

Sonja Tuukkanen

LAMP-2B-proteiinin mutaatioiden vaikutus
kolesterolin ja BMP:n kertymiseen
nisäkässoluissa

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko

Laboratorioala

Opinnäytetyö

23.11.2014

<p>Tekijä Otsikko</p> <p>Sivumäärä Aika</p>	<p>Sonja Tuukkanen LAMP-2B-proteiinin mutaatioiden vaikutus kolesterolin ja BMP:n kertymiseen nisäkässoluissa</p> <p>31 sivua + 2 liitettä 17.11.2014</p>
<p>Tutkinto</p>	<p>Laboratorioanalyttikko (AMK)</p>
<p>Koulutusohjelma</p>	<p>Laboratorioala</p>
<p>Ohjaajat</p>	<p>Eeva-Liisa Eskelinen, dosentti, tutkijatohtori Taina Suntio, tutkijatohtori Tiina Soininen, lehtori</p>
<p>Tämä opinnäytetyö tehtiin Helsingin yliopiston Biotieteiden laitoksella Eeva-Liisa Eskelisen tutkimusryhmässä.</p> <p>Tietynlaisten glysiinejä sisältävien aminohapposekvensseien on osoitettu vaikuttavan transmembraaniproteiinien välisissä interaktioissa. Lysosomaalisen membraaniproteiini LAMP-2B:n transmembraanialueelle tehtiin mutaatioita PCR-reaktioilla käyttäen alukkeita, joilla alueelta muutettiin kolme glysiiniä valiineiksi. Amplikonit yhdistettiin ja liigoitiin pCI-neo-vektoriin, joka transformoitiin <i>E. coliin</i>. Pesäkkeistä eristettiin plasmidit, jotka seulottiin halutun insertin sisältävän löytämiseksi.</p> <p>Plasmidi transfektoitiin LAMP-1- ja LAMP-2-kaksoispoistogeenisiin hiiren alkion sidekudossoluihin ilmentymään. Solut immunovärjättiin LAMP-, LIMP- ja BMP-vasta-aineilla, fluoresoivilla sekundäärisillä vasta-aineilla sekä Filipinillä. Mutatoitua proteiinia ilmenettiin myös HeLa-soluissa.</p> <p>Western blotin perusteella voitiin todeta mutatoitun proteiinin olevan saman kokoinen kuin mutatoimatonkin. Mikroskooppikuvien perusteella ei voitu sanoa mitään varmaa näytteiden pienen määrän ja tulosten suuren keskihajonnan vuoksi. Vertailemalla LAMP:n, BMP:n ja LIMP:n kolokalisaatiota havaittiin, etteivät LAMP ja BMP kolokalisoidu LIMP:n kanssa, mikä saattaa olla yksi syy mikroskooppikuvien tulosten suureen keskihajontaan.</p>	
<p>Avainsanat</p>	<p>kolesteroli, kloonaus, soluviljely, immunovärjäys</p>

Author(s) Title	Sonja Tuukkanen Effects of mutation in LAMP-2B on the accumulation of cholesterol and BMP in mammalian cells
Number of Pages Date	31 pages + 2 appendices 17 November 2014
Degree	Bachelor of Laboratory Sciences
Degree Programme	Laboratory sciences
Instructor(s)	Eeva-Liisa Eskelinen, PhD Taina Suntio, PhD Tiina Soininen, Principal Lecturer
<p>This thesis was made in Eeva-Liisa Eskelinen's research group in the Department of Biosciences of the University of Helsinki.</p> <p>Certain amino acid sequences containing glycines have been shown to have an effect on protein-protein interactions between transmembrane proteins. The transmembrane region of the lysosomal membrane protein LAMP-2B was mutated by PCR with primers that changed three glycines to valines. The amplicons were joined together and the product was transformed to <i>E. coli</i>. Plasmid DNA was isolated from the colonies and the samples were screened for discovery of the wanted insert.</p> <p>The plasmid was transfected to and expressed in LAMP-1 and LAMP-2 double deficient MEF cells. The cells were stained with Filipin, with antibodies for LAMP-2, LIMP and BMP and with secondary fluorescent antibodies. The mutated protein was also expressed in HeLa cells.</p> <p>The mutated protein was discovered to be of the same size with the unmutated protein by a Western blot analysis. No conclusions could be made based on the microscopy images due to the low number of samples and a high standard deviation in the results. By comparing the colocalization of LAMP, BMP and LIMP, it was discovered that LAMP and BMP do not colocalize with LIMP, which may be one of the reasons for a high standard deviation in the results from the microscopy images.</p>	
Keywords	cholesterol, cloning, cell culturing, immunostaining

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Lysosomit	2
2.1	Autofagia	2
2.2	LAMP-proteiinit	4
2.3	Kolesteroli	6
2.4	BMP-fosfolipidi	7
3	Materiaalit ja menetelmät	9
3.1	Kloonaus	9
3.2	Transfektio	12
3.3	Immunovärjäys	13
3.4	Mikroskopointi	14
3.5	Western-blot	14
4	Tulokset ja niiden tarkastelu	17
4.1	Immunofluoresenssikuvien tarkastelu	17
4.2	Kolokalisaatio	22
4.3	Western-blot-analyysin tulokset	25
5	Yhteenveto	27
	Lähteet	29

Liitteet

Liite 1. Mikroskopointikuvien analyysit

Liite 2. Kolokalisaatiokuvien analyysit

Lyhenteet

BMP	bis(monoacylglycero)phosphate
CMA	chaperone-mediated autophagy
FBS	fetal bovine serum
LAMP	lysosome associated membrane protein
LIMP	lysosome integral membrane protein
MEF	mouse embryonic fibroblast
PBS	phosphate buffered saline
PFA	paraformaldehydi

1 Johdanto

Sydän- ja verisuonitaudit ovat yksi yleisimmistä työikäisten suomalaisten kuolinsyistä niiden aiheuttaessa vajaan neljänneksen kuolemista. Eläkeläisillä vastaava luku on lähes puolet. Yleisin sairauksista on sepelvaltimotauti, joka aiheutuu ateroskleroosista eli valtimoverisuonten seinämien kovettumisesta. Sairastumisriskiä lisäävät muun muassa vähäinen liikunta, tupakointi, ravinnon rasvapitoisuus sekä veren kohonnut kolesterolipitoisuus. [1; 2; 3.]

1960-luvulla suomalaismiesten kuolleisuus sepelvaltimotautiin oli maailman suurinta, ja vielä 1970-luvun alkupuolellakin kuolleisuus oli yksi maailman korkeimmista. Sitemmin miesten kuolleisuus on pudonnut lähes viidennekseen ja kolesteroliarvot parantuneet merkittävästi. Naisten kuolleisuus on koko ajan ollut huomattavasti alhaisempi kuin miesten ja suhteellinen muutos on ollut suurempi. Nykyään sepelvaltimotautiin kuolee Suomessa vuosittain noin 12 000 henkeä. [2; 4; 5; 6.]

Tämänhetkiset suositukset veren kolesterolipitoisuudelle ovat enintään 5,0 mmol/l kokonaiskolesterolia, enintään 3,0 mmol/l LDL-kolesterolia ja vähintään 1,0 mmol/l HDL-kolesterolia. Kolesterolipitoisuuden ollessa näiden arvojen ulkopuolella puhutaan dyslipidemiasta, joka lisää riskiä sairastua sydän- ja verisuonitauteihin. Siksi arvot pyritään palauttamaan suositusalueelle. Jos poikkeama on lievä, eikä henkilöllä ole muita sairastumiselle altistavia riskitekijöitä, on hoitona yleensä ruokavalion ja elämäntapojen muutos. Jos kolesteroliarvot ovat kaukana tavoitellusta tai henkilö kuuluu muuten riskiryhmään, voidaan tilaa hoitaa myös lääkkeillä, joista tyypillisimpiä ovat kolesterolisynteesiä estävät statiinit. [7; 8.]

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli tutkia lysosomaalisen membraaniproteiinin transmembraanialueelle tehtyjen mutaatioiden vaikutuksia solussa. Koska tietynlaisilla glysiinejä sisältävillä aminohapposekvensseillä on osoitettu olevan vaikutus transmembraaniproteiinien välisiin interaktioihin, mutatoitiin tutkitun proteiinin geenistä kolme transmembraanialueen glysiiniä valiineiksi. Mutaation vaikutuksia tutkittiin seuraamalla kolesterolin ja bis(monoasyylyglysero)fosfaatin kertymistä soluihin.

2 Lysosomit

Lysosomit ovat soluorganelleja, joiden tehtävänä on hajottaa solun sisäisiä viallisia organelleja ja solun ulkopuolelta sisäänotettuja yhdisteitä. Nämä hajotettavat tuotteet eli substraatit ne saavat endosytoosin, fagosytoosin tai autofagian kautta. Lysosomit osallistuvat myös solun kolesterolitasapainon säätelyyn, plasmamembraanin korjaamiseen, patogeeneiltä puolustautumiseen sekä signaalointiin. [9.]

Lysosomien toiminnan kannalta välttämättömät proteiinit voidaan jakaa kahteen luokkaan. Ensimmäinen koostuu lysosomaalisista eli happamista hydrolaaseista, jotka vastaavat molekyylien hajotuksesta lysosomeissa. Niitä tunnetaan tällä hetkellä viitisenkymmentä, ja jokaisella on omat spesifit substraattinsa. Lysosomien hapan pH välillä 4,0 – 5,0 on välttämätön hydrolaasien toiminnalle, ja sen aikaansaavat membraanin protonipumput. [9,;10, s. 779 – 780; 11, s. 352.]

Toinen ryhmä koostuu lysosomaalisista membraaniproteiineista (LMP), joita ovat esimerkiksi LAMP (lysosome associated membrane protein) ja LIMP (lysosomal integral membrane protein). Näiden proteiinien tehtäviä ovat muun muassa lysosomin lumenin happamoittaminen, proteiinien kuljetus sytosolista ja hajotustuotteiden kuljetus sytoplasmaan. Nisäkässoluista on tunnistettu tähän mennessä noin 25 erilaista LMP:tä, mutta niitä oletetaan olevan huomattavasti enemmän. LMP:t muodostavat lysosomin membraanin sisäpinnalle kattavan hiilihydraattipeitteen, joka suojaa niitä lumenin happamuudelta ja hydrolaaseilta. [9; 11, s. 352.]

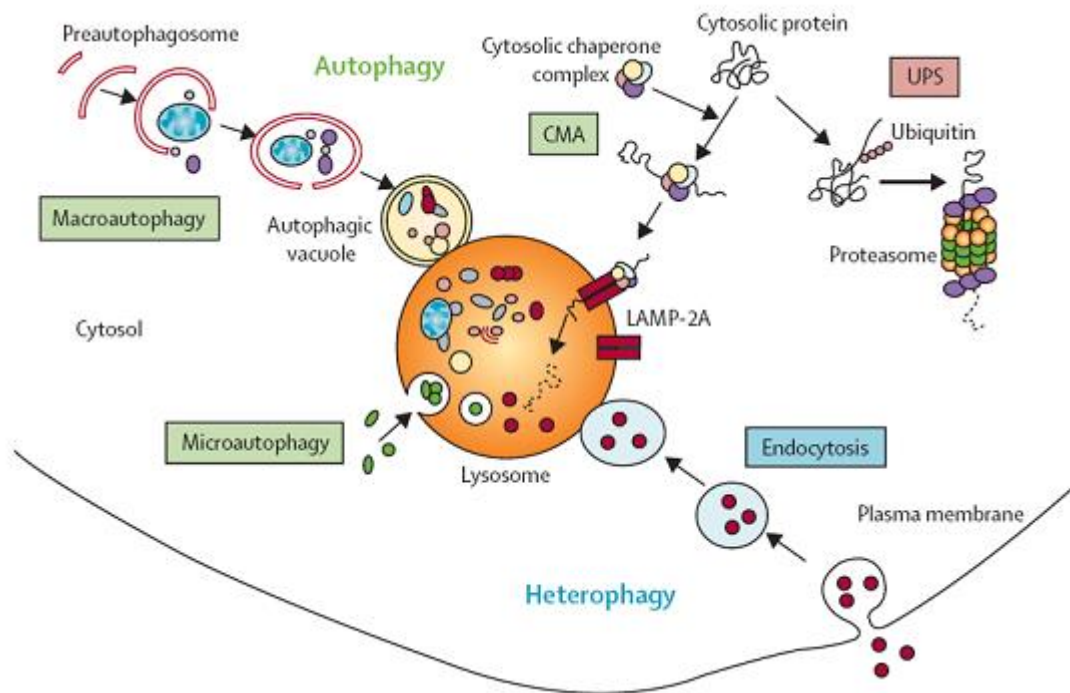
Lysosomaalisten proteiinien kuljetukseen Golgin laitteesta on kaksi vaihtoehtoista reittiä. Ensimmäinen on suora reitti, jossa proteiinit kulkeutuvat suoraan trans-Golgi-verkostosta endosomaaliseen järjestelmään ja sitä kautta lysosomeihin. Epäsuorassa reitissä proteiinit sijoittuvat ensin plasmamembraanille, josta ne otetaan varhaisiin endosomeihin ja joista ne sitten kulkeutuvat endosytoosireitin avulla lysosomeihin. [9.]

2.1 Autofagia

Autofagia on eukaryoottisolujen mekanismi, jolla ne kierrättävät vanhoja, ylimääräisiä tai vioittuneita proteiineja, lipidejä, nukleiinihappoja ja polysakkarideja energiaksi ja

uusien molekyylien rakennusaineiksi. Se toimii myös laatukontrollina ja estää proteiinikasautumien muodostumisen. [12.]

Autofagia voidaan jakaa kolmeen eri tyyppiin: makroautofagiaan, mikroautofagiaan ja kaperonivälitteiseen autofagiaan (CMA). Näiden kaikkien prosessien päätarkoituksena on erilaisten komponenttien proteolyttinen hajottaminen lysosomeissa, mutta niiden mekanismit poikkeavat toisistaan (kuvio 1). [13.]



Kuvio 1. Autofagiareitit [14].

Makroautofagiassa kuljetetaan hajotettavat partikkelit autofagosomien välityksellä lysosomeille, jolloin ne yhdistyvät muodostaen autolysosomin. Mikroautofagiassa sytosoliset komponentit puolestaan siirretään suoraan lysosomin sisään membraanin lävitse. CMA-prosessissa hajotettavat proteiinit muodostavat komplekseja kaperoniproteiinien kanssa. Lysosomien membraaneilla ne tunnistaa reseptorina toimiva LAMP-2A-proteiini. Tunnistuksen jälkeen proteiinit hajotetaan. [13.]

Makroautofagiassa ensimmäiseksi muodostuu fagofori, jonka kaksoislipidikalvon oletetaan olevan peräisin joko endoplasmisesta kalvostosta tai endosomeista. Se ei kuitenkaan sisällä juurikaan membraaniproteiineja, joten myös muodostuminen de

novo sytoplasman lipideistä on mahdollista. Fagofori laajenee ja ottaa sisäänsä hajotettavia partikkeleja eristäen ne sytoplasmasta ja muodostaen autofagosomin. Autofagosomit tunnustetaan yleensä LC3-proteiinin avulla, sillä se kiinnittyy voimakkaasti niiden membraaneille. Lisäksi monet selektiivisessä autofagiassa toimivat reseptorit sisältävät sille spesifin kohdan ja sitoutuvat sen avulla fagoforiin. [12; 13; 15.]

Autofagosomi voi seuraavaksi fuusioitua joko lysosomin kanssa muodostaen autolysosomin, tai myöhäisen endosomin kanssa muodostaen amfisomin, joka edelleen fuusioituu lysosomin kanssa. On esitetty, että fuusioituminen endosomien kanssa toisi autofagosomiin hajotettavia biomolekyylejä sekä happamoittaisi sen pH:ta ennen fuusiota lysosomin kanssa. Autolysosomissa lysosomien hydrolaasit hajottavat happaman pH:n kanssa eristetyt makromolekyylit. Lopputuotteet siirretään sytoplasmaan, josta ne otetaan uudelleen käyttöön. [12; 13; 15.]

