

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Biotekniikka

2016

Iida Vuorinen

# SOLUNSIÄISEN GTP- KONSENTRAATION MÄÄRITTÄMINEN

Luminesenssiin perustuva erotusvapaa GTP-  
määritys

OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Bio- ja elintarviketekniikka | Biotekniikka

2016 | 47

Kari Kopra (FT), Harri Härmä (FT), Kari Haajanen (FM)

lida Vuorinen

## SOLUNSIÄISEN GTP-KONSENTRAATION MÄÄRITTÄMINEN

Guanosiinitrifosfaatti on yksi solujen keskeisistä energiamolekyyleistä. Sillä on tärkeä rooli solun toimintojen säätelyssä esimerkiksi G-proteiinien aktivoinnissa ja signaalien välityksessä. GTP on elintärkeää soluille ja solun GTP-konsentraation muutosten ymmärtäminen auttaisi uusien terapeuttisten menetelmien kehittämisessä.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli kehittää menetelmää solunsisäisen GTP-konsentraation määrittämiseen. Menetelmä pohjautuu GTP-molekyylin tunnistavaan vasta-aineeseen, jonka sitoutumista mitattiin QRET-menetelmällä. Tavoitteena oli optimoida määrittämisen mitausolosuhteet, testata vasta-aineen sitoutumisspesifisyyttä ja kokeilla määrittämisen toimivuutta solu-uutteella.

Opinnäytetyössä tuotettiin 2A4<sup>GTP</sup> -vasta-ainetta *Escherichia coli* -bakteereissa fermentoimalla ja vasta-aineen spesifisyys GTP:lle testattiin GTP- ja GDP-titrauksilla. GTP-konsentraatiomäärittämisen olosuhteet optimoitiin vasta-aineelle ja muille tarvittaville reagensseille ja määrittämistä testattiin solu-uutteella. Lisäksi työn aikana testattiin alkuperäisen 2A4<sup>GTP</sup> -vasta-aineen pohjalta luotuja uusia vasta-aineita, joiden avulla määrittämistä pyrittiin parantamaan.

Määrittämiset osoittivat, että solu-uutteen häiritsevien komponenttien vuoksi solujen GTP-konsentraatiota ei pystytty havaitsemaan alkuperäisellä vasta-aineella. Sitoutumisominaisuuksiltaan muunnellut vasta-aineet osoittivat korkeaa sitoutumista GTP-molekyylin heterogeenisessä määrittämisyksessä. Kuitenkin erotusvapaassa määrittämisyksessä havaittiin, että uudet vasta-aineet osoittivat eri suolaherkkyyttä kuin alkuperäinen, eikä niitä siksi voida suoraan käyttää erotusvapaassa määrittämisyksessä ilman määrittämisolosuhteiden uudelleen optimointia.

ASIASANAT:

QRET-määrittäminen, GTP-konsentraatio, soluviljely, vasta-aine, Fab-fragmentti

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food Technology | Biotechnology

2016 | 47

Kari Kopra (Ph.D.), Harri Härmä (Ph.D.), Kari Haajanen (M.Sc.)

lida Vuorinen

## DETERMINATION OF INTRACELLULAR GTP CONCENTRATION

Guanosine triphosphate is one of the main energy sources of the cell. GTP has an important role in controlling cell functions, for example activating G proteins and transmitting signals. GTP is essential for the cell, and understanding the changes in GTP concentration might help in developing new therapeutic methods.

The aim of this thesis was to develop a method for measuring the intracellular GTP concentration. The method is based on a GTP-binding antibody, and the binding was detected using QRET measurement. The aim was to optimize the measurement conditions of the assay, to test the binding specificity of the antibody and to determine whether the assay works with cell lysate.

2A4<sup>GTP</sup> antibody was produced in *Escherichia coli* bacteria by fermentation. The specificity of the antibody to GTP was tested by GTP and GDP titration. The conditions of the GTP concentration assay were optimized, and the assay was tested with cell lysate. Antibodies modified from the original 2A4<sup>GTP</sup> antibody were also tested to see if they would make the assay more specific.

The results showed that due to the disturbing components of the cell lysate, the GTP concentration of the cell was not detected with the original antibody. The modified antibodies seemed to bind firmly to the GTP molecule in the heterogeneous assay, whereas in the homogeneous assay the modified antibodies showed differences in salt response compared to the original antibody. Thus, the modified antibodies can not be used in the homogeneous assay before re-optimization.

KEYWORDS:

QRET assay, GTP concentration, cell culture, antibody, Fab-fragment

# SISÄLTÖ

<b>KÄYTETYT LYHENTEET JA TERMIT</b>	<b>6</b>
<b>1 JOHDANTO</b>	<b>7</b>
<b>2 GTP-KONSENTRAATIOMÄÄRITYS</b>	<b>8</b>
<b>3 VASTA-AINEET</b>	<b>10</b>
3.1 Vasta-aineiden rakenne	10
3.2 Vasta-aineiden valmistus	11
3.3 GTP-sidonnainen Fab-fragmentti	12
<b>4 ELÄINSOLUVILJELY</b>	<b>13</b>
4.1 Solulinjatyytit	13
4.2 Soluviljely	15
<b>5 QRET - SAMMUTUS-RESONANSSI-ENERGIANSIIRTO</b>	<b>16</b>
<b>6 MATERIAALIT JA MENETELMÄT</b>	<b>18</b>
6.1 Proteiinin tuotto ja puhdistus	18
6.2 Vasta-aineen analysointi	21
6.3 Määrityksen optimointi	23
6.4 Soluviljely	26
6.5 Määritykset solu-uutteella	27
6.6 Sitoutumisominaisuuksiltaan muunnetut vasta-aineet	27
<b>7 TULOKSET JA PÄÄTELMÄT</b>	<b>29</b>
7.1 Vasta-aineen analysointi	29
7.2 Määrityksen optimointi	31
7.3 Määritykset solu-uutteella	34
7.4 Sitoutumisominaisuuksiltaan muunnetut vasta-aineet	35
<b>8 MENETELMÄN JATKOKEHITTÄMINEN</b>	<b>38</b>
<b>9 LÄHTEET</b>	<b>40</b>

## LIITTEET

- Liite 1. Fermentoinnin solumedium.
- Liite 2. Proteiinipuhdistus- ja suolanpoistoliuoksia 1.
- Liite 3. Proteiinipuhdistus- ja suolanpoistoliuoksia 2.
- Liite 4. Proteiinipuhdistuksen eluutiokuvaaja.

