen paljon. Tämän pelättiin vaikuttavan tulosten luotettavuuteen. Näiden kahden vasta-aineen huono saanto johtui todennäköisimmin siitä, etteivät bakteerit lysautuneet kunnolla ennen puhdistusta. Ainakin toisessa näistä näytteistä havaittiin paakkuisuutta vielä lysisauksen jälkeen. Näille näytteille on aiheellista tehdä uusi vastaainekasvatus paremman saannon saamiseksi. Bentsonaasin käyttäminen olisi saattanut helpottaa lysisausta vähentämällä näytteiden viskoosisuutta. Näytteiden sekoittaminen homogeeniseksi oli viskoosisuuden takia hyvin haastavaa.

Näytteiden puhdistus suoritettiin kahdessa erässä, toisessa erässä näytteet 3–33 ja toisessa näytteet 36–59. Näiden näyte-erien välillä oli nähtävissä mainittava ero proteiinipitoisuuksissa (taulukko 1). 36–59 erän näytteet olivat lähes kaikki konsentraatioiltaan huomattavasti matalampia. Tämä on mahdollisesti seuraus pienistä eroista bakteerien kasvatuksessa. Bakteerit on saatettu siirrostaa eri kasvuvaiheissa, jolloin vastaainetuotto on kärsinyt. Yllä mainittuja kahta hyvin matalan pitoisuuden antanutta näytettä lukuun ottamatta saatiin vastaaineita riittävästi kokeiden suorittamiseen.

Western blotin kuvantamisessa jälkimmäisissä kahdeksassa näytteessä (kuva 3.) molekyyli-markkeri ei saatu näkyviin samalla tavalla kuin ensimmäisissä näytteissä (kuva 2.). Lisäksi jälkimmäisissä kuvissa esiintyi huomattavaa taustahäiriötä. Käytännössä tämä ei kuitenkaan vaikuttanut tuloksiin, koska näytebandit saatiin näkyviin riittävän hyvin ja näytteiden koko kyettiin varmentamaan Ponceau-värijäysten perusteella. Ainoaksi muuttujaksi ensimmäisten ja jälkimmäisten blottien välillä kyettiin tunnistamaan Ponceau-väri,

sillä bloteissa käytettiin eri värieriä. Värjäyksen mahdollista vaikutusta kuvantamiseen on kuitenkin hyvin vaikea arvioida.

Sandwich ELISA:ssa sitoutumista osoittaneista vasta-aineista ainoastaan vasta-aine 58 osoitti runsasta sitoutumista suorassa ELISA:ssa. On mahdollista, että sandwich ELISA:n on tapahtunut runsaasti signaalivahvistusta, jonka seurauksena suurin osa vasta-aineista ei enää näkynyt suorassa ELISA:ssa. Tuloksia on saattanut myös heikentää erilaiset sitoutumishäiriöt. Esimerkiksi sandwich ELISA:ssa Gremlinin biotinylointi on saattanut tehdä osan Gremlinistä toimintakelvottomiksi. Vastaavasti suorassa ELISA:ssa kuoppien pohjiin kiinnitetty Gremlin on saattanut kiinnittyä tavalla, joka estää vasta-aineen sitoutumisen.

Lusiferaasi-kokeissa muutamien rinnakkaisten näytteiden välillä oli melko suurta hajontaa. Mahdollisia syitä tähän ovat vaihtelut pipetoinneissa sekä mittauksien epätarkkuudet. Näytekuppiin lisättyjen reagenssien tilaavuus on saattanut pienien pipetointitilavuuksien seurauksena hieman vaihdella. Useamman rinnakkaisen näytteen käyttäminen olisi todennäköisesti vähentänyt hajontaa ja tehnyt tuloksista siten hieman luotettavampia.

Kaiken kaikkiaan kokeiden voidaan arvioida onnistuneen hyvin. Näytteistä saatiin selvottua ainakin yksi lupaava vasta-aine tarkempaa karakterisointia varten.