Autofagiaprosessi toimii soluissa jatkuvasti perustasolla ylläpitäen soluorganellien laatua ja ympäristöä tasaisena. Se kuitenkin voimistuu merkittävästi nälkiintymisen seurauksena tuottaen solulle lisää energiaa välttämättömiin toimintoihin. Nälkiintymisen havaitsemisessa merkittävä rooli on rapamysiinin kohdekinaasilla, jonka ilmentyminen vaimenee ravinteiden vähentyessä. Matala ilmentymistaso voimistaa autofagiaa ja varmistaa siten, että solu toimii optimaalisesti varmistaakseen selviytymisensä. [13.]

Selektiivisen autofagian toimimattomuudella on suuri rooli monissa hermorappeumasairauksissa, kuten Alzheimerin, Huntingtonin ja Parkinsonin taudeissa. Näissä soluihin kertyy vanhoja ja vioittuneita soluorganelleja ja proteiineja, jotka häiritsevät solun normaalia toimintaa. [13.]

2.2 LAMP-proteiinit

LAMP-1- ja LAMP-2-proteiinit muodostavat merkittävän osan lysosomien membraaniproteiineista. Ne koostuvat vahvasti glykosyloidusta lumenaalisesta domeenista, joka sisältää neljä rakennetta vahvistavaa rikkisiltaa ja joka jakautuu kahteen homologiseen osaan sarana-alueen molemmin puolin, transmembraanidomeenista sekä lyhyestä C-terminaalista hännästä. Proteiinin häntäosa sisältää informaation proteiinien solunsisäisestä kohdentamisesta. [16.]

Vaihtoehtoisen silmukoinnin vuoksi LAMP-2-proteiinista on olemassa kolme muotoa: LAMP-2A, LAMP-2B ja LAMP-2C [17, s. 419]. Näistä LAMP-2A:ta tavataan erityisesti maksassa, kun taas LAMP-2B on yleisin luurankolioksissa. LAMP-2A liittyy erityisesti CMA:han, kun taas LAMP-2B:llä vastaavaa spesifioitumista ei ole havaittu. LAMP-2B:n aminohapposekvenssi on esitetty kuviossa 2. [18.]

MVCFRLFPVP	GSGLVLVCLV	LGAVRSYALE	LNLTDSENAT	CLYAKWQMF	50
TVRYETTKT	YKTVTISDHG	TVTYNGSICG	DDQNGPKIAV	QFGPGFSWIA	100
NFTKAASTYS	IDSVSFSYNT	GDNTTFPDAE	DKGILTVDEL	LAIIRIPLNDL	150
FRCNSLSTLE	KNDVVQHYWD	VLVQAFVQNG	TVSTNEFLCD	KDKTSTVAPT	200
IHTTVPSPTT	TPTPKKPEA	GTYSVNNGND	TCLLATMGLQ	LNITQDKVAS	250
VININPNTTH	STGSCRSHA	LLRLNSSTIK	YLDFVFAVKN	ENRFYLKEVN	300
ISMYLVNGSV	FSIANNNLSY	WDAPLGSSYM	CNKEQTVSVS	GAFQINTFDL	350
RVQPFNVTQG	KYSTAQECSL	DDTILIPPII	VGAGLSGLII	VIVIAYVIGR	400
RKSYAGYQTL					410

Kuvio 2. Ihmisen LAMP-2B:n aminohapposekvenssi [19].

Molempien LAMP-proteiinien aminohapporunko on 40 – 45 kDa:n kokoinen, mutta glykosylointi nostaa valmiiden proteiinien koon 120 kDa:iin. N-glykosylaation oletetaan vaikuttavan merkittävästi lysosomaalisten membraaniproteiinien stabiiliuteen. Lisäksi molempiin LAMP-proteiineihin on O-sitoutunut hiilihydraatteja niiden niin sanotulle sarana-alueelle. [16; 17, s. 416]

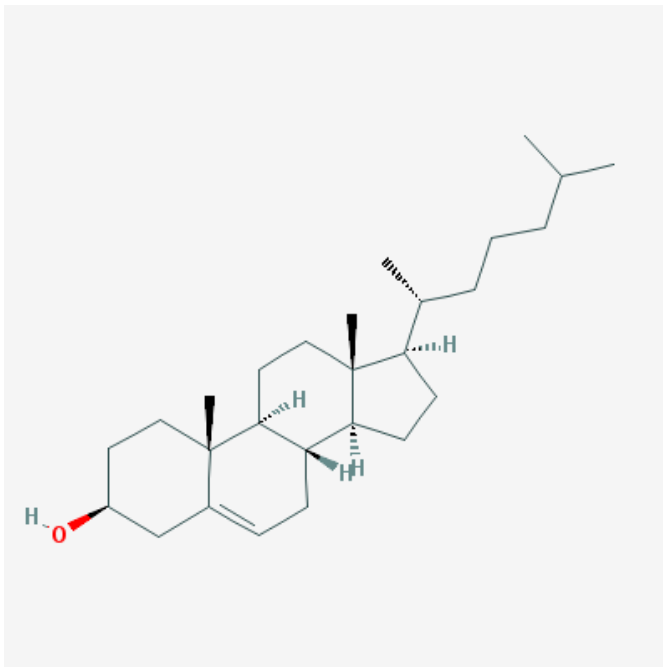
LAMP-proteiinien vaikutuksia on tutkittu hiirillä luomalla kantoja, joiden kromosomistosta on poistettu joko LAMP-1 tai LAMP-2-geeni. Pelkkä LAMP-1-geenin puute ei juurikaan aiheuta muutoksia, vaan hiiret olivat kontrolliryhmän kaltaisia. Sen sijaan LAMP-2-proteiinin puute aiheutti vakavia oireita ja puolet hiiristä kuolikin 20 - 40 päivän ikäisinä. Kaksoispoistogeeniset sikiöt kuolivat jo kohdussa. [20.]

LAMP-2-proteiinilla on osoitettu olevan merkittävä rooli kolesterolin kertymisessä soluun. Jos niistä puuttuu LAMP-2-geeni, kertyy kolesterolia lysosomeihin ja endosomeihin selvästi normaalia enemmän. Pelkkä LAMP-1:n puuttuminen ei aiheuta vastaavaa. Toisin kuin LAMP-1-proteiinin, LAMP-2-proteiinin uudelleenekspressio vähentää kolesterolikertymiä soluissa. [16.]

Mutaatiot LAMP-2-geenissä tai sen puute aiheuttavat ihmisillä Danonin tautia, joka periytyy dominoivasti X-kromosomissa. Sille tyypillistä on myöhäisten autofagisten vakuolien kertyminen sydämeen ja lihaksiin, sillä ne eivät fuusoidu normaalisti endosomien ja lysosomien kanssa. Lisäksi tauti aiheuttaa psyykkistä kehitysvammaisuutta. [16; 18.]

2.3 Kolesterolin rakenne

Kolesterolin rakenne on rengasrakenteinen steroidi (kuva 3), joka muodostaa jopa puolet eläinsolujen solukalvoista. Se stabiloi niitä toimien puskurina niiden nestemäisyyden suhteen lämpötilan vaihdella. Se toimii myös lähtöaineena steroidihormoneiden ja sappihappojen valmistuksessa. Solut pystyvät valmistamaan kolesterolia helposti asetyylikoentsyymi A:sta, mutta kolesterolisynteesi kuluttaa energiaa, minkä vuoksi solut säätelevät prosessia solunsisäisen kolesterolipitoisuuden mukaan. Valtaosa syntetisoidusta kolesterolista valmistetaan endoplasmisella kalvostolla, mutta synteesitaso on normaalisti melko matala. [10, s. 620; 11, s. 165, 171, 331, 346; 21; 22, s. 135.]



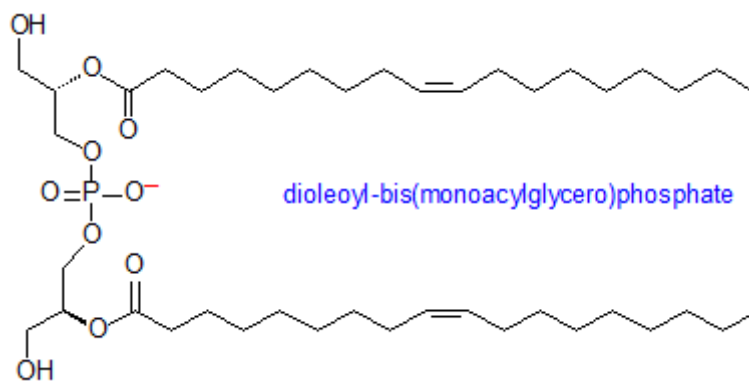
Kuvio 3. Kolesterolin rakenne [23].

Solun ulkopuolella valtaosa kolesterolista esiintyy kolesteroliesterinä. Koska kolesteroli on pääasiassa hydrofobinen molekyyli, se ei liukene vesipohjaisiin nesteisiin ja sen kuljetukseen tarvitaan erilaisia lipoproteiinipartikkeleja. Nämä lipoproteiinit luokitellaan tiheydensä perusteella erilaisiin luokkiin, joiden mukaan arkikielen hyvä ja paha kolesteroli erotellaan. Tiheät HDL-partikkelit kuljettavat kolesterolia pois kudoksista ja harvat LDL-partikkelit kudoksiin. [21; 11, s. 70.]

Suurin osa membraanien rakennusaineeksi tarvittavasta kolesterolista otetaan soluun reseptorivälitteisen endosytoosin avulla. Tällöin LDL-partikkeli kiinnittyy sille spesifisiin reseptoreihin membraanilla, josta se sitten otetaan solun sisälle. Jos solunsisäinen kolesterolipitoisuus nousee liian korkeaksi, sisäänotto lakkaa ja kolesteroli jää solun ulkopuoliseen kudokseen. [10, s. 791; 11, s. 343]

2.4 BMP-fosfolipidit

BMP eli bis(monoasyyliglysero)fosfaatti (kuvio 4) on yleisnimitys soluissa esiintyville fosfolipideille, jotka muodostuvat kahdesta fosfaattiryhmään sitoutuneesta monoasyyliglyserolista. Niitä kutsutaan toisinaan myös lysobisfosfatidihapoiksi (LBPA), mutta termi on harhaanjohtava, sillä kyseessä ei ole lysofosfatidihappo. BMP-fosfolipidit eroavat toisistaan asyyliryhmien pituuden ja tyydyttymättömyyssasteen suhteen. [24.]



Kuvio 4. Dioleyylibis(monoasyyliglysero)fosfaatti [25].

Lysosomien alhaisesta pH-arvosta huolimatta BMP-fosfolipidi esiintyy niissä negatiivisesti varautuneena sen matalasta happovakiosta johtuen ja sijoittuu erityisesti sisemmille membraaneille, joissa hajotus tapahtuu. Negatiivinen varaus mahdollistaa

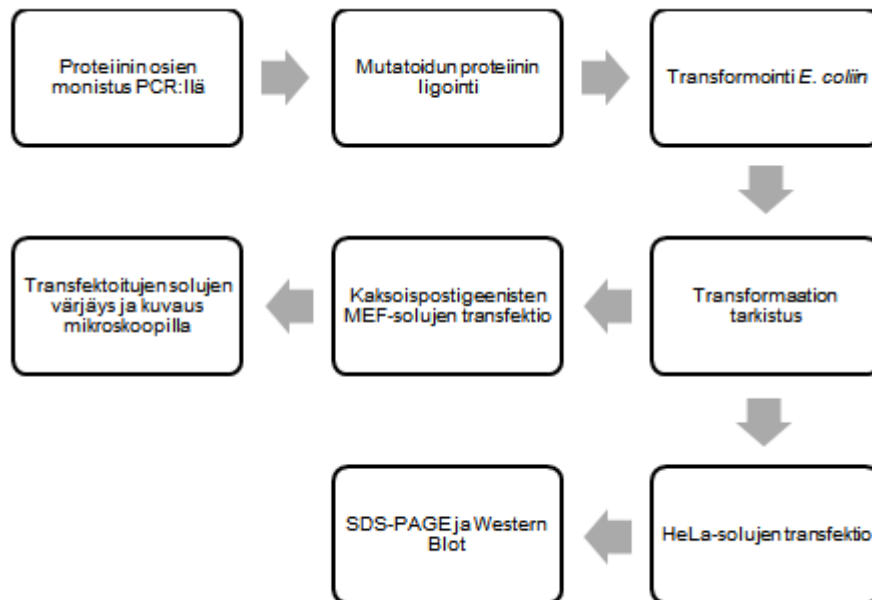
BMP-fosfolipidin toiminnan lysosomeissa. Hydrolaasien tarvitsemat aktivaattoriproteiinit puolestaan esiintyvät lysosomeissa positiivisesti varautuneina. Negatiivisesti varautunut BMP-fosfolipidi vetää entsyymit ja substraatit lähemmäksi mahdollistaen siten hajotuksen. Samalla se suojaa entsyymejä ja hidastaa niiden tuhoutumista. [24.]

BMP-fosfolipidin ja kolesterolin kertymisen välillä on osoitettu olevan selvä yhteys ja on myös ehdotettu, että BMP-fosfolipidi osallistuisi myöhäisten endosomien kolesterolitason säätelyyn. Jos BMP-fosfolipidin määrä kohoaa huomattavasti, vaikuttaa se kolesterolin jakautumiseen yhdessä kolesterolia säätelevien geenien kanssa niiden ekspressiotason madaltuessa. Nämä kertymät voivat jopa estää LDL-kolesterolin kuljetuksen plasmamembraanille. [26; 27.]

BMP-fosfolipidillä on myös merkittävä rooli lipidien ja membraanien hajotuksessa. Se interaktoi aktivaattoriproteiinien kanssa vahvistaen siten saposiinien lipidinuutto-ominaisuuksia. Erityisen voimakas vaikutus on, jos membraanin kolesterolipitoisuus on matala ja BMP-fosfolipidin pitoisuus on korkea. Jos kolesterolipitoisuus on korkea, pakkautuu membraani tiiviimmin, jolloin siltä on vaikeampi irrottaa hajotettavia yhdisteitä. [24.]

3 Materiaalit ja menetelmät

Työn kulku on kuvattu yleisellä tasolla kuviossa 5.



Kuvio 5. Työn kulku

3.1 Kloonaus

pCI-neo-vektoriin kloonattu LAMP-2B-proteiinia koodaava alue monistettiin kahdessa osassa alukkeilla (taulukko 1), joilla sen transmembraanialueella sijaitsevat glysiinit muutettiin valiineiksi. Koska GxxxG-tyyppisillä aminohappoalueilla on osoitettu olevan merkittävä vaikutus transmembraaniproteiinien heliksien interaktioissa [28], epäiltiin myös LAMP-2B-proteiinin transmembraanialueen glysiineillä olevan samankaltainen merkitys.

Taulukko 1. Alukkeiden sekvenssit. Mutatoivat emäkset on merkitty punaisella.

Aluke	Sekvenssi (5'-3')
Xbal	GCA GGT GCT TTC TCT GTC TAG
g---v Forward	GTT GCT GTT CTT TCA GTC TTG ATT ATC GTT ATA GTG ATT GCT TAC C
g---v Reverse	GAC TGA AAG AAC AGC AAC AAT TCG TAAT TAG AAT GGT GTC ATC
NotI reverse	TTA GCG GCC GCT TAG TGT TAC AGA GTC TGA TAT CCA GC

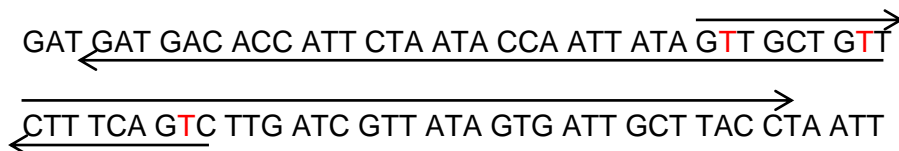
PCR-reaktioiden reaktioseokset ja ohjelmat on kuvattu taulukoissa 2 ja 3. Negatiiviset kontrollit valmistettiin muuten samoin kuin näytteet, mutta reaktioseoksista jätettiin dNTP-seos pois ja se korvattiin vedellä. Monistettujen DNA-jaksojen sijoittuminen toisiinsa nähden lopullisessa tuotteessa on esitetty kuviossa 6

Taulukko 2. PCR-reaktioseos

Reagenssi	Pitoisuus
5 x HF-puskuri	1 x
10 µM dNTP-seos	0,2 µM / nukleotidi
Aluke 1 (XbaI tai g---v Forward)	0,5 µM
Aluke 2 (g---v reverse tai NotI)	0,5 µM
Templaatti-DNA	10 ng
Phusion DNA-polymeraasi (Thermo Scientific)	0,02 U/µl
Vesi	50 µl:aan

Taulukko 3. PCR-ohjelma

Lämpötila	Kesto	
98°C	60 s	
98°C	10 s	} 36 sykliä
62°C	30 s	
72°C	10 s	
72°C	10 min	



Kuvio 6. Monistettujen tuotteiden homologiset alueet sekä proteiiniin tehnyt mutaatiot. Mutatoidut emäkset on merkitty punaisella. Yläpuolelle merkitty aluke on g—v forward ja alapuolelle merkitty g—v reverse.