## KUVAT

Kuva 1. GTP-molekyylin kemiallinen rakenne.	8
Kuva 2. Vasta-aineiden rakenne.	11
Kuva 3. Nisäkässolujen jaottelu morfologian mukaan.	14
Kuva 4. QRET-menetelmän periaate.	17
Kuva 5. Vasta-aineen valmistuksen vaiheet.	18
Kuva 6. GTP-konsentraatiomäärityksen olosuhteiden optimoinnin vaiheet.	23

## KUVAAJAT

Kuvaaja 1. Solutiheyden kasvu fermentoinnissa.	19
Kuvaaja 2. Proteiinipuhdistuksen vaiheet.	21
Kuvaaja 3. Vasta-aineen spesifisyyden testaus GTP- ja GDP-titrauksilla.	30
Kuvaaja 4. GTP-lisäyksen ja entsyymiaktiivisuuden vaikutus GTP-määrään.	31
Kuvaaja 5. Vasta-aine- ja GTP-Eu-konsentraatioiden optimoinnin tulos.	32
Kuvaaja 6. Erilaisten kasvatusmediumlaimennosten vaikutus määrittymiseen.	33
Kuvaaja 7. Triton X-100-detergentin vaikutus TRF-signaaleihin.	34
Kuvaaja 8. Määrittymisen testaus solu-uutteella, ja hajotettujen solujen sentrifugoinnin vaikutus signaaleihin.	35
Kuvaaja 9. Heterogeeninen vasta-ainemääritys kahdessa suolapitoisuudessa.	36
Kuvaaja 10. Homogeeninen kilpaileva määrittäminen.	37

## TAULUKOT

Taulukko 1. Vasta-ainepitoisuudet.	22
------------------------------------	----

# KÄYTETYT LYHENTEET JA TERMIT

Lyhenne/termi	Selite
ATP	Adenosiini 5'-trifosfaatti
Apoptoosi	Ohjelmoitu solukuolema
CTP	Sytidiini 5'-trifosfaatti
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetyylisulfoksidi
DNA	Deoksiribonukleiinihappo
EDTA	Etyleeni-diamiini-asetetikkahappo
Fab	Antigeenia sitova fragmentti (fragment antigen-binding)
FBS	Naudan sikiön seerumi (Fetal Bovine Serum)
GDP	Guanosiini 5'-difosfaatti
G-proteiini	GTP:tä sitova trimeerinen säätelyproteiini
GTP	Guanosiini 5'-trifosfaatti
GTPaasi	Guanosiinitrifosfataasi
Ig	Immunoglobuliini
IPTG	Isopropyyli- $\beta$ -D-1-tiogalaktopyranosidi
OD	Solutiheys (Optical density)
PBS	Fosfaattisuolapuskuri
PCA	Pääkomponenttianalyysi (Principal component analysis)
QRET	Sammutus-resonanssi-energiansiirto (Quenching Resonance Energy Transfer)
RT-NMR	Reaaliaikainen ydinmagneettinen resonanssispektroskopia (Real-time nuclear magnetic resonance)

# 1 JOHDANTO

GTP on solujen energianlähde erilaisissa aineenvaihduntareaktioissa ja lisäksi sillä on merkittävä rooli solujen signaalin välityksessä erityisesti G-proteiinin aktivoijana ja toisio-lähtetinä. Riittävä GTP-konsentraatio on soluille elintärkeää, sillä liian alhainen tai liian korkea konsentraatio aiheuttaa solumuutoksia ja apoptoosia. GTP-konsentraatiomääri-tysten tutkimustavoite on pystyä vaikuttamaan näihin solumuutoksiin ja solukuolemaan.

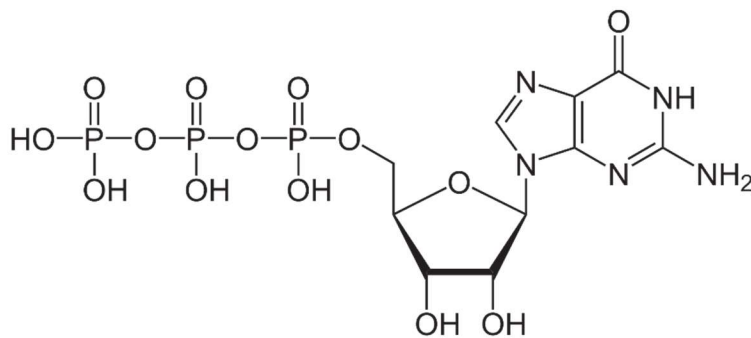
Opinnäytetyön tavoitteena oli kehittää nopea, helppo ja halpa menetelmä solunsisäisen GTP-konsentraation määrittämiseen. Kehitettävä menetelmä perustuu GTP-molekyylin-tunnistavaan vasta-aineeseen, jonka sitoutumista mitataan sammutus-resonanssi-ener-giansiirto-menetelmän avulla. Opinnäytetyö aloitettiin Turun ammattikorkeakoulun ti-loissa valmistamalla käytettävää vasta-ainetta fermentoimalla, ja työtä jatkettiin Turun yliopistolla biolääketieteen laitoksella tutkimusryhmässä.

Työssä tuotettiin GTP-sidonnaista vasta-ainetta ja testattiin sen spesifisyys GTP:lle. Määrittäolosuhteet sekä käytettävien reagenssien konsentraatiot optimoitiin ja määri-tystä kokeiltiin solu-uutteella. Lisäksi testattiin miten yhdeksän uutta alkuperäisen vasta-ainefragmentin pohjalta luotua vasta-ainetta toimivat suhteessa vanhaan vasta-aineeseen.

Menetelmän jatkotavoitteena on sen käyttö GTP-konsentraatioon vaikuttavien lääkemolekyyliden seulonnassa. Tarkoituksena on löytää molekyyliä, joiden avulla solujen GTP-konsentraatiota voidaan muuttaa ja sen kautta esimerkiksi vaikuttaa solun erilaistumi-seen tai apoptoosiin. Tällaisten molekyylien löytäminen olisi merkittävää muun muassa syöpähoitojen kehittämisessä.

## 2 GTP-KONSENTRAATIOMÄÄRITYS

GTP eli guanosiiini 5'-trifosfaatti toimii soluissa fosfaattien ja pyrofosfaattien kantajina kanoavoiden kemiallista energiaa biosynteesiin. GTP aktivoi G-proteiineja, jotka osallistuvat useisiin solujen toimintoihin, joita ovat muun muassa solujen jakautuminen, erilaistuminen ja useiden kinaasireaktiosarjojen aktivointi. Lisäksi GTP toimii energianlähteenä DNA:n ja RNA:n biosynteseissä. <sup>1</sup>



Kuva 1. GTP-molekyylin kemiallinen rakenne. <sup>2</sup>

Energiamolekyylit kuten ATP ja GTP osallistuvat keskeisesti aineenvaihduntaan ja säätelevät useita entsyymireaktioita soluissa. ATP on solun pääasiallinen energiamolekyyl, kun taas GTP:n tehtävä on erityisesti signaalin tuottamisessa. Energiamolekyylien konsentraatiot solussa vaihtelevat riippuen kudostyypistä, ympäristöstä ja terveydellisestä tilasta. Muutokset energiamolekyylien konsentraatioissa voivat heikentää tai tehostaa solun toimintaa. Näitä energianmuutoksia mittaamalla ja niitä tulkitsemalla pyritään kuvaamaan solun aineenvaihduntaa. <sup>3</sup>