## Lähteet

- 1 Kaarteenaho R. 2015. Idiopaattinen keuhkofibroosi. Lääkäriin käsikirja, Kustannus Oy Duodecim. Verkkodokumentti. <[http://www.terveysportti.fi/dtk/ltk/avaa?p\\_artikkeli=ykt00179](http://www.terveysportti.fi/dtk/ltk/avaa?p_artikkeli=ykt00179)>. 1.4.2015. Luettu 22.4.2016.
- 2 Mustajoki P. 2016. Tietoa potilaalle: Keuhkofibroosi (keuhkojen sidekudostuminen). Lääkärikirja Duodecim, Kustannus Oy Duodecim. Verkkodokumentti. <[http://www.terveysportti.fi/dtk/ltk/avaa?p\\_artikkeli=dlk00644](http://www.terveysportti.fi/dtk/ltk/avaa?p_artikkeli=dlk00644)>. 4.1.2016. Luettu 22.4.2016.
- 3 Tamminen J. 2014. TGF- $\beta$  family signaling in the regulation of cell plasticity in lung cells and mesothelioma. University of Helsinki. Faculty of Medicine. Doctoral dissertation. 19.12.2014. s. 31-43.
- 4 Knuuttila A., Salo J. 2013. Mesoteliooman ilmeneminen ja ilmaantuvuus. Syöpätaudit, Kustannus Oy Duodecim. Verkkodokumentti. <<http://www.oppiportti.fi/op/syt00323/do>>. 27.6.2013. Luettu 22.4.2016.
- 5 Anttila S., Kaarteenaho R., Pääkkö P. 2012. Maligni mesoteliooma. Patologia, Kustannus Oy Duodecim. Verkkodokumentti. <<http://www.oppiportti.fi/op/pat00362/do>>. 2.2.2012. Luettu 22.4.2016.
- 6 Knuuttila A., Salo J. 2013. Mesoteliooman etiologia. Syöpätaudit, Kustannus Oy Duodecim. Verkkodokumentti. <<http://www.oppiportti.fi/op/syt00324/do>>. 27.6.2013. Luettu 22.4.2016.
- 7 Knuuttila A., Salo J. 2013. Mesoteliooman hoito. Syöpätaudit, Kustannus Oy Duodecim. Verkkodokumentti. <<http://www.oppiportti.fi/op/syt00327/do>>. 27.6.2013. Luettu 25.4.2016.
- 8 Knuuttila A., Salo J. 2013. Mesoteliooman ennuste. Syöpätaudit, Kustannus Oy Duodecim. Verkkodokumentti. <<http://www.oppiportti.fi/op/syt00328/do>>. 27.6.2013. Luettu 25.4.2016.
- 9 Weiss A., Attisano L. 2013. The TGF $\beta$  superfamily signaling pathway. Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology 2: 47–63. 2013.
- 10 Zhang Q., Yu N., Lee C. 2014. Mysteries of TGF- $\beta$  Paradox in Benign and Malignant Cells. Frontiers in Oncology. 4: 94. 13.5.2014.
- 11 Heldin CH., Landström M., Moustakas A. 2009. Mechanism of TGF-beta signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition. Current opinion in Cell Biology. 21: 166–176. 4/2009.
- 12 Myllärniemi M., Lindholm P., Rynänen MJ., Kliment CR., Salmenkivi K., Keski-Oja J., Kinnula VL., Oury TD., Koli K. 2008. Gremlin-mediated decrease in bone

morphogenetic protein signaling promotes pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 177: 321–329. 2/2008.

- 13 Kisonaite M., Wang X., Hyvönen M. 2016. Structure of Gremlin-1 and analysis of its interactions with BMP-2. *Biochemical Journal*. Apr 01, 2016.
- 14 Laurila R., Parkkila S., Isola J., Kallioniemi A., Alarmo EL. 2013. The expression patterns of gremlin 1 and noggin in normal adult and tumor tissues. *International Journal of Clinical & Experimental Pathology*. 6(7): 1400–1408. 15.6.2013.
- 15 Koli K., Myllärniemi M., Vuorinen K., Salmenkivi K., Ryyänen M., Kinnula V., Keski-Oja J. 2006. Bone morphogenetic protein-4 inhibitor gremlin is overexpressed in idiopathic pulmonary fibrosis. *American Journal of Pathology*. 169(1): 61–71. 6/2006.
- 16 Tamminen J A., Parviainen V., Rönty M., Wohl A P., Murray L., Joenväärä S., Varjosalo M., Leppäranta O., Ritvos O., Sengle G., Renkonen R., Myllärniemi M., Koli K. 2013. Gremlin-1 associates with fibrillin microfibrils in vivo and regulates mesothelioma cell survival through transcription factor slug. *Oncogenesis*. 2(8): e66. 8/2013.