Monistus tarkistettiin 2 % agarosigeelillä. Tuotteet puhdistettiin GeneJet Gel Extraction –kitillä (Thermo Scientific). Puhdistettujen tuotteiden konsentraatiot tarkistettiin 2 % agarosigeelillä. Tuotteet yhdistettiin taulukon 4 mukaisesti käyttäen Phusion-DNA-polymeraasia. Valmistettiin reaktioseos ensin ilman alukkeita ja ajettiin ohjelma (taulukko 5), minkä jälkeen lisättiin alukkeet ja monistettiin koko tuotetta PCR-reaktiolla (taulukko 6).

Taulukko 4. Polymerisointireaktioseos

Reagenssi	Konsentraatio
5 x HF-buffer (Thermo Scientific)	1 x
10 mM dNTP-seos	0,2 µM per nukleotidi
Tuote 1	10 ng
Tuote 2	10 ng
Phusion DNA-polymeraasi	0,02 U/µl
XbaI-aluke	0,5 µM
NotI-aluke	0,5 µM
Vesi	50 µl:aan

Taulukko 5. Polymerisointiohjelma

Lämpötila	Aika
98°C	10 s
60°C	30 s
59°C	30 s
58°C	30 s
57°C	30 s
56°C	30 s
55°C	30 s
54°C	30 s
53°C	30 s
72°C	15 min

Taulukko 6. Monistusohjelma

Lämpötila	Aika	
98°C	10 s	
62°C	30 s	40 sykliä
72°C	15 s	
72°C	15 min	

Tarkistettiin tuotteen monistuminen 2 % agarosigeelielektroforeesilla ja puhdistettiin tuote GeneJET Gel Extraction –kitillä valmistajan ohjeiden mukaisesti. Digestoitin puhdistettu tuote FD *XbaI*- ja FD *NotI* –restriktioentsyymeillä (Thermo Scientific). Puhdistettiin digestoitu tuote 2% agarosigeeliltä GeneJET Gel Extraction –kitillä.

Vektori käsiteltiin samoilla restriktioentsyymeillä ja lisäksi alkaalisella fosfataasilla, jolla saatiin poistettua linearisoidun vektorin päiden vapaat fosfaatit. Näin ehkäistiin vektorin ligoitumista itsensä kanssa. Vektori puhdistettiin 1% agarosigeeliltä samalla tavoin kuin inserttikin.

Ligaatioseosten koostumukset on esitetty taulukossa 7. Inkuboitin seosta yön yli +14 °C:ssa.

Taulukko 7. Ligaatioseokset

	Reaktio 1	Reaktio 2	Kontrollireaktio
50 ng/μl vektori	1,8 μl (90 μg)	1,7 μl (85 μg)	2 μl
6 ng/μl insertti	2,3 μl (13,8 μg)	4,3 μl (25,7 μg)	-
1000 U/μl T4 DNA-ligaasi	1 μl	1 μl	1 μl
10x T4 DNA-ligaasipuskuri	1 μl	1 μl	1 μl
Vesi	3,9 μl	2 μl	6 μl

Tehtiin transformaatio kaupallisia Stellar-soluja (Clontech) käyttäen valmistajan ohjeiden mukaisesti. Tehtiin lisäksi negatiivinen kontrolli, jossa lisättiin soluille vettä ligaatioseoksen sijaan. Maljattiin soluseosta 100 μl LB-amp-maljoille (ampisilliinia 100 μg/ml), sentrifugoitiin jäljelle jääneitä soluja 1 min 9 500 g:n voimalla, poistettiin supernatantti ja lisättiin 50 μl S.O.C.-liuosta (Clontech). Resuspensoitiin solut ja maljattiin koko seos LB-amp-maljoille. Inkuboitiin yön yli +37 °C:ssa.

Siirrostettiin kaksi pesäkettä uudelle maljalle ja inkuboitiin yön yli +37 °C:ssa. Eristettiin näistä viljelmistä plasmidit NucleoSpin Plasmid QuickPure –kitillä (Macherey-Nagel). Tarkistettiin eristys 1 % agarosigeelillä. Digestoitiin eristetty plasmidi FD *Pst*I-entsyymillä (Thermo Scientific). Tarkistettiin digestio 2 % agarosigeelillä.

Siirrostettiin bakteerikasvustoa 100 ml:aan LB-lientä, johon lisättiin ampisilliinia siten, että sen konsentraatio oli 100 μg/ml. Inkuboitiin kasvustoa yön yli +37 °C:ssa 200 rpm:n ravistuksessa. Eristettiin plasmidit NucleoBond Xtra Midi –kitillä. Tarkistettiin plasmidien konsentraatit fotometrillä. Lähetettiin plasmidit sekvensoitavaksi, jotta varmistuttaisiin niiden sekvenssistä.

3.2 Transfektio

Sulatettiin nestetypestä ampulli LAMP-1- ja LAMP-2-kaksoispoistogeenisiä MEF-soluja (hiiren alkion fibroblasteja), joita kasvatettiin T25-soluviljelypulloissa +37 °C:ssa 5 %:n CO₂-pitoisuudessa Dulbecco's Modified Eagle –mediassa (Sigma Aldrich), johon oli lisätty naudan sikiön seerumia (Sigma Aldrich) 10 %:ksi, L-glutamiinia (Sigma Aldrich), penisilliiniä (Biochrom) ja streptomysiiniä (Hoechst).

Trypsinoitiin MEF-solut ja tehtiin transfektiota varten 3 cm maljoja, joiden pohjalla oli peitinlaseja. Kahdelle maljalle siirrettiin 50 000 ja kahdelle 100 000 solua. Seuraavana päivänä soluille tehtiin transfektio jetPRIME-kitillä (Polyplus transfection) valmistajan

ohjeiden mukaisesti. DNA:na käytettiin mutatoitua LAMP-2B-proteiinia sekä kontrollina LAMP-2A-proteiinia. Kasvatettiin 50 000 solun maljoja 2 vrk ja 100 000 solun maljoja 1 vrk.

3.3 Immunovärjäys

Poistettiin MEF-soluilta kasvatusmedia, pestiin ne kerran 1 x fosfaattipuskuroidulla saliinilla (PBS, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄) ja kiinnitettiin solut inkuboimalla niitä 30 min PBS-liuokseen valmistetussa 4 % paraformaldehydissä (PFA, JT Baker). Poistettiin PFA-liuos ja lisättiin 0,85 ml 1:100-laimennettua Filipiniä (Sigma Aldrich). Filipin on yhdistelmä sienistä eristettyjä yhdisteitä, joka tarttuu vapaaseen kolesteroliin ja fluoresoi UV-valossa. Tämän jälkeen näytteitä pidettiin folioon käärittynä aina kun mahdollista, sillä Filipin on valoherkkää. Inkuboitiin huoneenlämmössä 30 min, kerättiin väriaine talteen, lisättiin 1 ml PBS-liuokseen valmistettua 0,12 % glysiiniä (Sigma Aldrich) ja inkuboitiin 10 min huoneenlämmössä. Pestiin solut kertaalleen 1 x PBS-liuoksella.

Siirrettiin peitinlasit solupuoli ylöspäin muoviasiaan, jonka pohjalle oli asetettu kostutettu Whatmann-paperi ja parafilmiä. Pipetoitiin kunkin lasin päälle 80 µl 1 PBS:ään valmistettua 3 % naudanseerumialbumiinia (BSA, Bovogen). Inkuboitiin 15 min huoneenlämmössä.

Valmistettiin seos primäärisistä vasta-aineista PBS:ään valmistettuun 3% BSA:han taulukon 8 mukaisesti. LAMP-2-vasta-aine oli saatu lahjoituksena M. Schwahen tutkimusryhmältä Kielistä, Saksasta ja LIMP-2-vasta-aine S. Gruenbergiltä Genevestä, Sveitsistä. Pipetoitiin peitinlaseille 30 µl vasta-aineseosta kullekin lukuun ottamatta yhtä kontrollia kustakin konstruktista. Inkuboitiin parafilmillä solupuoli alaspäin huoneenlämmössä 1 h.

Taulukko 8. Primääriset vasta-aineet

Vasta-aine	Laimennossuhde	Tuottoeläin	Valmistaja
LAMP-2 Abl93	1:20	Rotta	Abcam
Limp2-Ab	1:500	Kani	Abcam
6C4 LBPA	1:150	Hiiri	Echelon

Pestiin peitinlasit 1 x PBS-liuoksella 12-kuoppalevyllä neljästi. Valmistettiin seos sekundäärisistä vasta-aineista 3% BSA-liuokseen taulukon 9 mukaisesti. Pipetoitiin

peitinlaseille 30 µl vasta-aineseosta kullekin. Inkuboitiin parafilmillä solupuoli alaspäin huoneenlämmössä 1 h.

Taulukko 9. Sekundääriset vasta-aineet

Vasta-aine	Konsentraatio	Laimennossuhde	Tuottoeläin	Valmistaja
Alexa Fluor 488, Goat anti-rat IgG	2 mg/ml	1:500	Vuohi	Life Technologies
Alexa Fluor 594, Goat anti-rabbit IgG	2 mg/ml	1:500	Vuohi	Life Technologies
Alexa Fluor 647, Goat anti-mouse IgG	2 mg/ml	1:500	Vuohi	Life Technologies

Pestiin peitinlasit 12-kuoppalevyllä kahdesti 1 x PBS-liuoksella ja kertaalleen 3 % BSA-liuoksella. Lisättiin kuoppiin aiemmin talteenotettu Filipin ja inkuboitiin 30 min huoneenlämmössä. Pestiin peitinlasit kertaalleen 1 x PBS-liuoksella.

Sekoitettiin keskenään 100 µl DABCOa (Sigma Aldrich) ja 1 ml Mowiolia (Calbiochem). Pipetoitiin seosta objektilasille 8 µl per peitinlasi ja asetettiin peitinlasit pisaroiden päälle solut alaspäin. Inkuboitiin huoneenlämmössä yön yli, jotta seos jähmettyisi. Siirrettiin lasit +4 °C:seen odottamaan kuvaamista.

3.4 Mikroskopointi

Kuvattiin MEF-soluja Olympus AX70 –mikroskoopilla. Valittiin kuvattavat kohdat siten, että niissä näkyi vähintään yksi ekspressoiva ja ei-ekspressoiva solu. Otettiin kuvat 60-kertaisella suurennoksella suotimilla, joiden läpäisemä valo oli aallonpituuksiltaan 350 nm, 488 nm, 594 nm ja 647 nm.

3.5 Western blot

Jaettiin HeLa-soluja 12-kuoppalevyille siten, että kolmessa kuopassa oli 100 000 solua. Kunkin kuopan pohjalle asetettiin peitinlasi. Transfektoitiin solut seuraavana päivänä kaupallisella jetPRIME–kitillä erilaisia DNA:n ja transfektioreagenssin suhteita kokeillen taulukon 10 mukaisesti. Muilta osin noudatettiin valmistajan ohjeita.

Taulukko 10. HeLa-transfektiot western blot –analyysia varten

Näyte	DNA	Transfektio-reagenssi
1	1 µg	2 µl
2	1 µg	4 µl
3	0,5 µg	2 µl

Poistettiin peitinlasit kuopista ja värjättiin niillä kasvavat solut seuraavana päivänä LAMP-2- ja Alexa Fluor 488 –vasta-aineilla samalla tavoin kuin kohdassa 3.3. Tutkittiin fluoresenssimikroskoopilla transfektioefekvenssiä.

Tehtiin myös negatiivinen ja positiivinen kontrolli. Negatiivisena kontrollina käytettiin transfektoimattomia HeLa-soluja ja positiivisena kontrollina LAMP-2A- ja LAMP-2B-positiivisia MEF-soluja. Kumpiakkin jaettiin 100 000 solua 3 cm:n maljalle. Kontrolleja inkuboiitiin 1 vrk ja näytteitä yhteensä 6 vrk.

Proteiinipitoisuuden määrittäminen

Poistettiin soluilta media ja lisättiin kuoppiin 50 µl ja maljoille 250 µl 2 x complete-reagenssia (Roche Diagnostics), joka oli valmistettu 50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 5 mM Mg₂Cl ja 1 % Triton X-100 sisältävään puskuriin. Nostettiin solut jälle ja kaavittiin ne irti maljojen pohjista.

Valmisteltiin BCA-kitti (BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific) käyttöä varten. Pipetoitiin 96-kuoppalevyille kaksi rinnakkaista kalibroitisuoraa, joiden konsentraatiot olivat 1; 0,5; 0,25; 0,125 ja 0,0625 mg/ml. Tehtiin näytteistä 5 x laimennokset ja pipetoitiin kutakin 2 x 25 µl kuoppalevyille. Kaikkiin kuoppiin lisättiin 200 µl BCA-kitin puskuria. Inkuboiitiin levyä 1 h +37 °C:ssa. Mitattiin kuoppien absorptiot aallonpituudella 560 nm Multiskan EX -laitteella (Labsystems).

Western blot

Valmistettiin 10 % SDS-PAGE-geeli. Valmistettiin näytteet lisäämällä 40 µg:aan proteiinia (negatiivinen kontrolli 13 µg) 6 x näytepuskuria. Pipetoitiin geelille kokomarkkeri (Page Ruler Plus Protein Ladder, Thermo Scientific) ja näytteet. Ajettiin 80 V:n jännitteellä, kunnes pienimmät kokomarkkerit olivat ajautuneet ulos geelistä.

Kasteltiin PVDF-kalvo kastamalla se 15 s:ksi metanoliin, 2 min:ksi veteen ja 10 min:ksi 1 x blottauspuskuriiin. Kasteltiin myös karhunkielet ja Whatmann-paperit 1 x

blottauspuskurilla ja koottiin blottauskasetti. Blotattiin 1 h 45 min käyttäen 200 mA:n virtaa.

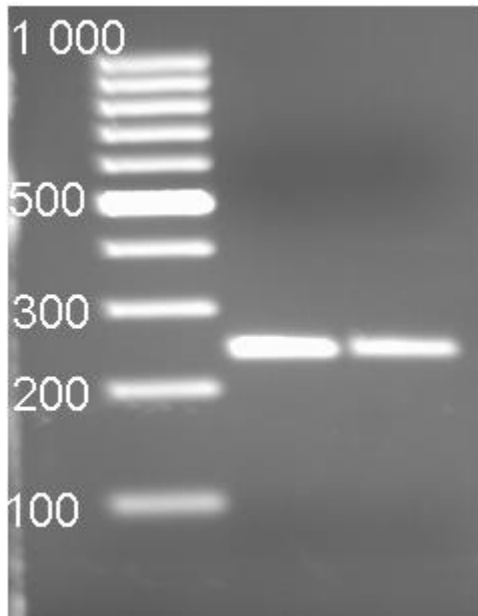
Valmistettiin 1 x TBST-puskuri ja blokattiin kalvo asettamalla se keinutukseen puskurissa yön ylitse. Valmistettiin 1 x TBST-puskuriin 100-kertainen laimennos LAMP-2-vasta-aineesta. Siirettiin kalvo falcon-putkeen ja lisättiin 2 ml vasta-ainelaimennosta. Inkuboitiin pyörityksessä 1 h. Pestiin kalvo kolmesti keinuttamalla sitä 5 min kerrallaan 5 % rasvattomassa maidossa, joka oli valmistettu 1 x TBST-puskuriin. Valmistettiin Goat-anti-rat-piparjuuriperoksidaasivasta-aineesta 5000-kertainen laimennos maitoseokseen. Värjättiin kalvo sekundäärisellä vasta-aineella inkuboimalla sitä 1 h pyörityksessä. Pestiin kalvo samoin kuin edellä sekä myös kolmasti 10 min kerrallaan 1 x TBST:llä, johon oli lisätty 0,2 % Tween20:ä.