On osoitettu, että solut tarvitsevat riittävän GTP-konsentraation toimiakseen. Vähäinen tai liian suuri GTP:n määrä johtaa esimerkiksi solumuutoksiin, solun erilaistumiseen tai solun apoptoosiin. Tästä johtuen erilaisten GTP-konsentraatiomääritysten tutkiminen on keskeinen kohde uusia terapeuttisia hoitomenetelmiä kehitettäessä. GTP-konsentraatiomäärityksiä on kehitetty useampia. Muutama näistä menetelmistä on esitelty seuraavissa kappaleissa. <sup>4,5</sup>

RT-NMR on menetelmä, jonka avulla voidaan reaaliaikaisesti tarkastella *in vitro* biologisia reaktioita, ja jota voidaan käyttää esimerkiksi proteiinin konformaatiomuutosten tarkastelussa. Guanosiinitrifosfataasit ovat entsyymejä, jotka sitoutuessaan muuntavat



GTP:n GDP:ksi. Tämä muutos voidaan NMR:llä helposti muuntaa spektriiksi, josta voidaan erotella entsyymien GTP- ja GDP-sidonnaiset muodot. Määrittämällä näiden muutosten määrä aikaerotteisesti saadaan selvitettyä yksittäisten GTP-hydrolyysien ja sitä kautta GTP:n määrä. Menetelmän käyttö vaatii puhtaat määritysolosuhteet ja on siksi työläs.<sup>6,7</sup>

Homogeeninen GTPaasi-Glo-määritys mittaa GTPaasien aktiivisuutta *in vitro*. Siinä GTP muunnetaan ATP:ksi ja tämä muutos on havaittavissa bioluminesenssisignaalin muodossa. Määrityksellä saadaan kvantitatiivisesti mitattua GTP:n määrä GTPaasireaktion jälkeen. Halutun luminesenssisignaalin saaminen edellyttää useita entsyymireaktioita ja määrittäminen vaatii puhtaat määritysolosuhteet. Menetelmä on kuitenkin kaupallisesti saatavilla, mikä tekee siitä kiinnostavan vaihtoehdon.<sup>8</sup>

Solun energiatasojen muuttumisen seuraaminen ja muutoksiin vastaaminen on tärkeää solun selviytymisen kannalta. Energian muutoksiin vastaamisen epäonnistuminen on haitallista soluille ja voi johtaa organismin toimintakyvyttömyyteen. Prokaryooteille on löydetty yhteys aineenvaihdunnan ja GTP-konsentraatioiden välille. Eukaryooteille on esitetty yksi mahdollinen GTP-sensori, jonka avulla solu aistii omaa GTP-konsentraatiotaan. PI5P4K $\beta$  on fosfolipidi, joka GTP-molekyylisiin sitoutuessa vaikuttaa lipidien toisio-lähetin signaalointiin ja sen kautta esimerkiksi aineenvaihduntaan ja kasvainten muodostumiseen. PI5P4K $\beta$ -fosfolipidin rooli GTP:n tunnistamisessa tekee siitä merkittävän kohteen uusien syöpähoitojen kehityksessä.<sup>3</sup>

## 3 VASTA-AINEET

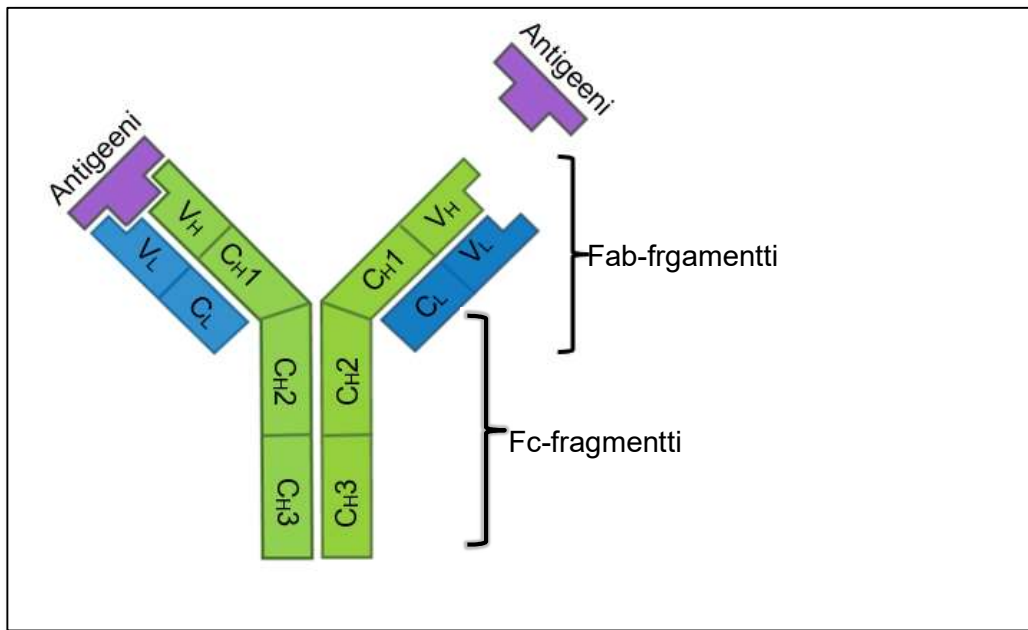
Vasta-aineet tai toiselta nimeltään immunoglobuliinit ovat liukoisia proteiineja, jotka toimivat osana elimistön immuunijärjestelmää. Niiden tehtävänä on tunnistaa ja sitoutua spesifisesti elimistölle vieraisiin organismeihin tai niiden osiin eli antigeeneihin. Vasta-aineidentuotto tapahtuu pääsääntöisesti plasmasoluiksi kehittyneissä B-soluissa. Jokaisen B-solun pinnalla on yhdelle antigeenille spesifisiä vasta-aineresettoreita. Antigeenin sitoutuessa vasta-aineeseen B-solu aktivoituu ja alkaa jakautua sekä vasta-ainetta tuottaviksi efektorisoluiksi että muistisoluiksi.<sup>9</sup>

### 3.1 Vasta-aineiden rakenne

Yksinkertaisimmat vasta-aineet koostuvat neljästä polypeptidiketjusta, jotka ovat kiinnittyneet toisiinsa rikkisidoksilla. Näistä ketjuista kaksi on raskaita ketjuja (heavy chain) ja kaksi kevyitä ketjuja (light chain). Vasta-aineet jaetaan isotyyppeihin (IgG, IgA, IgM, IgE ja IgD) niiden H-ketjujen mukaan. Kukin vasta-aine koostuu yhdestä tai useammasta immunoglobuliinista.<sup>10</sup>