Aktivoitiin piparjuuriperoksidaasi Immobilon Western Chemiluminescent HRP -kitillä (Merck Millipore) pipetoimalla valmista reagenssia 500 µl muovikelmulle ja asettamalla blottauskalvo sen päälle. Kuvattiin kalvo UVP-laitteistolla (UVP).

4 Tulokset ja niiden tarkastelu

Kloonauksen tuloksena saatiin luotua pCI-neo-vektoriin LAMP-2B-geenin versio, jonka transmembraanialueen glysiinit oli muutettu valiineiksi.

Polymerisoidun tuotteen monistuksen tulos on esitetty kuviossa 7.



Kuvio 7. Mutatoitu ja polymerisoitu LAMP-2B-geenin osa monistuksen jälkeen 2 % agarosigeelillä.

4.1 Immunofluoresenssikuvien tarkastelu

Näytteiden lukumäärät on esitetty taulukossa 11.

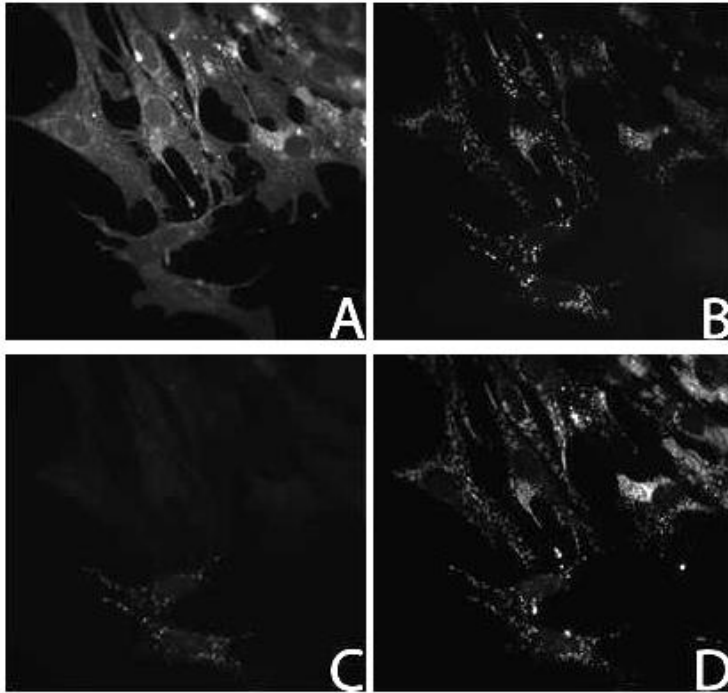
Taulukko 11. Näytteiden lukumäärät

Näyte	Lukumäärä (n)
LAMP-2A, 1 vrk	14
LAMP-2B, 1 vrk	28
LAMP-2A, 2 vrk	12
LAMP-2B, 2 vrk	7

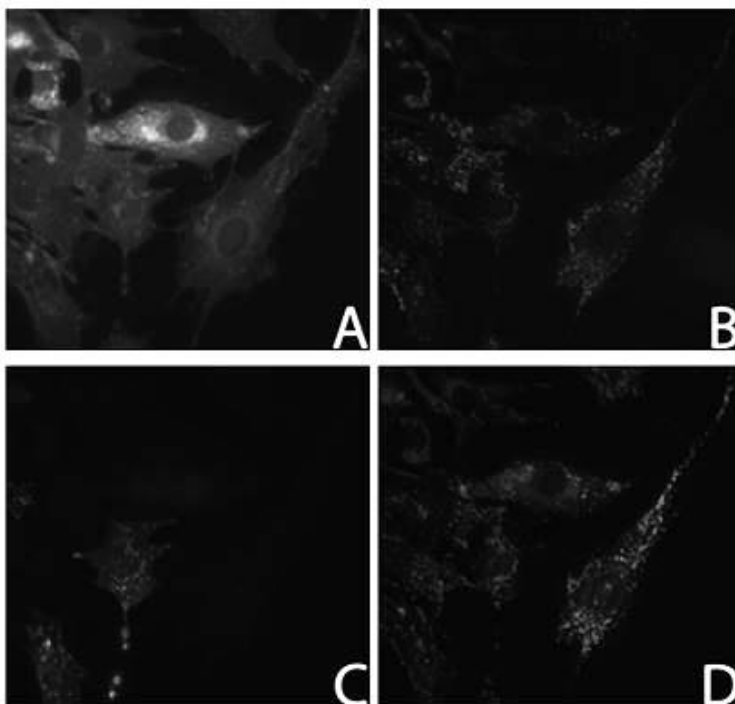
Kuvien analysointiin käytettiin Image-Pro Plus 7- sekä Adobe Photoshop CS 6 – ohjelmia. Kuvat käsiteltiin neljän kuvan sarjoina, aina kustakin kohdasta otetut kuvat kerrallaan.

Laadittiin kuvista maskit LIMP-värjäyksen perusteella ja asetettiin se muiden kuvien päälle, jolloin jäljelle jäivät vain lysosomialueet. Rajattiin kukin kuvassa näkyvä solu omaksi alueekseen. Analysoitiin havaittu valomäärä kustakin solusta sekä koko solusta että pelkästään lysosomialueista kolesteroli-, LAMP- ja BMP-värjäyksistä.

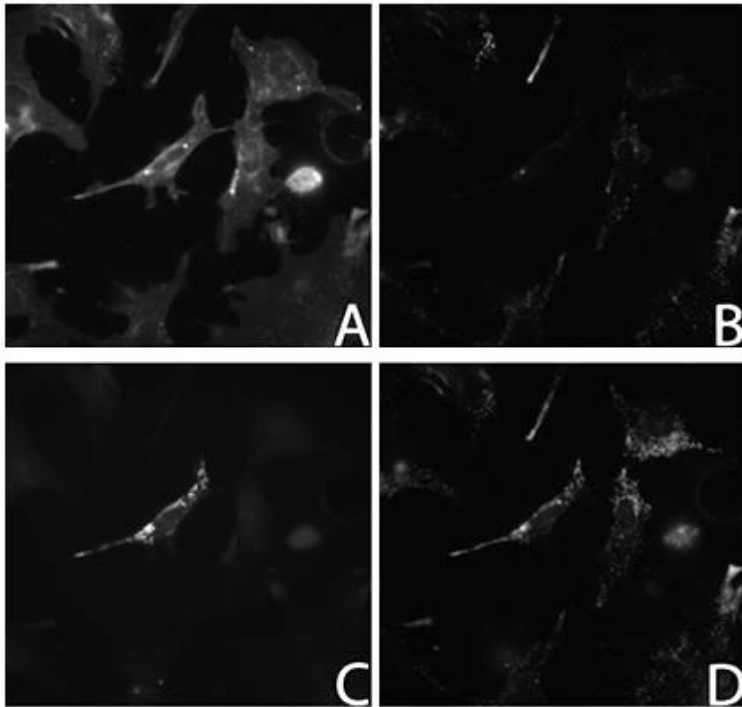
Kuvioissa 8 – 11 on esitetty tyypilliset edustajat näytteille ja kontrolleille sekä 1 että 2 vrk:n inkubaatioajoilla.



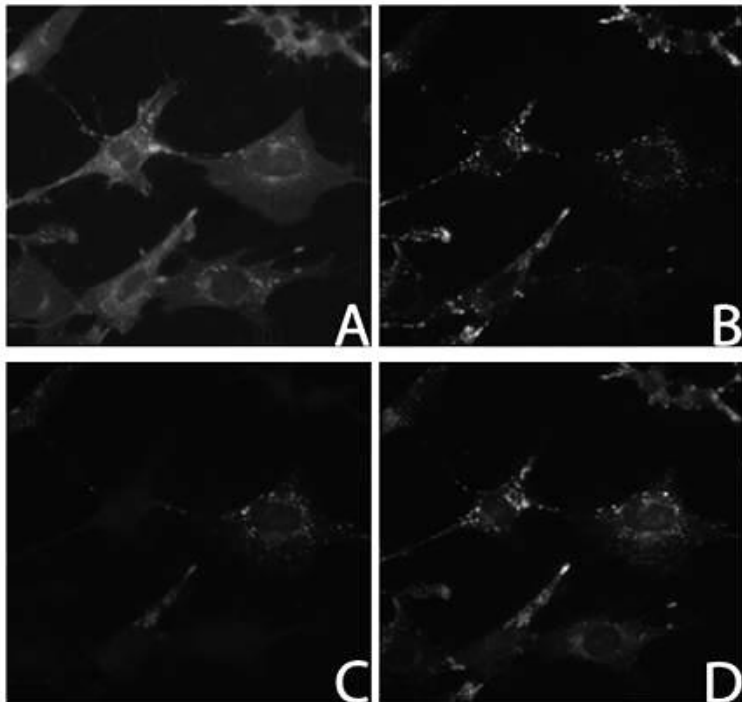
Kuvio 8. LAMP-2A- ja LAMP-2B-kaksoispoistogeeniset MEF-solut transfektoituna mutatoitulla LAMP-2B-proteiinilla 1 vrk:n ekspression jälkeen 60-kertaisella suurennoksella kuvattuna. A – kolesteroli, B – BMP, C – mutatoitu LAMP-2B, D – LIMP.



Kuvio 9. LAMP-2A- ja LAMP-2B-kaksoispoistogeeniset MEF-solut transfektoituna LAMP-2A-proteiinilla 1 vrk:n ekspression jälkeen 60-kertaisella suurennoksella kuvattuna. A – kolesteroli, B – BMP, C – LAMP-2A, D – LIMP.



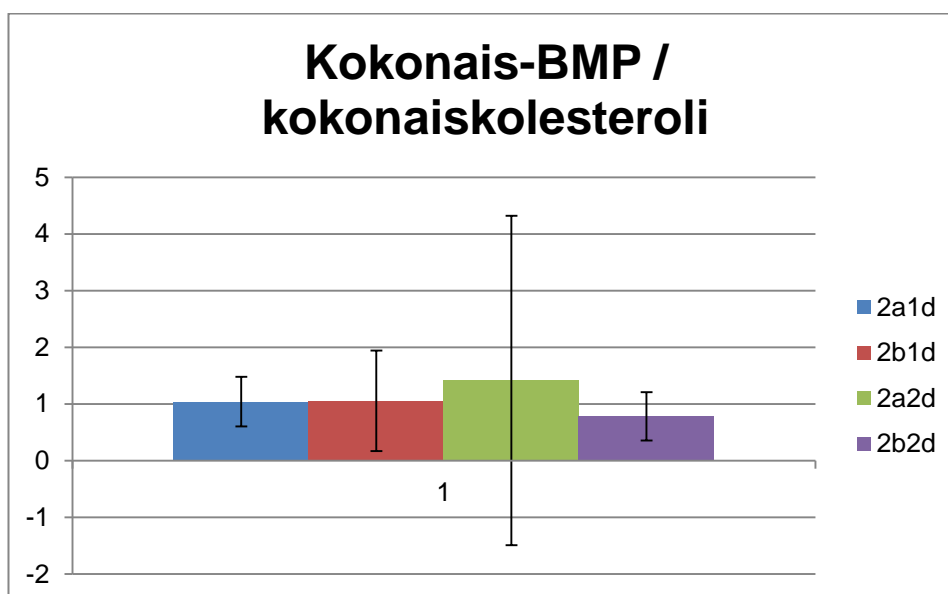
Kuvio 10. LAMP-2A- ja LAMP-2B-kaksoispoistogeeniset MEF-solut transfektoituna mutatoitulla LAMP-2B-proteiinilla 2 vrk:n ekspression jälkeen 60-kertaisella suurennoksella kuvattuna. A – kolesteroli, B – BMP, C – mutatoitu LAMP-2B, D – LIMP.



Kuvio 11. LAMP-2A- ja LAMP-2B-kaksoispoistogeeniset MEF-solut transfektoituna LAMP-2A-proteiinilla 2 vrk:n ekspression jälkeen 60-kertaisella suurennoksella kuvattuna. A – kolesteroli, B – BMP, C – LAMP-2A, D – LIMP.

Saadut arvot syötettiin Microsoft Excel –ohjelmaan, jolla tutkittiin yhdisteiden määrien korrelaatiota toisiinsa ja solun kokoon nähden. Kustakin kuvasta verrattiin ensin ekspressoivia ja ei-ekspressoivia soluja toisiinsa, minkä jälkeen näitä lukuja verattiin toisiinsa. Samanlaisista kuvista saaduista luvuista laskettiin keskiarvo ja keskihajonta. Mutatoidulla LAMP-2B-proteiinilla saatuja arvoja verrattiin LAMP-2A-proteiinin arvoihin, jotta nähtäisiin, onko proteiinien erolla vaikutusta yhdisteiden kertymiseen soluissa.

Vertailu solun BMP- ja kolesterolimäärän välillä on esitetty kuviossa 12. Koska keskihajonta on hyvin suuri, ei tuloksilla ole tilastollista merkittävyyttä. Loput tulokset on esitetty liitteessä 1.



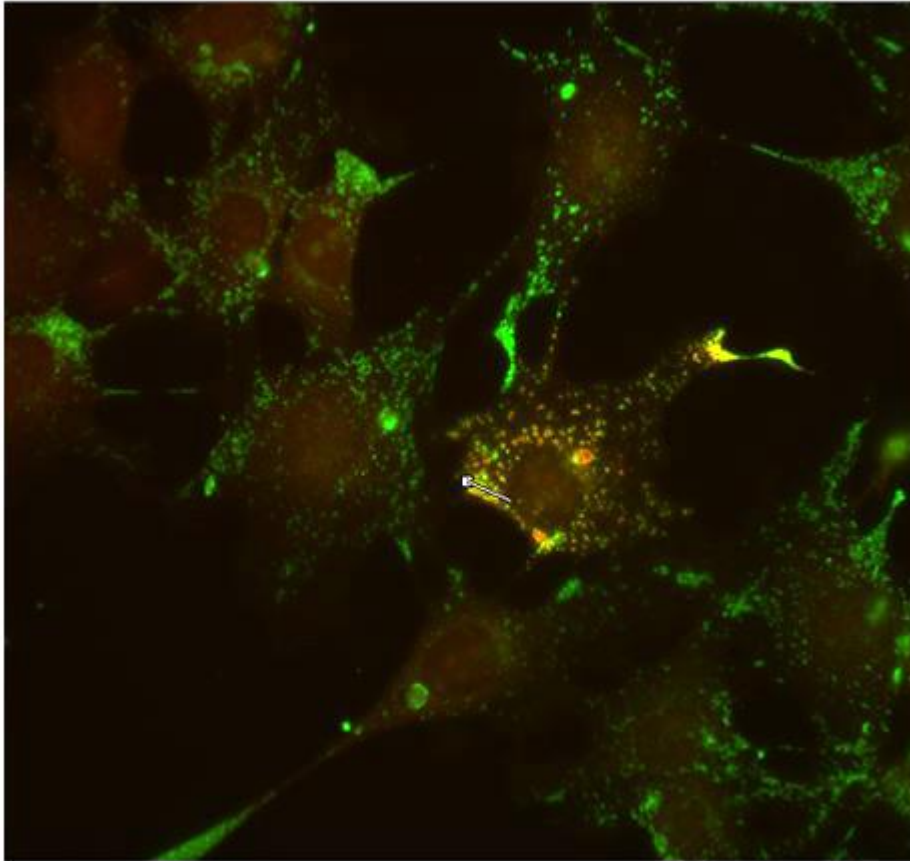
Kuvio 12. BMP:n ja kolesterolin määrien suhde. Näytteiden lukumäärät vasemmalta lukien 14, 28, 12, 7.

Kun yhdisteiden intensiteettejä verrattiin toisiinsa, ei näytteiden ja kontrollien välillä havaittu eroa kolesterolin tai BMP:n kertymisessä soluihin, sillä vaihtelut rinnakkaisnäytteiden välillä olivat todella suuria. Näin ollen tarvittaisiin huomattavasti suurempi näytemäärä, jotta yksittäiset ääriarvot menettäisivät merkitystään.