Raskasketju muodostuu neljästä domeenista, joista yksi on vakio ( $C_H$ ) ja kolme muuttuvaa ( $V_H$ ). Kevytketju muodostuu yhdestä vakiodomeenista ( $C_L$ ) ja yhdestä muuttuvasta domeenista ( $V_L$ ) (kuva 2). Jokaisen eri isotyypin vasta-aineen vakioalue on keskenään identtinen, mutta vaihtelee eri isotyyppien välillä. Yhdessä kevyen- ja raskaanketjun muuttuvat alueet muodostavat antigeenille sitoutumiskohdan, joita on yhdessä vasta-aineessa kaksi identtistä. Muuttuvan alueen aminohappojärjestys vaihtelee paljon eri B-soluissa tuotettujen vasta-aineiden välillä.<sup>9</sup>

Vasta-aineen Fab-fragmentti on se osa vasta-ainetta, joka sitoutuu antigeeniin. Fab-fragmentti koostuu sekä raskaan että kevyenketjun yhdestä muuttuvasta ja yhdestä vakiodomeenista. H-ketjun kaksi muuta vakiodomeenia muodostavat Fc-alueen, jossa on sitoutumiskohtia proteiineille sekä solupintareseptoreille. Fc-alue vaikuttaa vasta-aineen biologisiin ominaisuuksiin.<sup>9,11</sup>



Kuva 2. Vasta-aineiden rakenne.

### 3.2 Vasta-aineiden valmistus

Perinteisesti monoklonaalisia eli yhden antigeenin tietylle epitoolle spesifisiä vasta-aineita valmistetaan immunisoimalla hiiri halutulla kohdeantigeenillä. Antigeenit aktivoivat immuunireaktion ja B-lymfosyyttisolut alkavat tuottaa vasta-ainetta tälle antigeenille. Immunisointia toistetaan 2-4 viikon välein ja koe-eläimen seerumista tutkitaan, onko vasta-aineen tuotto käynnistynyt. Hiiren annetaan tuottaa vasta-ainetta, jonka jälkeen se lopetetaan ja sen perna poistetaan. Pernal B-lymfosyyttisolut hajotetaan yksittäisiksi soluiksi ja niistä valmistetaan hybridomasoluja fuusioimalla ne myeloomasolujen kanssa. Yksittäiset hybridomasolut erotellaan toisistaan laimentamalla, kunnes yhdessä kuoppalevyn kuopassa kasvaa vain yhdestä B-lymfosyyttistä lähtöisin olevia hybridomasoluja. Kun sopiva kloni on selvitetty, voidaan sen avulla alkaa tuottaa vasta-ainetta.<sup>12</sup>

Perinteisessä vasta-aineiden valmistusmenetelmässä on hiirien käytöstä johtuen eettisiä ongelmia, ja lisäksi kokonaisten vasta-ainemolekyylien valmistus on hidasta ja kallista. Vasta-aineita voidaan kuitenkin tuottaa geeniteknologisin menetelmin halvemmalla. Faaginäyttötekniikka on monoklonaalisten vasta-aineiden valmistusmenetelmä. Toisin kuin hybridoomamenetelmä, faaginäyttö mahdollistaa vasta-aineiden seulomisen erilaisista rekombinanttivasta-ainekirjastoista lähestulkoon mille vain biologiselle tai ei-biologiselle kohteelle ilman tarvetta käyttää koe-eläimiä. Tekniikalla voidaan tehokkaasti seuloa

vasta-ainekirjastoja. Aina ei kuitenkaan löydetä sitoutumisominaisuuksiltaan riittävän hyvää vasta-ainetta, jolloin löydettyjen sitojien ominaisuuksia voidaan selektion jälkeen muokata affiniteettimaturaatiomenetelmillä. Tyypillisesti affiniteettimaturaatiossa vasta-aineisiin tehdään satunnaismutaatioita, mutta toinen vaihtoehto on tutkia *in silico* mitä vasta-aineen aluetta kannattaisi muokata.

Rekombinantti Fab-fragmentti on geenitekniikan avulla rakennettu vasta-aine, jonka emäsjärjestys on selvitetty. Fab-fragmentin rakennetta voidaan muokata, ja esimerkiksi yrittää parantaa sen sitoutumisominaisuuksia affiniteettimaturaatiomenetelmillä. Fab-fragmentin pieni koko mahdollistaa sen käytön muun muassa pienissä diagnostisissa laitteissa ja terapeuttisissa menetelmissä.<sup>13</sup>

### 3.3 GTP-sidonnainen Fab-fragmentti

Tässä työssä käytettiin GTP-molekyylisiin sitoutuvaa Fab-fragmenttia (2A4<sup>GTP</sup>). Tämän vasta-aineen kehittäminen aloitettiin seulomalla synteettinen vasta-ainekirjasto (scFvM) faaginäyttötekniikan avulla. Tämä vasta-ainekirjasto on aikaisemmin todettu hyväksi, kun on etsitty sitojaa pienille molekyyleille. Faaginäyttöseulonnan jälkeen positiivisia scFv-klooneja tutkittiin ja lopulta löydettiin kuusi potentiaalista vasta-ainetta, joiden sitoutumista GTP- ja GDP-molekyyleihin testattiin. Kuudesta testatusta 2A4<sup>GTP</sup>-Fab-fragmentin affiniteetti tutkittuihin biotiini-GTP-yhdisteisiin oli hyvä ja se oli toiseksi tehokkain erottamaan GTP:n GDP:sta. Fab fragmentin testattiin myös sitoutuvan GDP-molekyylisiin tehokkaammin kuin ATP- tai CTP-molekyylisiin osoittaen, että guanosiinilla on tärkeä rooli.

14,15

## 4 ELÄINSOLUVILJELY

Soluviljely tarkoittaa solujen kasvattamista erillään eliöstä kontrolloiduissa olosuhteissa. Soluviljelyn yksi tarkoitus on kasvattaa soluja *in vitro* -tutkimuksia varten. Solutyyppejä on erilaisia ja niistä valitaan tutkimuskohteesta riippuen sopivin. Solutyyppejä valitessa on hyvä valikoida sellainen linja, jonka kanssa on helppo työskennellä, ja joka jakautuu riittävän nopeasti. Näitä kriteereitä tärkeämpää on kuitenkin valikoida linja, jonka solut vastaavat mahdollisimman hyvin tutkimusongelmaan ja jäljittelevät tutkittavan kudoksen soluja. Useimmat käytetyt solulinjat ovat syöpäsoluja, jotka ovat kuolemattomia ja jakautuvat nopeasti siten soveltuen hyvin tutkimustyöhön.<sup>16</sup>