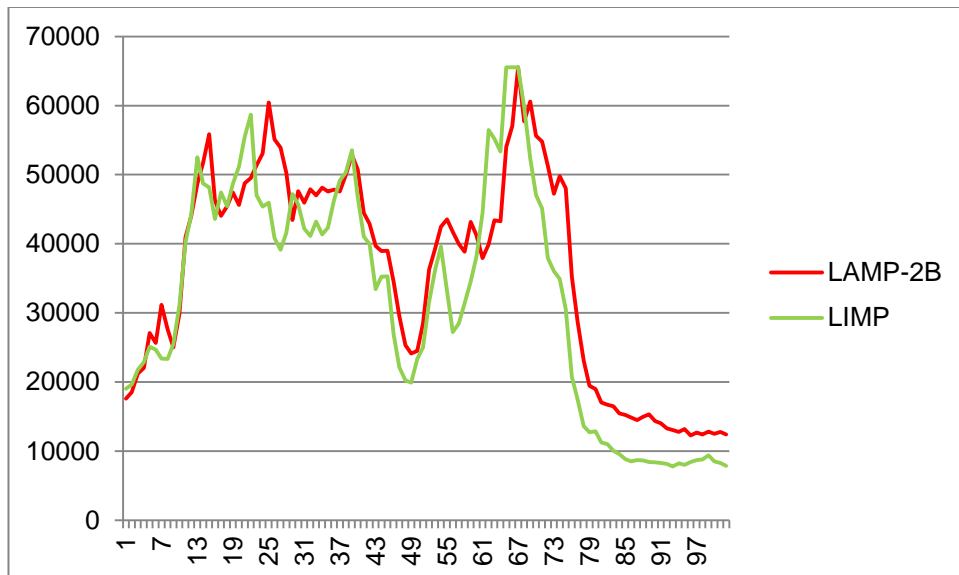
4.2 Kolokalisaatio

Tehtiin Adobe Photoshop CS 6 –ohjelmalla kuvia, joiden avulla verrattiin eri yhdisteiden kirkkautta ja sijaintia toisiinsa. Vertailuja tehtiin LAMP- ja LIMP-proteiinien sekä LIMP-proteiinin ja BMP-fosfolipidin välillä. Koska LIMP-proteiinia esiintyy aina lysosomeissa, käytettiin sitä niiden paikantamiseen ja verrattiin sen sijaintia LAMP-proteiinin tai BMP-fosfolipidin sijaintiin. Jos LAMP-proteiini sijoittuu lysosomeihin, se sijoittuu päällekkäin LIMP-proteiinin kanssa.

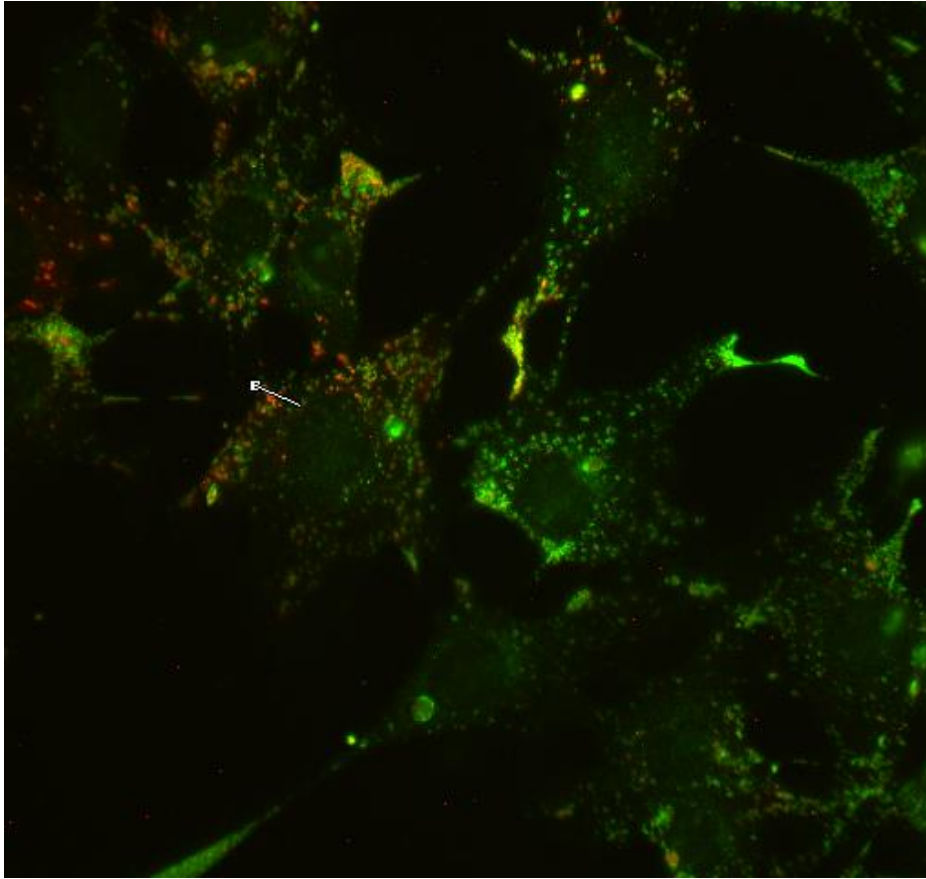
Toinen yhdiste asetettiin punaiseksi ja toinen vihreäksi. Eri värien intensiteettiä ja sijaintia tutkittiin Image-Pro Plus 7 –ohjelmalla. Näin saaduista luvuista piirrettiin kuvaajat Microsoft Excel –ohjelmalla. Kuvioissa 13 – 16 on esitetty tulokset näytteelle 2 vrk:n ekspressiolla. Kuvat kontrolleista sekä näytteestä 1 vrk:n ekspressiolla ovat liitteessä 2.



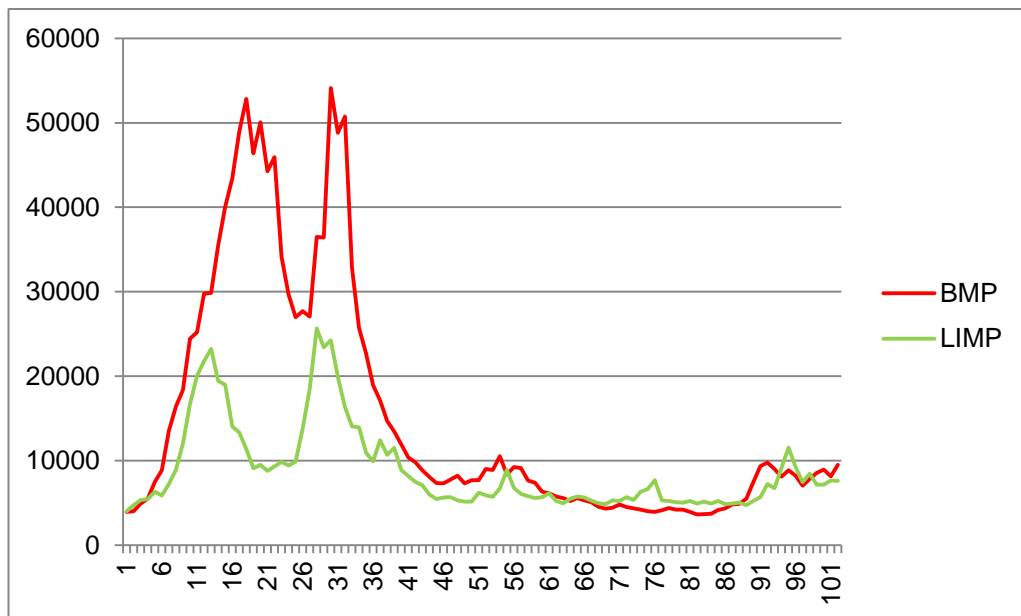
Kuvio 13. LAMP-2B ja LIMP 2 vrk:n ekspressioajalla. LAMP-2B on merkitty punaisella ja LIMP vihreällä.



Kuvio 14. LAMP-2B:n ja LIMP:n intensiteetit kuvioon 10 merkityllä janalla.



Kuvio 15. BMP ja LIMP näytteessä 2 vrk:n ekspressiolla. BMP on merkitty kuvioon punaisella ja LIMP vihreällä.



Kuvio 16. BMP ja LIMP kuvioon 12 merkityllä janalla.

Koska intensiteettihiikkien huiput eivät asetu päällekkäin, ei LAMP-proteiini kuvien perusteella sijoitu soluissa päällekkäin LAMP-proteiinin eikä BMP-fosfolipidin kanssa. Tämä voi aiheutua joko proteiinista, jolloin sen kuljetus lysosomeihin kestää siihen tehtyjen mutaatioiden vuoksi pidempään kuin solujen on annettu ekspressoitua, tai transfektiosta itsestään, jolloin solut eivät toimi normaalisti ja siksi ehdi kuljettaa proteiinia lysosomeihin.

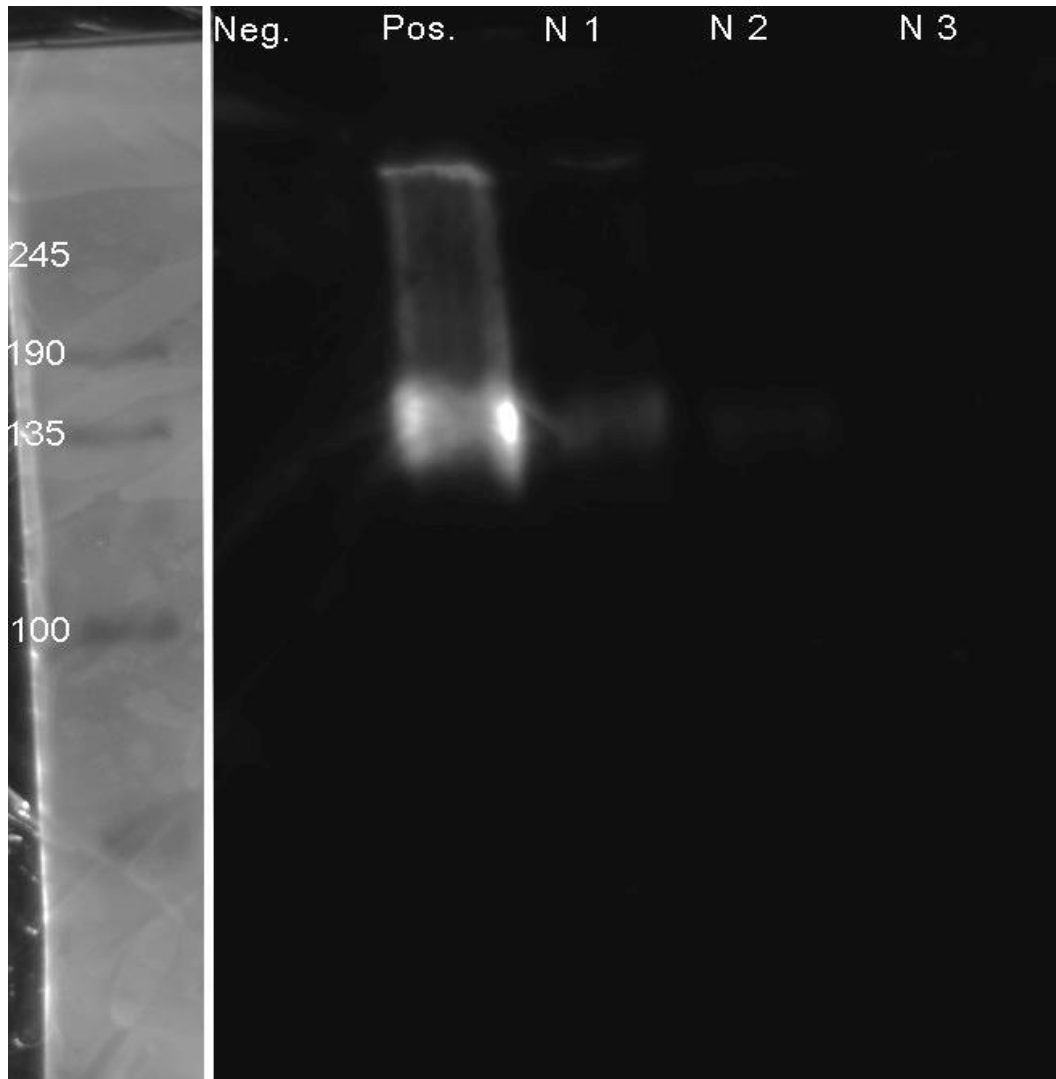
4.3 Western blot -analyysin tulokset

Negatiivisena kontrollina käytettiin transfektoimattomia HeLa-soluja, positiivisena LAMP-1- ja LAMP-2-proteiinien geenit sisältäviä MEF-soluja ja näytteinä hetkellisesti transfektoituja HeLa-soluja. Transfektioissa kokeiltiin erilaisia DNA- ja transfektioireagenssikonentraatioita, jotka esitettiin taulukossa 10. Taulukossa 12 on esitetty näytteiden keskimääräiset proteiinikonentraatiot.

Taulukko 12. Näytteiden proteiinikonentraatiot

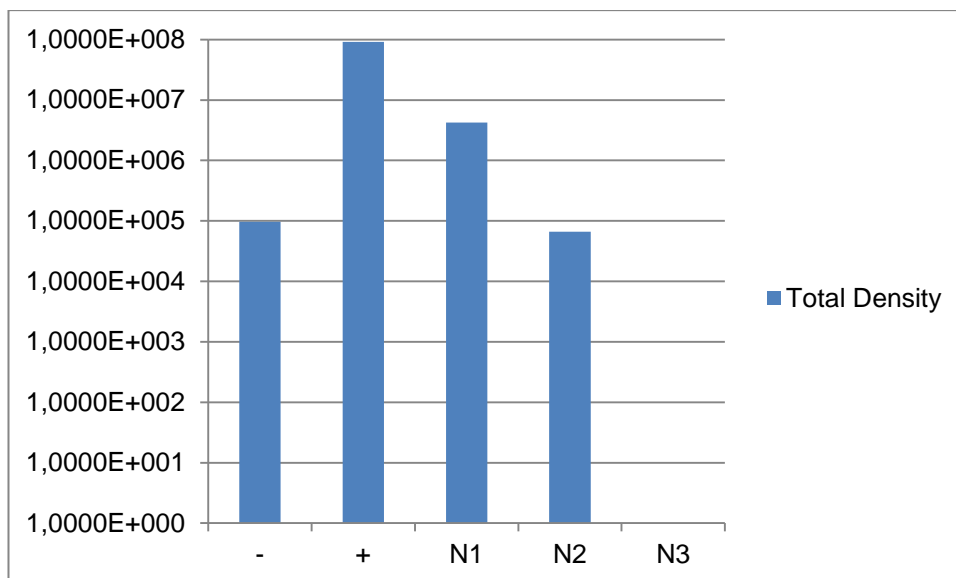
Näyte	Keskimääräinen absorbanssi	Alkuperäinen konsentraatio (mg/ml)
Neg. kontrolli	0,2005	0,43
Posit. kontrolli	0,5000	1,74
1	1,244	5,00
2	1,402	5,69
3	1,323	5,35

Valmis western blot on esitetty kuviossa 17.



Kuvio 17. Western blot. Vasemmalta lukien negatiivinen kontrolli (transfektoimattomat HeLa-solut), positiivinen kontrolli (LAMP-1 ja LAMP-2-proteiinieja stabiilisti ekspressoivat MEF-solut), näyte 1 (1 μg DNA:ta ja 2 μl transfektioreagenssia), näyte 2 (1 μg DNA:ta ja 4 μl transfektioreagenssia) ja näyte 3 (0,5 μg DNA:ta ja 2 μl transfektioreagenssia).

Kuvasta nähdään, että proteiinin koko on noin 135 kDa, mikä vastaa myös normaalin LAMP-2B-monomeerin kokoa. Näytteiden intensiteetit laskettiin UVP-ohjelmalla ja ne on esitetty kuviossa 18.



Kuvio 18. Western blot –näytteiden intensiteetit. Vasemmalta lukien negatiivinen kontrolli (transfektoimattomat HeLa-solut), positiivinen kontrolli (LAMP-1 ja LAMP-2-proteiineja stabiilisti ekspressoivat MEF-solut), näyte 1 (1 µg DNA:ta ja 2 µl transfektioreagenssia), näyte 2 (1 µg DNA:ta ja 4 µl transfektioreagenssia) ja näyte 3 (0,5 µg DNA:ta ja 2 µl transfektioreagenssia).