### 4.1 Solulinjatyytit

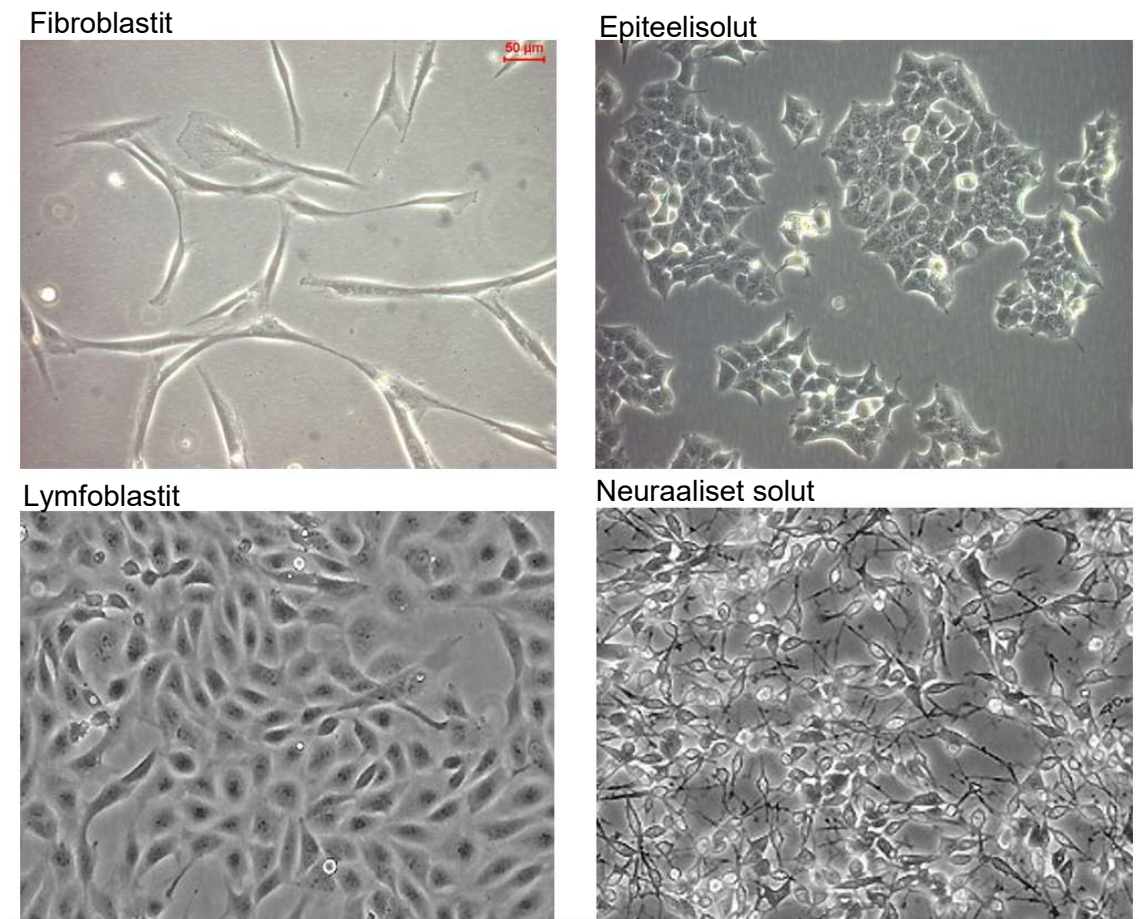
Solulinjatyytit voidaan luokitella niiden jakautumis- ja kasvutavan mukaan. Jakautumistavan mukaan soluja jaetaan primaarisiksi, sekundaarisiksi ja linjasoluiksi. Primaariset solut on erotettu suoraan kudoksesta mekaanisesti tai entsyymaattisesti. Kasvutavaltaan primaariset solut jaetaan adhereeteiksi eli kasvualustaan kiinnittyviin soluihin ja suspensionsoluiksi, jotka eivät tarvitse kiinnittymisalustaa vaan kasvavat irrallaan mediumissa. Kaikki suspensionsolut on johdettu verenkierron soluista. Primaarinen soluviljelmä muuttuu sekundaarisiksi, kun siitä jaetaan uusi kasvatus tuoreeseen kasvatusmediumiin. Linjasolut voidaan jakaa rajallisesti- ja jatkuvasti jakautuviin. Rajallisesti jakautuvat solulinjoilla on vain tietty määrä jakaantumiskertoja yleensä 20–80, jonka jälkeen ne menettävät jakautumiskykynsä. Solulinjat jaetaan, kun niiden konfluenssi eli kasvutiheys kasvatusalustalla on riittävän suuri, noin 80 %. Jatkuvasti jakautuvat linjasolut ovat lähtökohteisesti syöpäsoluja tai muunnettu laboratoriossa ominaisuuksiltaan syöpäsolujen kaltaiseksi. Linjasolut jaetaan sekundaaristen solujen tapaan adhereeteiksi ja suspensionsoluiksi.<sup>17,18,19</sup>

Primaariset solulinjat ovat heterogeenisiä, työläisiä ja ne voivat muuntua kasvatuksen kuluessa. Tästä syystä on suositeltavaa käyttää tutkimuksissa mahdollisimman pienen jakautumisluvun omaavia soluja. Primaarisoluja käytetään esimerkiksi alkuvaiheen lääketestauksissa ennen kuin siirrytään testaamaan lääkkeen toimivuutta ihmisessä. Näissä testeissä käytetään usean eri luovuttajan soluja, sillä on tärkeää varmistaa, että lääke toimii kaikilla eikä vain yhdellä luovuttajalla yhdessä primaarisolulinjassa. Jatkuvat solu-

linjat ovat homogeenisia, muuttumattomia ja ne on usein saatu yhdeltä luovuttajalta. Homogeenisyys ja linjasolujen pitkäikäisyys mahdollistavat niiden pidemmän aikaisen tutkimisen. Linjasoluja käytetään esimerkiksi rokotteiden ja geeniterapian kehittämisessä.

17,18,20

Nisäkässolut voidaan morfologian ja alkuperäkudoksen mukaan jakaa neljään päätyyppiin, jotka ovat: fibroblastit, epiteelisolut, lymfoblastit ja neuraaliset solut. Fibroblastit ovat pitkänmallisia sidekudossoluja, jotka tuottavat soluväliainetta sitä ympäröivään sidekudokseen. Epiteelisolut ovat monikulmion muotoisia elinten ja kudosten pintakerrosten soluja. Lymfoblastit ovat pallonmuotoisia suspensiosoluja. Neuraalisia soluja on muodoltaan ja kooltaan erilaisia (kuva 3).<sup>21,22</sup>



Kuva 3. Nisäkässolujen jaottelu morfologian mukaan.<sup>23</sup>

Tässä opinnäytetyössä mainitut määritykset on tehty primaarisilla fibroblasteilla, mutta lisäksi opinnäytetyön aikana käytettiin kahta jatkuvaa solulinjaa; ihmisen alkion munuaisepiteelisoluja eli HEK 293  $\beta_2$  -soluja, jotka tuottivat  $\beta_2$ -adrenergistä reseptoria ja HL-60 -suspensiosoluja, jotka ovat ihmisen promyelosyyttisiä leukemiasoluja.<sup>24</sup>