Koska näytteinä käytettiin transientisti transfektoituja soluja, on niiden antama intensiteetti pienempi kuin positiivisen kontrollin, jossa jokainen solu tuottaa tutkittavaa proteiinia. Näytteiden intensiteetit pienenevät samalla tavoin kuin niiden transfektoitumisfrekvenssitkin, jolloin niiden LAMP-2B-pitoisuus vaihtelee, vaikka kokonaisproteiinimäärä pysyykin samana. Negatiivisen kontrollin antama korkea arvo aiheutuu muovikelmun epätasaisuuksista, joita intensiteetin laskeva ohjelma ei osaa ohittaa.

5 Yhteenveto

Työn tavoitteena oli tutkia LAMP-2B-proteiinin mutaatioiden vaikutusta kolesterolin ja BMP-fosfolipidin kertymiseen. Tämä tehtiin tutkimalla transfektoituja soluja immunofluoresenssimikroskopiolla, jolloin saatiin näkyviin LAMP-2-proteiinit, vapaa kolesterolin ja BMP-fosfolipidi.

Työn puitteissa onnistuttiin luomaan haluttu LAMP-2B-mutantti ja transfektoimaan se onnistuneesti sekä MEF- että HeLa-soluihin. Nykyisellä näytemäärällä ei kuitenkaan saada näkyville mitään eroa. Tämä johtuu ensisijaisesti näytemäärän pienuudesta,

jolloin yksittäiset ääriarvot vääristävät kunkin näyteryhmän keskiarvoa ja nostavat keskihajonnan erittäin korkeaksi. Niinpä mahdolliset erot hukkuvat tilastolliseen epävarmuuteen.

Jotta vaikutuksista voitaisiin sanoa mitään tilastollisesti merkittävää, tulisi joko luoda stabiilisti ekspressoivat solulinjat tai valmistaa runsaasti uusia transientisti transfektoituja näytteitä.

Lähteet

- 1 Suomen virallinen tilasto (SVT). Kuolemansyyt vuonna 2012 [verkkodokumentti]. Päivitetty 30.12.2014 [viitattu 30.9.2014]. Saatavissa: http://www.stat.fi/til/ksyyt/2012/ksyyt_2012_2013-12-30_kat_001_fi.html
- 2 THL. Sydän- ja verisuonitaudit [verkkodokumentti]. Päivitetty 1.10.2014 [viitattu 7.10.2014]. Saatavissa: <http://www.thl.fi/fi/aiheet/tietopaketit/sydan-ja-verisuonitaudit>.
- 3 Mustajoki, Pertti. Kolesterolit [verkkodokumentti]. Julkaistu 5.5.2014 [viitattu 30.9.2014]. Saatavissa: http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00035
- 4 Reunanen, Antti. Verenkiertoelinsairaudet [verkkodokumentti]. Julkaistu 18.7.2005 [viitattu 30.9.2014]. Saatavissa: http://www.terveyskirjasto.fi/terveysportti/tk.koti?p_artikkeli=suo00025
- 5 Huttunen, Jussi. Työikäisten sepelvaltimotautikuolleisuus [verkkodokumentti]. Julkaistu 7.2.2012 [viitattu 30.9.2014]. Saatavissa: http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=ldk00253
- 6 Huttunen, Jussi. Seerumin kolesterolit miehillä [verkkodokumentti]. Julkaistu 24.9.2014 [viitattu 30.9.2014]. Saatavissa: http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=ldk00298
- 7 Tarnanen, Kirsi ym. Dyslipidemiat (veren poikkeavat rasva-arvot, mm. kolesterolit) kuriin potilaan ja lääkärin yhteistyöllä [verkkodokumentti]. Julkaistu 2.5.2013 [viitattu 30.9.2014]. Saatavissa: http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=khp00047
- 8 Duodecim. Statiini [verkkodokumentti]. 2014 [viitattu 30.9.2014]. Saatavissa: http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=ltt03229
- 9 Saftig, P. & Klumperman, J. 2009. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins. *Nature Review Molecular Cell Biology*. Volume 10, Issue 9, s. 623-635
- 10 Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J. ym. 2008. *Molecular Biology of the Cell*. 5. painos. New York: Garland science, Taylor & Francis Group.
- 11 Hardin, J., Bertoni, G. & Kleinsmith, L. 2011. *Becker's World of the Cell*. 8. painos. Pearson.
- 12 Hansen, T. & Johansen, T. Following autophagy step by step [verkkodokumentti]. BioMed Central Ltd. Julkaistu 2.6.2011 [viitattu 8.10.2014]. Saatavissa: <http://www.biomedcentral.com/1741-7007/9/39>
- 13 Glick, D., Barth, S. & Macleod, K. 2010. Autophagy: cellular and molecular mechanism. *J Pathol*. May; 221(1): 3-12.

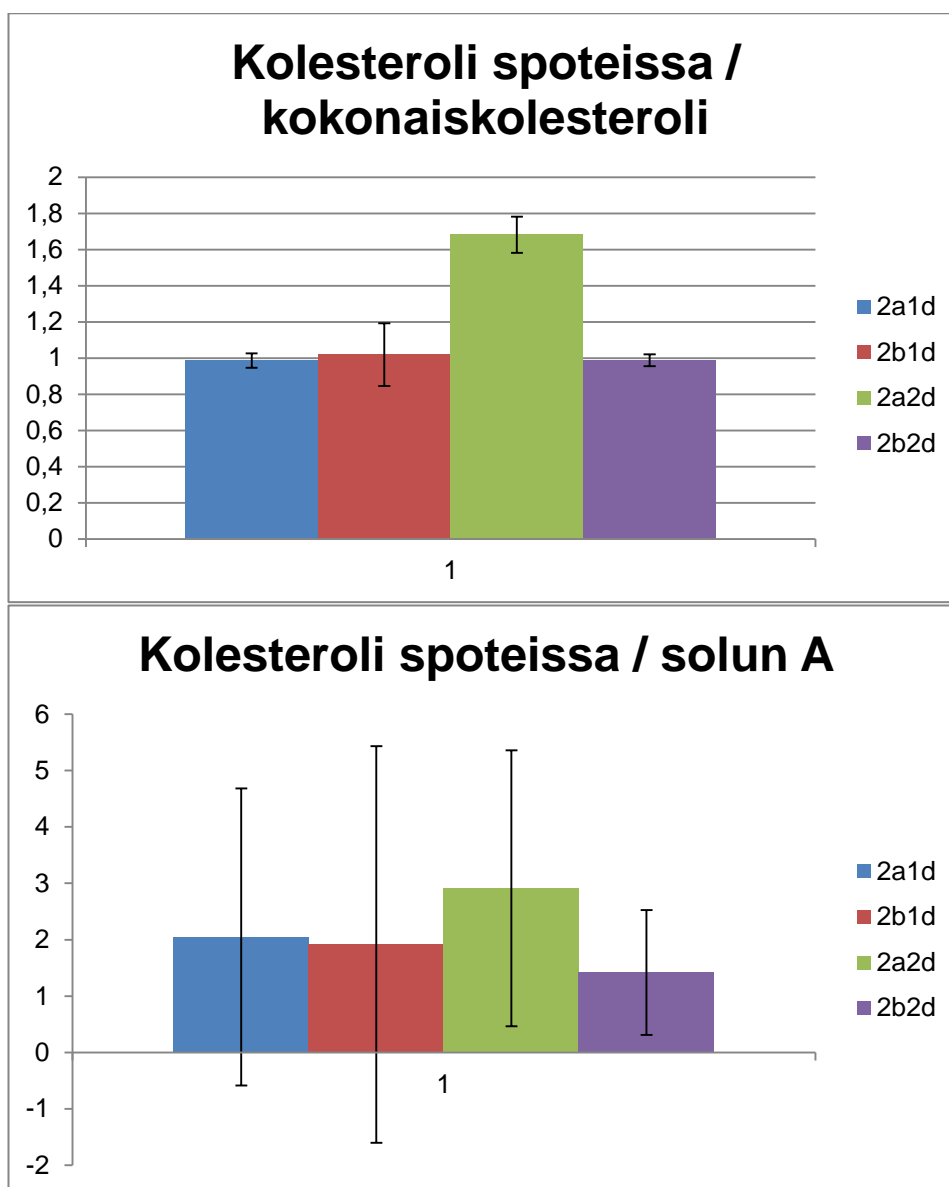
- 14 Rasko, T. & Russ, J. Systematic analysis of protein-protein interactions involved in autophagy and neurodegenerative disease processes [verkkodokumentti]. Julkaistu 2014 [viitattu 8.10.2014]. Saatavissa: https://www.mdc-berlin.de/10987285/en/research/research_teams/proteomics_and_molecular_mechanisms_of_neurodegenerative_diseases/research/research2
- 15 Mizushima, N. 2007. Autophagy: process and function. GENES & DEVELOPMENT 21: 2861-2873. Cold Spring Laboratory Press.
- 16 Schneede, A., Schmidt, CK., Hölttä-Vuori, M. ym. 2011. Role for LAMP-2 in endosomal cholesterol transport. Journal of Cellular and Molecular Medicine. Volume 15, Issue 2, s. 280-295.
- 17 Mironov, A. & Pamelka, M. 2008. The Golgi Apparatus. Itävalta: Springer-Verlag/Wien.
- 18 Badadani, M. 2012. Autophagy Mechanism, Regulation, Functions and Disorders. ISRN Cell Biology. Volume 2012.
- 19 Uniprot [verkkodokumentti]. Julkaistu 2014 [viitattu 7.10.2014]. Saatavissa: <http://www.uniprot.org/blast/?about=P13473-2>
- 20 Eskelinen, EL. Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. Molecular Aspects of Medicine. Volume 27, Issue 5-6, s. 495 – 502
- 21 Solunetti. Kolesteroli ja sen johdannaiset [verkkodokumentti]. Julkaistu 2006 [viitattu 17.9.2014]. Saatavissa: http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/kolesteroli_ja_sen_johdannaiset/2/
- 22 Heino, J., Vuento, M. Solubiologia. 2002. 1. painos. Porvoo: WSOY
- 23 Cholesterol [verkkodokumentti]. Viitattu 6.10.2014. Saatavissa: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=5997>
- 24 Gallala, H., Sandhoff, K. 2010. Biological Function of the Cellular Lipid BMP—BMP as a Key Activator for Cholesterol Sorting and Membrane Digestion. Neurochemical Research. Volume 36, Issue 9, s. 1594 – 1600
- 25 The AOCS Lipid Library. Bis(monoacylglycero)phosphate [verkkodokumentti]. Päivitetty 26.5.2014 [viitattu 6.10.2014]. Saatavissa: <http://lipidlibrary.aocs.org/Lipids/lysobpa/index.htm>
- 26 Luquain-Costaz, C. ym. 2013. Bis(monoacylglycero)phosphate accumulation in macrophages induces intracellular cholesterol redistribution, attenuates liver-X receptor/ATP-Binding cassette transporter A1/ATP-binding cassette transporter G1 pathway, and impairs cholesterol efflux. Arterioscler Thromb Vasc Biol. Aug 2013; Volume 33, Issue 8, s. 1803–1811.
- 27 Hullin-Matsuda, F. ym. 2009. BMP – a peculiar phospholipid to control the fate of cholesterol: Implication in pathology. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids. Volume 81, Issue 5-6, s. 313-324.

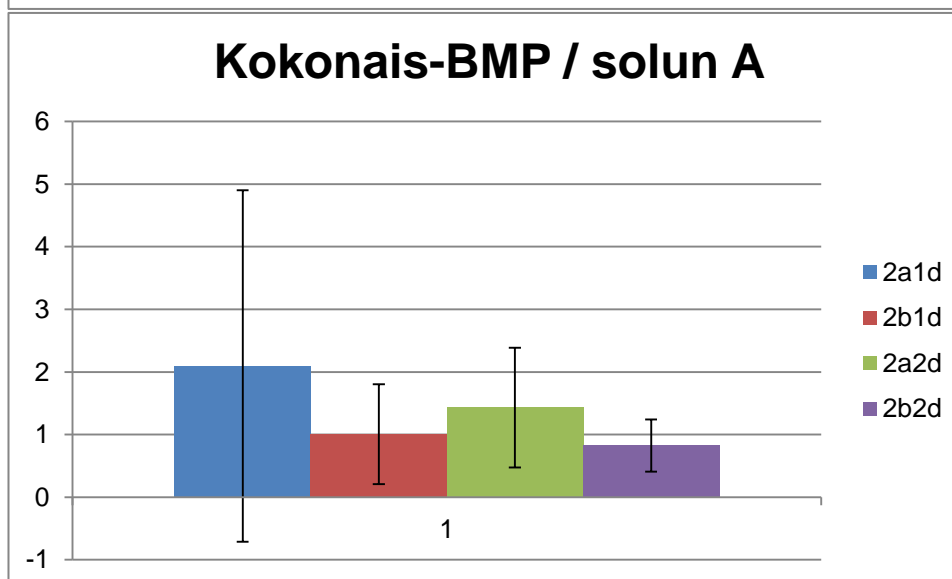
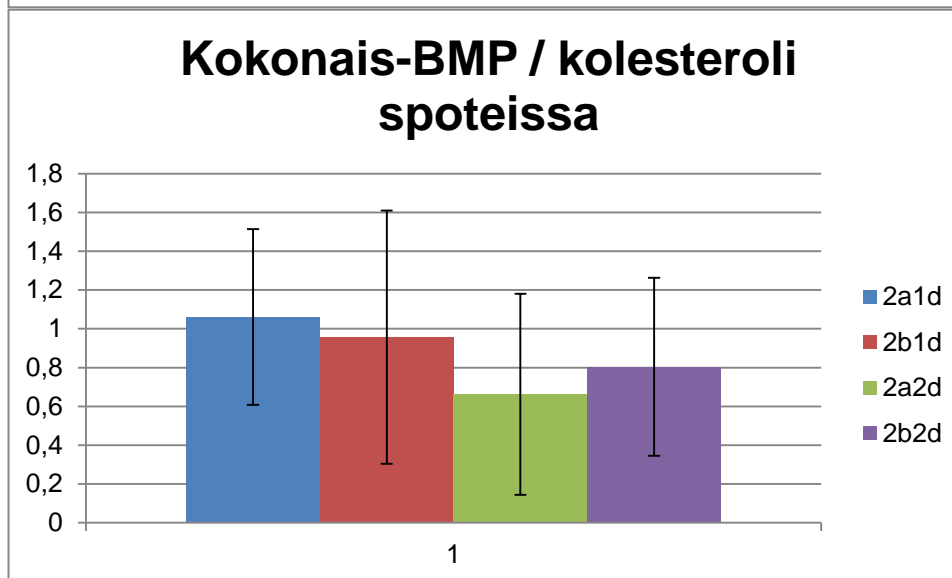
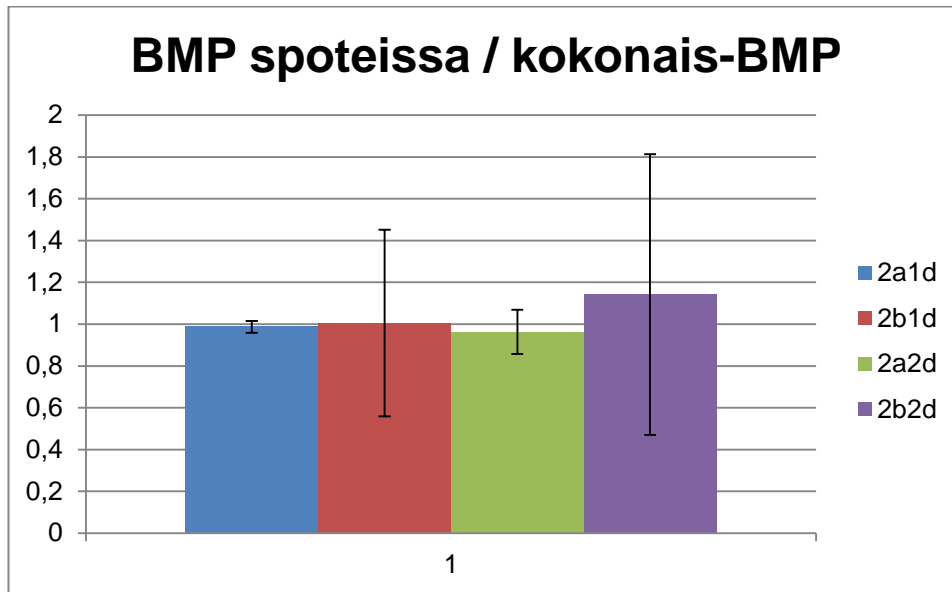
- 28 Senes, A., Engel, D. DeGrado, W. 2004. Folding of helical membrane proteins: the role of polar, GxxxG-like and proline motifs. *Current Opinion in Structural Biology*. Volume 14, Issue 4, s. 465-479