#### 4.2 Soluviljely

Solujen kasvatuksessa tarvitaan soluviljelymediumia. Tyypillinen soluviljelymedium sisältää kasvatusmediumia ja seerumia sekä mahdollisesti antibioottia, jonka tarkoitus on ehkäistä bakteerikontaminaatioita. Kaupallisesti on saatavilla lukuisia ominaisuuksiltaan erilaisia kasvatusmediumia. Kasvatusmedium valitaan aina tutkittavan solulinjan mukaan. Kasvatettavat solulinjat ovat usein ostettuja jolloin myyjä osaa yleensä suositella soluille sopivaa kasvatusmediumia ja olosuhteita. Yksi tärkeä olosuhdevaatimus on sopiva pH. Useimmat soluista kasvavat hyvin, kun pH on 7,4. Osaan kasvatusmediumista on lisätty pH-indikaattori, joista yleisin on fenolipuna. Se osoittaa pH-muutoksen happamaksi vaihtamalla nesteen värin kellertäväksi. Lisäksi kasvatusmediumeihin on lisätty komponentteja, joita solut eivät kykene tuottamaan itse. Näitä ovat esimerkiksi eri vitamiinit, aminohapot ja hiilihydraatit. Soluviljelymediumissa olevan seerumin tehtävä on edistää solujen kasvua ja kiinnittymistä, tarjota ravinteita sekä suojata soluja apoptoosilta ja hapettumiselta.<sup>25,26,27,28</sup>

Solujen jakamisessa käytetään trypsiiniä irrottamaan adherentit solut kasvualustastaan. Eri solut irtoavat eri nopeudella, tyypillisesti noin kahdessa minuutissa. Solujen irrottaminen tehdään mahdollisimman nopeasti, jottei trypsiini ehdi hajottamaan solujen solukalvoa. Solujen jakamisessa käytetään lisäksi PBS-liuosta, jonka tarkoitus on pestä solut seerumista jakamisen yhteydessä. PBS-liuoksen pH ja ionivahvuudet vastaavat solujen luonnollisia olosuhteita, jolloin solujen toiminta ei häiriinny pesuissa eivätkä solut hajoa ennen aikaisesti.<sup>29</sup>

Soluja pakastetaan linjojen säilyttämiseksi. Solujen pakastamisessa käytetään DMSO:ta, joka suojelee soluja jäätyessään, mutta on nestemäisenä myrkyllistä soluille. Tästä syystä solujen pakastaminen suoritetaan mahdollisimman nopeasti soluja vahingoittamatta.<sup>30</sup>

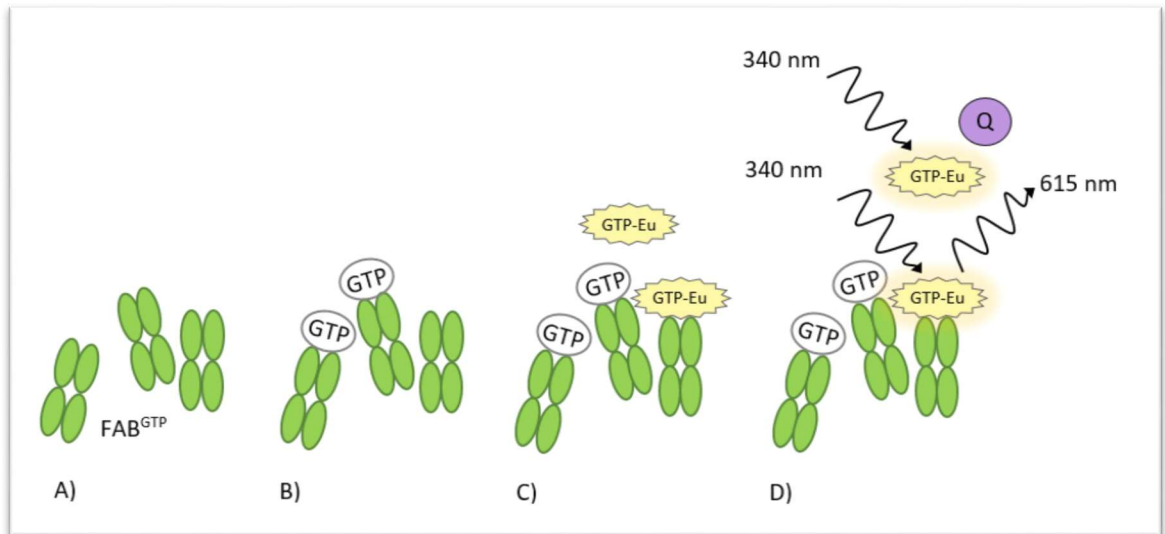
## 5 QRET - SAMMUTUS-RESONANSSI-ENERGIANSIIRTO

QRET (Quenching Resonance Energy Transfer) on homogeeninen aikaerotteiseen luminesenssiin perustuva määrittely. Siinä hyödynnetään lantanidikelaatin ja sammuttajamolekyylin välistä vuorovaikutusta. Tämä vuorovaikutus estyy, kun ligandi sitoutuu kohdemolekyylinsä. Sammuttaja voi olla joko luminoiva tai luminoimaton liukoinen pienmolekyylili, jolla on heikko interaktio kelaatin kanssa ja joka voi vastaanottaa energiaa kelaatilta estäen sitä emittoimasta valoa mittausikkunassa.<sup>31,32</sup>

QRET-menetelmän käyttö vaatii näytteen lisäksi ainoastaan lantanidikelaatilla leimatun pienmolekyylin ja sammuttajan. Näytettä käytetään yleensä noin molaarinen ylimäärä leimattuun ligandiin nähden. Liukoinen sammuttajamolekyylili aiheuttaa muutoksen kelaatin emissiosignaalin mahdollistaen sen, että voidaan mitata tutkittavan aineen sitoutumista, kun liuoksessa on mukana ylimääräistä leimattua ligandia. Määrittely vaatii vain hyvin pienen määrän sitoutunutta leimattua ligandia, ja kaikki vapaa ei-sitoutunut leimattu ligandi sammutetaan sammuttajan avulla. Menetelmä on nopea, helppo ja halpa ja soveltuu hyvin pienten molekyylien ja solujen tutkimiseen liuoksessa sekä mahdollistaa nanomolaaristen proteiinikonsentraatioiden käytön.<sup>33,34</sup>

QRET-GTP-määrittelyssä kuoppalevyille pipetoidaan ensimmäisenä vasta-aine (kuva 4, A) ja heti tämän perään näyte, joka sitoutuu vasta-aineen epitoppiin (kuva 4, B). Näytteen perään annostellaan leimattu kelaatti, joka sitoutuu vapaaksi jääneisiin vasta-aine epitoppeihin (kuva 4, C). Lopuksi kuoppiin lisätään sammuttaja, joka estää vapaita lantanidikelaattien emission, jolloin voidaan mitata vain vasta-aineisiin sitoutuneiden kelaattien emissiota. Mitä pienempi mitattava emission on, sitä enemmän liuoksessa on mitattavaa molekyyliliä (kuva 4, D).