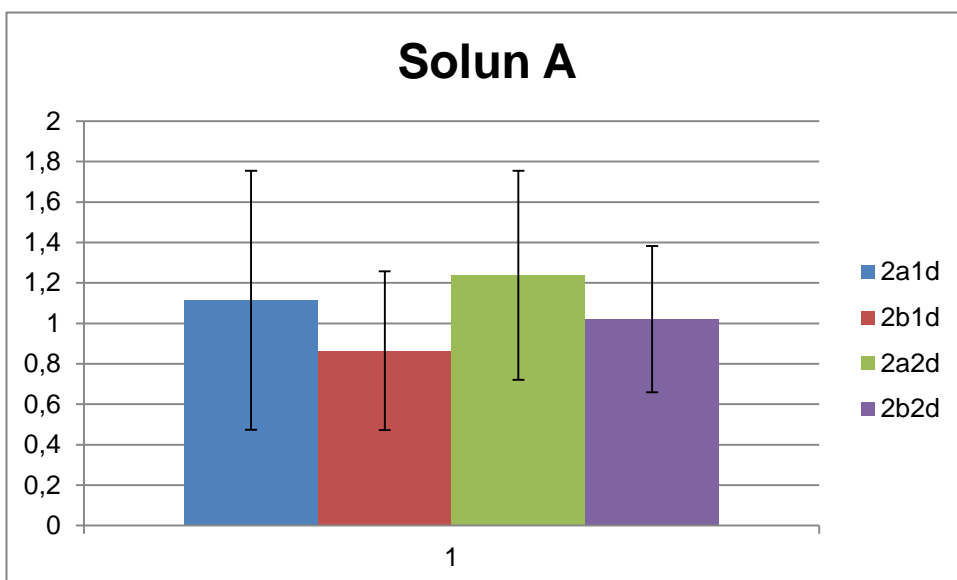
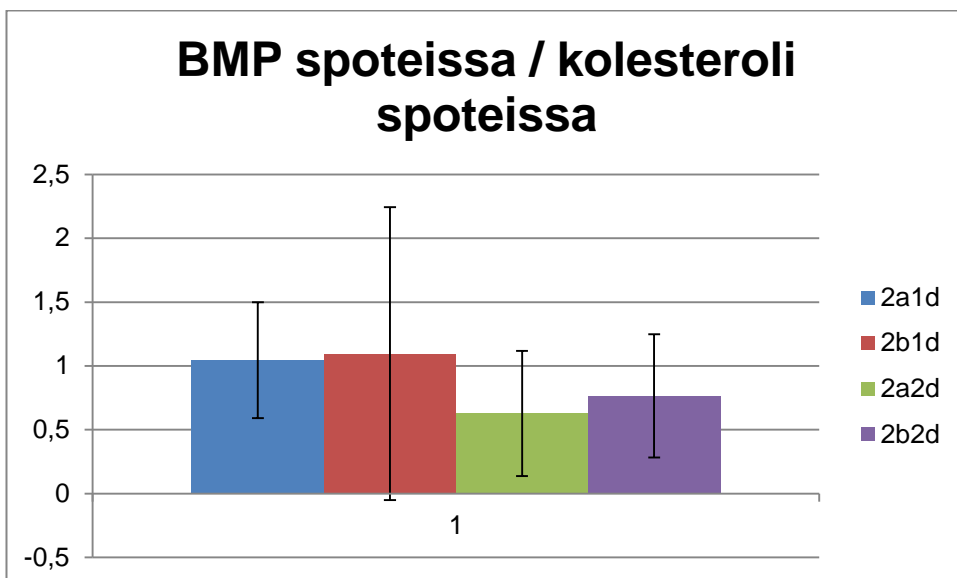
Mikroskopiointikuvien analyysit

Kuvissa on esitetty kuvan yläreunassa mainittu suhde kunkin proteiinin ja ekspressioajan osalta. Nämä luvut on saatu vertaamalla mikroskooppikuvista saatuja lukuja toisiinsa. Ensin on verrattu kunkin kuvan ekspressoivia ja ei-ekspressoivia soluja toisiinsa. Sen jälkeen näistä suhteista on laskettu keskiarvot ja keskihajonnat, jotka on esitetty seuraavissa kuvissa.

Näytteiden lukumäärät kussakin kuvassa vasemmalta lukien ovat 14, 28, 12 ja 7.



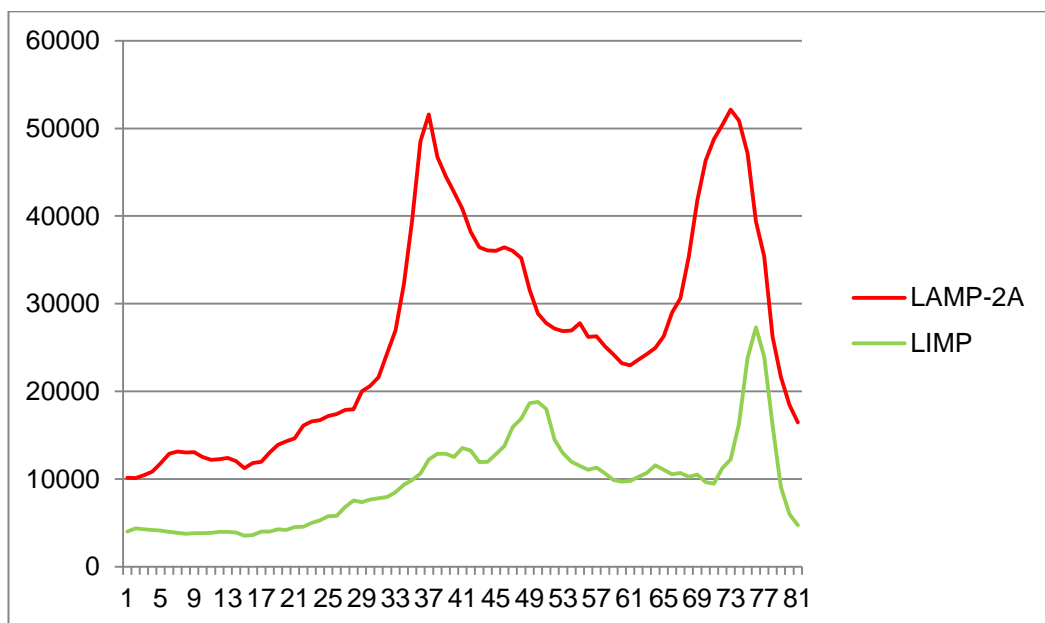
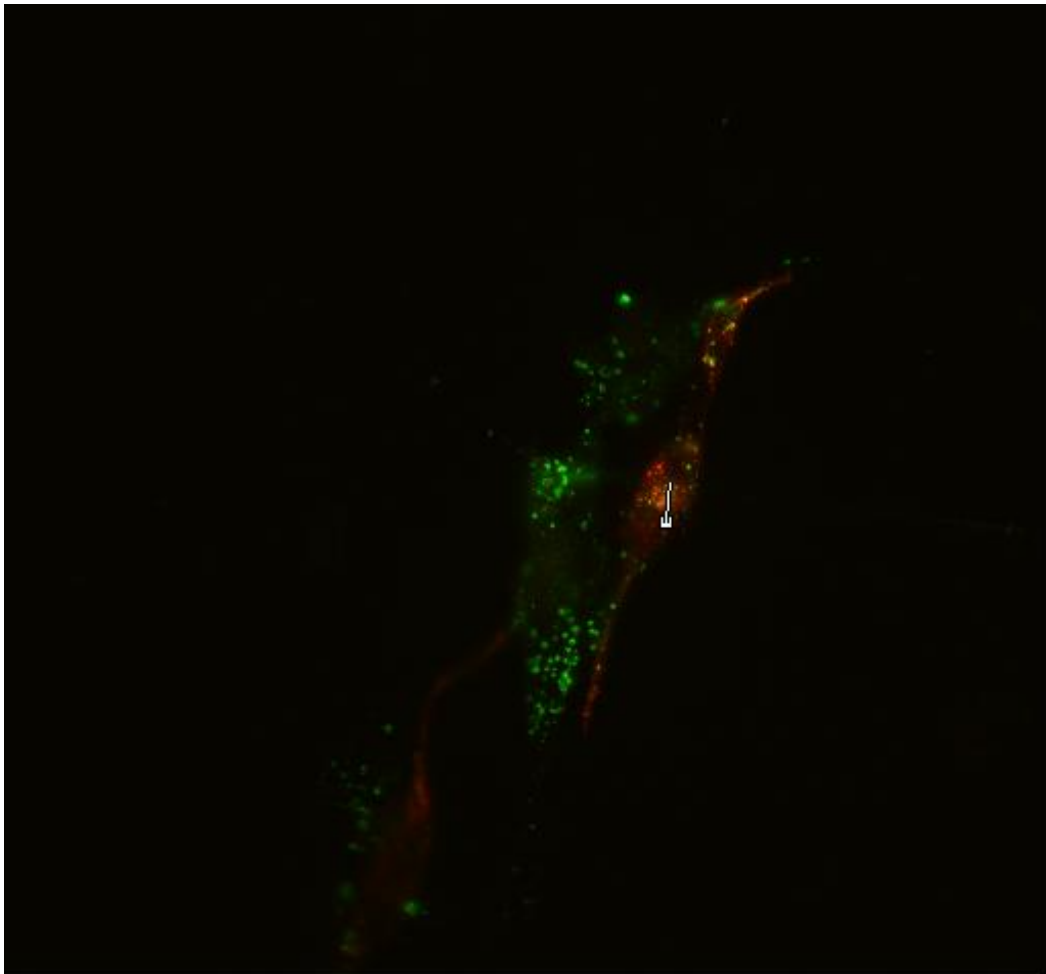




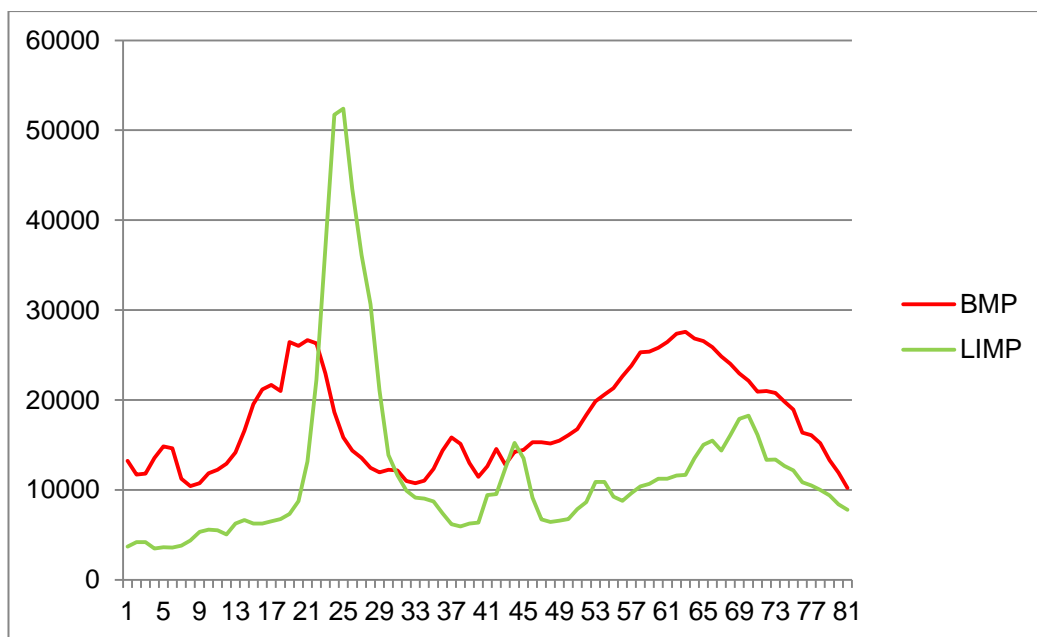
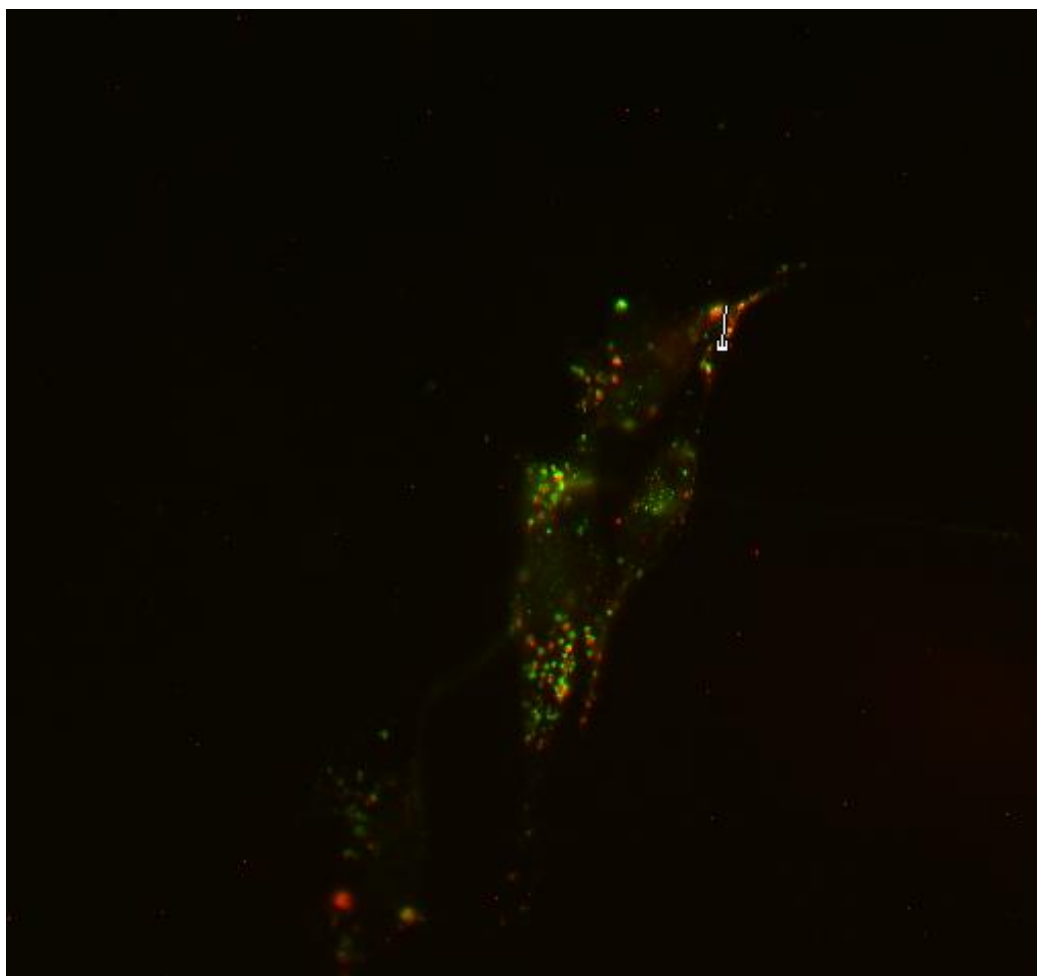
Kolokalisaatiokuvien analyysit

Kuvissa on esitetty LAMP:n ja LIMP:n sekä BMP:n ja LIMP:n lokalisaatio ja kirkkaus toisiinsa verrattuna. LIMP on merkitty vihreällä.. Kuvat on järjestetty niin, että kutakin solukuvaa seuraa siihen merkityn janan intensiteettikuvaaja.