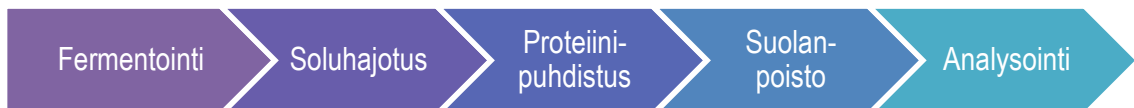
Kuva 4. QRET-menetelmän periaate.

## 6 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

Kaikki työn mittaukset on tehty Labrox Plate reader -levylukijalla ja oletusasetuksina europium-mittauksissa oli viritys- eli eksitaatioaallonpituus 340 nm ja emissio eli fluoresenssin mittausaallonpituus 615 nm sekä viive 400  $\mu$ s. Taustasignaalin ja autofluoresenssin vähentämiseksi käytettiin mustaa 384 kuoppalevyä ja kaikissa tämän työn homogeenissä QRET-määrytyksissä käytettiin samaa määrispuskuria (20 mM HEPES pH 7,5, 1 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,01 % Triton X-100, 0,005 %  $\gamma$ -globuliini).

Kaikissa QRET-määrytyksissä käytettiin samaa vasta-ainetta, jonka kehittäminen on kuvattu kappaleessa 3.3 ja valmistus kappaleessa 6.1. Lisäksi kaikissa QRET-määrytyksissä käytettiin samaa liukoista sammuttajaa, joka on aikaisemmin testattu toimivaksi.<sup>35</sup>

Määrytyksen kehittäminen aloitettiin valmistamalla, puhdistamalla ja analysoimalla GTP-molekyylin sitoutuvaa vasta-ainetta (kuva 5). Vasta-aineen valmistuksen jälkeen GTP-konsentraatiomäärytyksen olosuhteita optimoitiin ja määrytystä testattiin solu-uutteella (kuva 6).



Kuva 5. Vasta-aineen valmistuksen vaiheet.

### 6.1 Proteiinin tuotto ja puhdistus

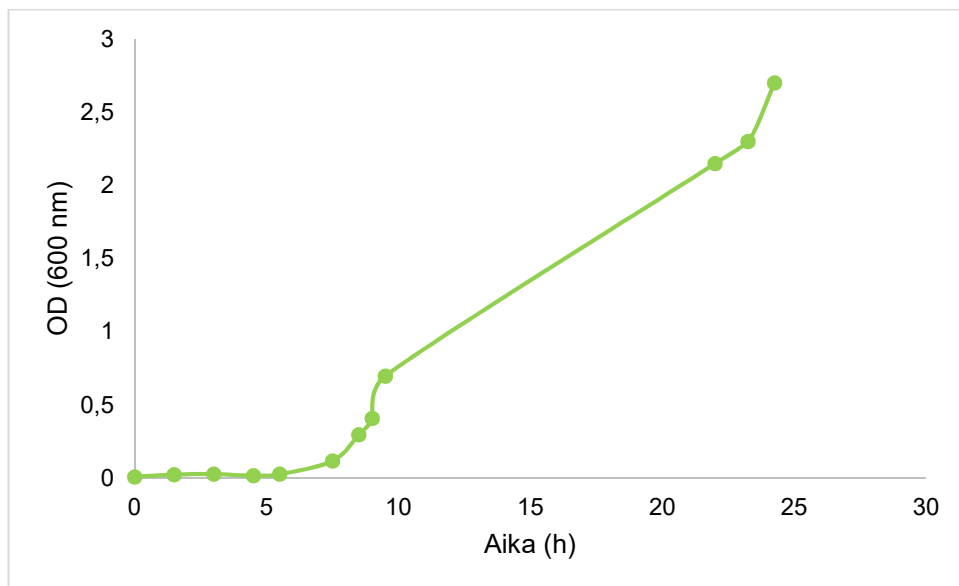
Aikaisemmassa vaiheessa *E. coli* -bakteerisoluihin oli ilmennetty GTP-molekyylin sitoutuvaa vasta-ainetta ja bakteerisolusta oli tehty maljakasvatus. Vasta-aineen tuotto aloitettiin valmistamalla esikasvatus maljalla kasvavasta bakteerista. Maljakasvatuksesta siirrostettiin yksi pmy 100 ml:aan SB-mediumia ja lisättiin ampicilliinia 100  $\mu$ g/ml. Näitä kasvatuksia valmistettiin neljä samanlaista ja niitä inkuboitiin yön yli 18 tuntia tasoravistelijassa 37 °C:ssa.

30 litraa SB-mediumia (liite 1) steriloidiin 20 minuuttia 121 °C:ssa Biostat C30 -fermentorissa ja jäähdytettiin steriloinnin jälkeen

37 °C:seen. Jäähdyttämisen jälkeen SB-mediumin joukkoon lisättiin ampicilliinia 100 µg/ml.

Kaikki neljä esikasvatusta injektioitiin fermentoriin ja toinen erä ampicilliinia lisättiin ennen fermentoinnin aloittamista, koska ensimmäisen erän lisäämisestä oli kulunut vuorokausi ja se oli täten ehtinyt jo hajota. Esikasvatukset injektioitiin fermentoriin steriilillä neulalla. Kasvatukset olivat injektiohetkellä eksponentiaalisen kasvun vaiheessa OD-arvon ollessa 0,60.

Kasvatusmediumin pH pidettiin fermentoinnin ajan neutraalina kolme molaarisen typpihapon ja kaksi molaarisen natriumhydroksidin avulla. Ilman syöttö säädettiin 25 l/min ja PO<sub>2</sub> kiintopiste säädettiin 30 prosenttiin, jota hallittiin sekoituksen avulla (200–600 rpm). Fermentorista mitattiin tasaisin väliajoin solutiheys ja noin 10 tunnin kohdalla solutiheyden ollessa 0,7 fermentoriin lisättiin 150 µM IPTG:tä, joka aloitti indusointi. OD-arvoa mitattiin ja indusointia jatkettiin, kunnes OD oli 2,5:n ja 3,0:n välillä. (kuvaaja 1) Indusointiaika oli 17 h ja OD tällöin 2,7.



Kuvaaja 1. Solutiheyden kasvu fermentoinnissa.

Solususpensiota sentrifugoitiin (15 min +4 °C 4000 g) ja sentrifugoinnin supernatantti kerättiin talteen ja pelletit pakastettiin -20 °C:een.