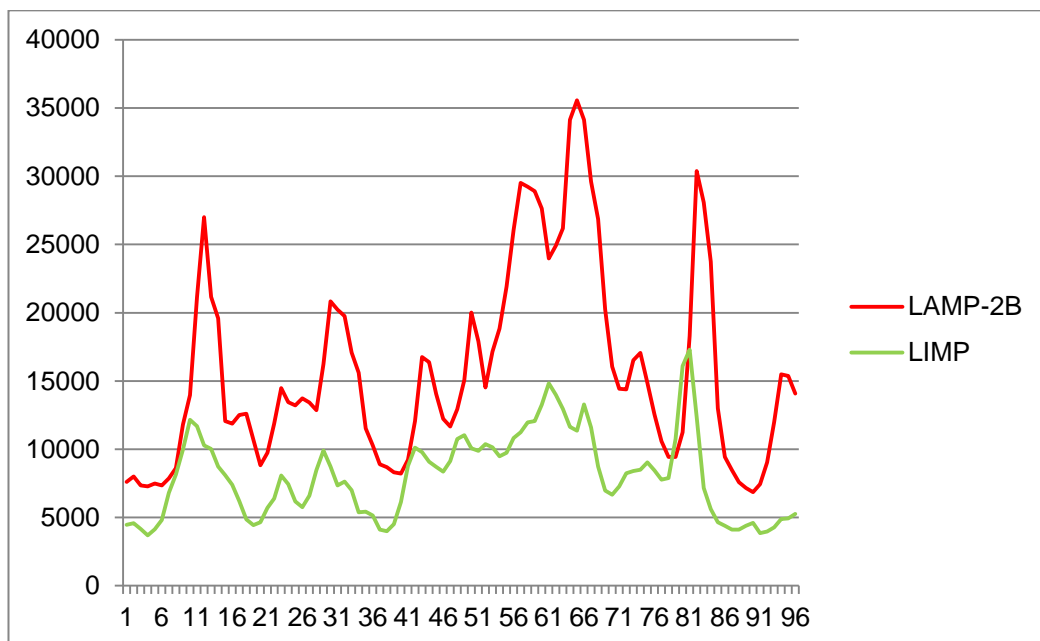
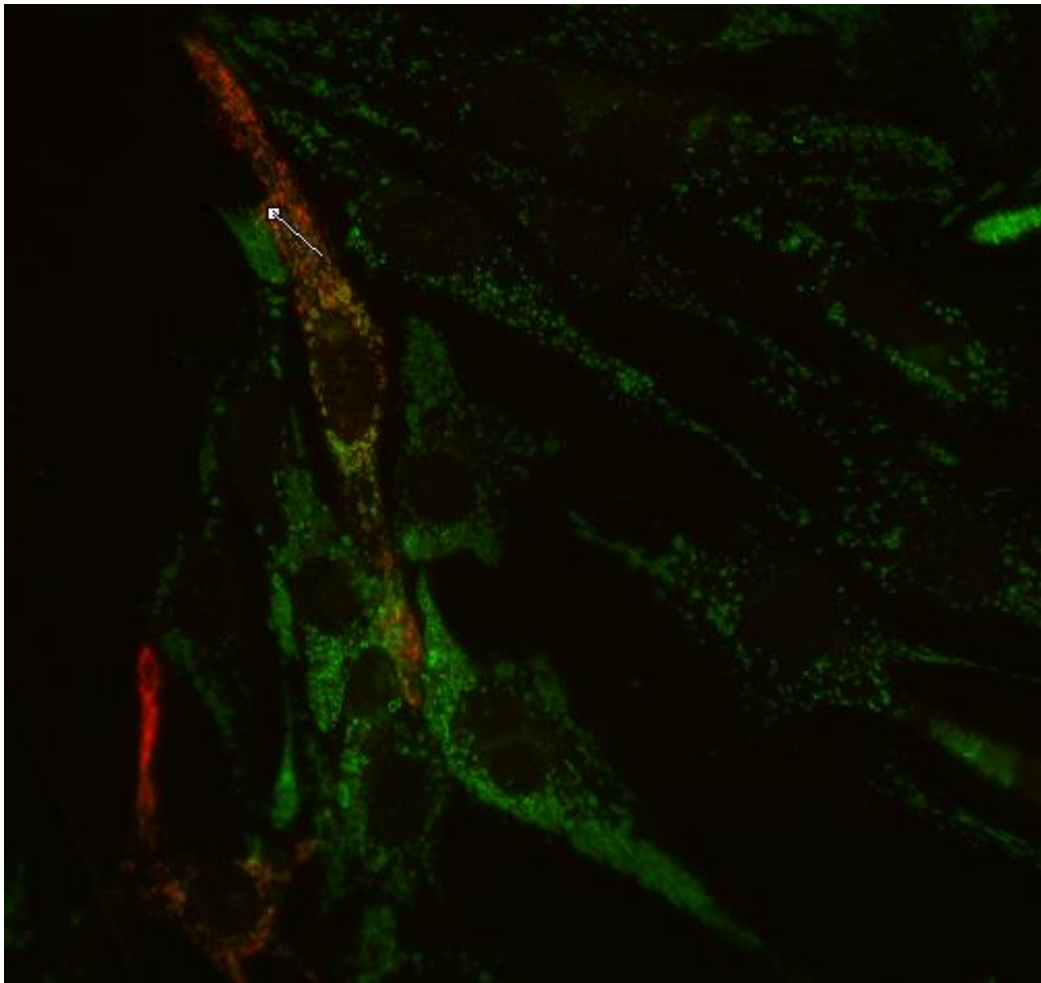
LAMP-2A 1 vrk:n ekspressiolla – LAMP-2A ja LIMP



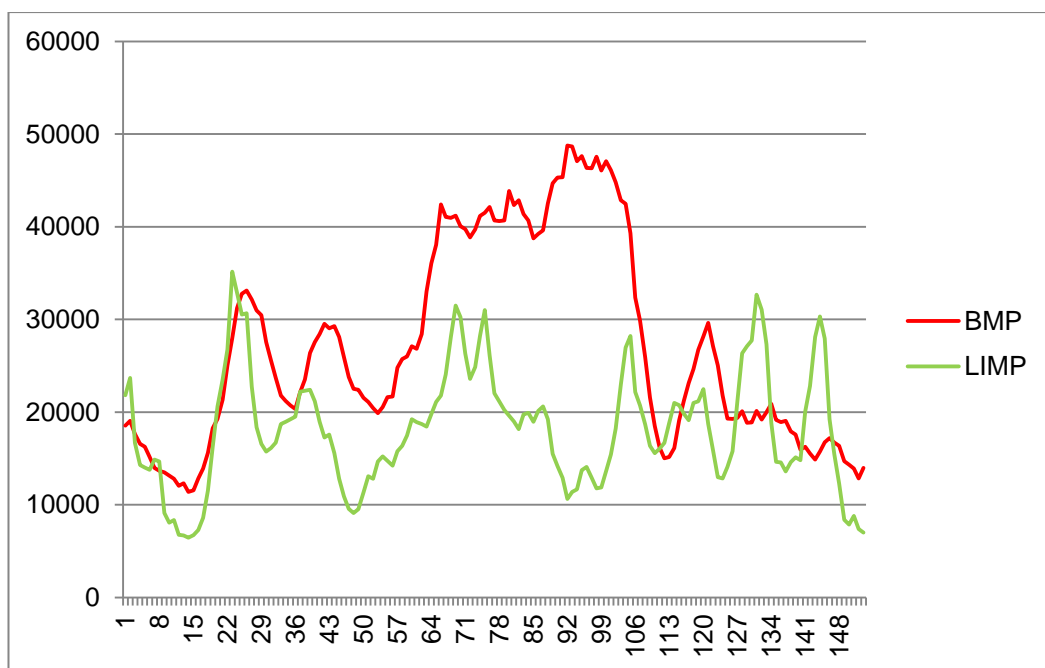
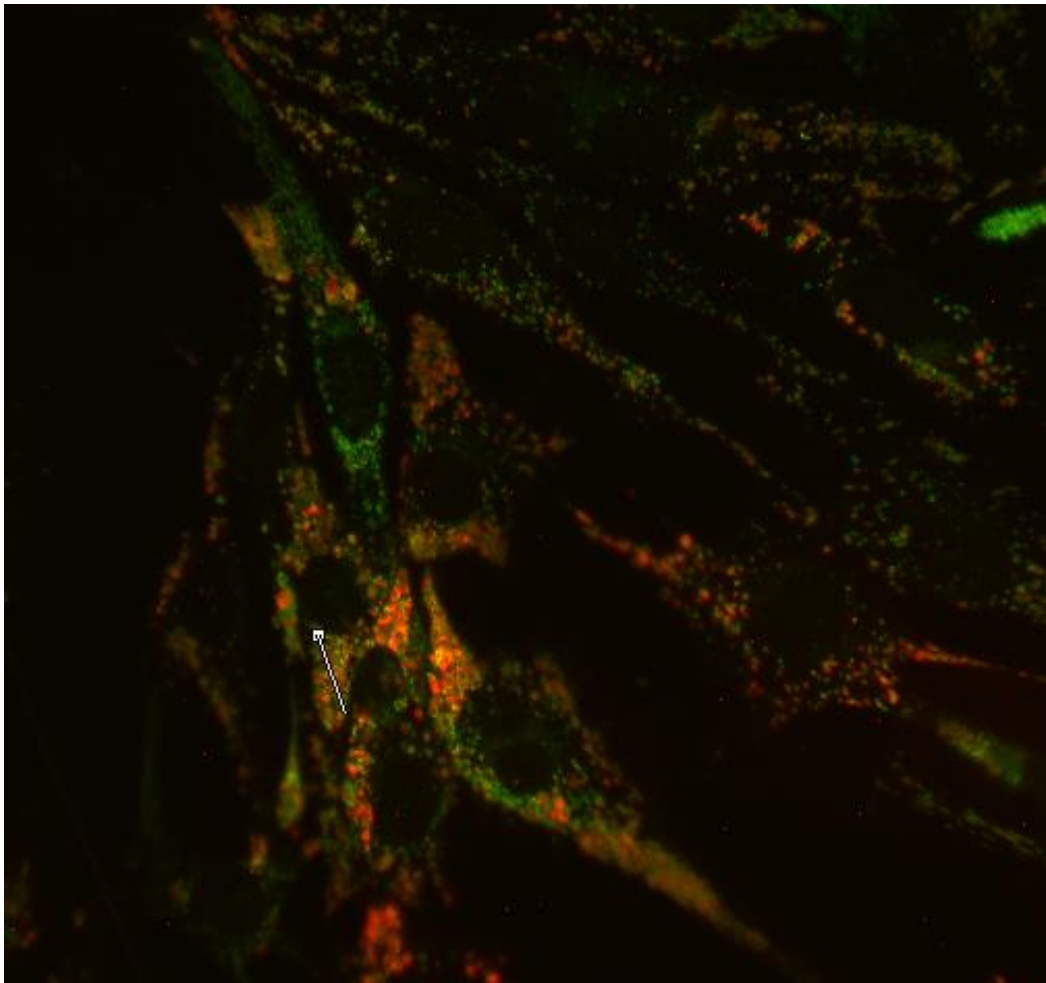
LAMP-2A 1 vrk:n ekspressiolla – BMP ja LIMP



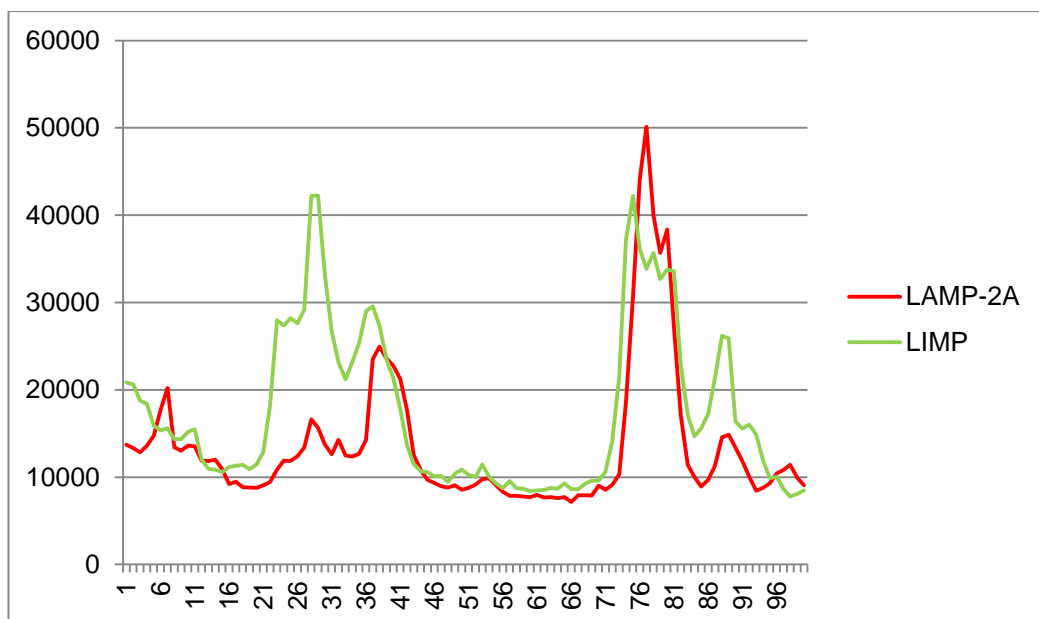
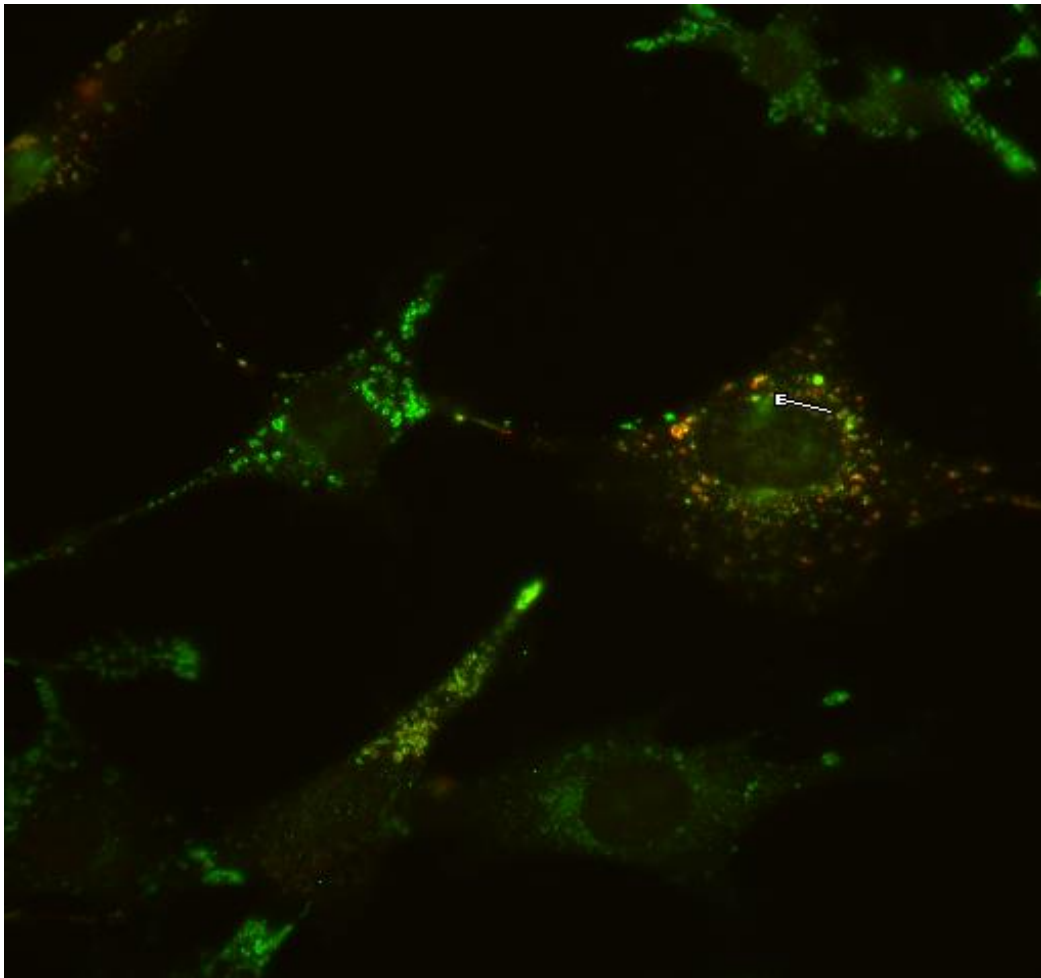
LAMP-2B 1 vrk:n ekspressiolla – LAMP-2B ja LIMP



LAMP-2B 1 vrk:n ekspressiolla – BMP ja LIMP



LAMP-2A 2 vrk:n ekspressiolla – LAMP-2A ja LIMP



LAMP-2A 2 vrk:n ekspressiolla – BMP ja LIMP