Solupelletit (yhteensä 231 g) liuotettiin omaa painoaan vastaavaan tilavuuteen TBS-puskuria (liite 2). Liuotetut solut hajotettiin soluprässillä 20000 psi:n kammioaineella kaksi

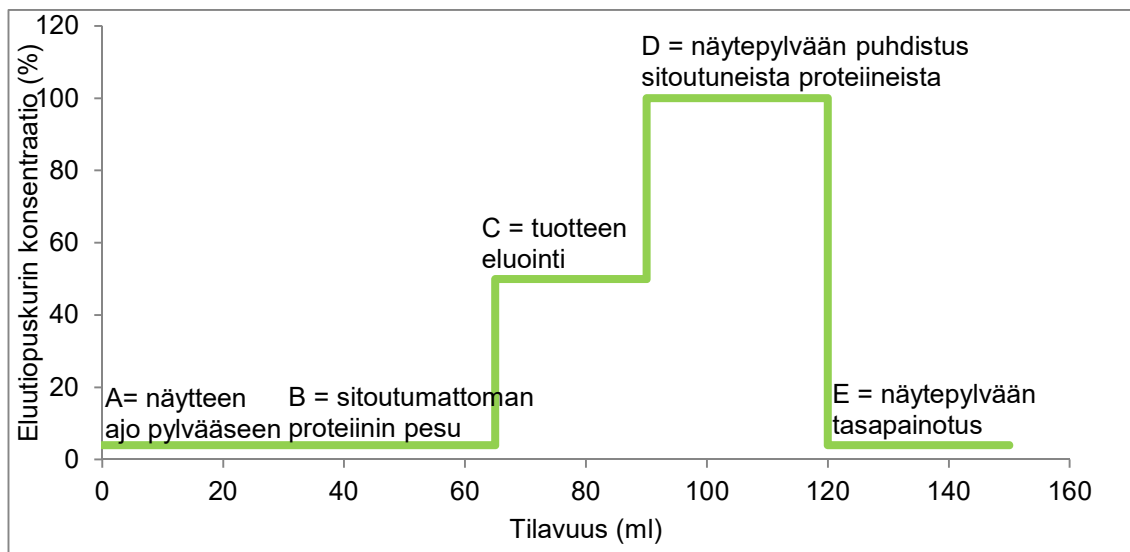
kertaa. Hajotettuja soluja sentrifugoitiin (30 min 10000 g) kolme kertaa, jotta saatiin supernatantti erotettua pelletistä.

Proteiinipuhdistuksessa käytettiin ÄKTA Explorer 100 -kromatografialaitteistoa ja 5 ml Ni-sepharose High Performance -pylvästä, joka oli tasapainotettu puhdistus- ja regenerointipuskureilla (liite 2). Puhdistettavassa proteiinissa on His-tag-häntä, joka mahdollistaa affiniteettipuhdistuksen. Proteiinipuhdistus tehtiin kuudessa erässä ja solu-uutteen (supernatantti) määrä eri ajojen välillä vaihteli 28 ml:sta 40 ml:aan.

Solu-uute suodatettiin 1-2 µm suodatinpaperilla ja 0,45 µm ruiskusuodattimella. Proteiinipuhdistus aloitettiin huuhtelemalla kaikki linjat ja Ni-separoosipylväs milli-Q-vedellä sekä pesemällä pumpit A ja B -puskureilla (liite 2, liite 3). Huuhtelun jälkeen kaikki linjat pestiin A-puskurilla.

Ajo aloitettiin tasapainottamalla Ni-separoosipylväs käyttämällä 25 ml:aa 4 % B-puskuria ja ajoa jatkettiin ajamalla näytepylväseen näytteen verran neljä prosentista B-puskuria, jolloin imidatsolin pitoisuus 20 mM (kuvaaja 2, A). Sitoutumattomat proteiinit pestiin pois 30 ml:lla samaa puskurisekoitusta (kuvaaja 2, B).

Tuotteen eluutio aloitettiin nostamalla eluutiopuskurin määrä 50 %:iin, jolloin imidatsolin konsentraatio 250 mM (kuvaaja 2, C). Tuotetta eluoiitiin 25 ml:aa 1,3 ml fraktioihin. Ni-separoosipylväs puhdistettiin kiinnittyneistä proteiineista nostamalla eluutiopuskurin konsentraatio 100 %:iin, jolloin imidatsolin konsentraatio oli 500 nM (kuvaaja 2, D). Lopuksi Ni-separoosipylväs tasapainotettiin A-puskurilla (kuvaaja 2, E).



Kuvaaja 2. Proteiinipuhdistuksen vaiheet.

Puhdistuskuvaajista (liite 4) katsottiin mihin fraktioihin tuote oli eluoitunut. Kunkin ajon fraktioista valittiin kuusi parasta ja ne yhdistettiin kolmeksi näytteeksi lopputilavuuksiltaan 2,6 ml.

Suolanpoistossa käytettiin PD-10 suolanpoistopylväitä ja painovoimaan perustuvaa puhdistusmenetelmää. Suolanpoisto aloitettiin tasapainottamalla pylväs milli-Q-vedellä ja tasapainotuspuskurilla (50 % TBS sitoutumispuskuri + 50 % TBS -eluutiopuskuri, liite 2, liite 3). Näytteen lisäyksen jälkeen eluointi (suolanpoistoeluutiopuskuri, liite 3) ja näyte säilöttiin +4 °C:een.

Pylväät pestiin tiputtamalla niistä läpi 20 ml suolanpoistoeluutiopuskuria, 25 ml milli-Q-vettä ja 25 ml 20 % etanolia, joka toimi myös säilytysliuoksena. Samoja pylväitä käytettiin kaikkien kuuden erän puhdistuksessa.

## 6.2 Vasta-aineen analysointi

Valmistettujen vasta-aineiden konsentraatiot määritettiin heterogeenisellä vasta-ainemäärityksellä. Näytteinä toimivat laimennokset kahdesta parhaasta fraktiosta proteiinipuhdistusajosta. Parhaat fraktiot valittiin proteiinipuhdistuskuvaajien perusteella (liite 4). Ensimmäisen ajon näyte oli analysoitu aikaisemmin ja kolmannen ajon näytettä ei analysoitu, sillä affiniteettikromatografiapuhdistuksessa se ei eluoitunut oikein.

Määrityksessä levypesurilla (Perkin Elmer, Delfia plate washer) pestylle 96-mikrotiitterilevyille (Polyclonal rabbit anti-mouse IgG) pipetoitiin näytelaimennokset ja standardit 0-150 ng/ml. Näiden annettiin inkuboitua 1,5 tuntia, jolloin ne sitoutuivat kuoppalevyn pohjaan. Inkuboinnin jälkeen levyiltä pestiin neljällä syklillä irti kaikki sitoutumaton aines pesuliuksella ja sitoutuneiden näytteiden päälle pipetoitiin europiumilla leimattua anti-mouse-IgG-merkkiainetta. Näytteitä inkuboitiin 30 minuuttia, jonka jälkeen levyiltä pestiin irti kaikki sitoutumaton leima-aine ja mitattiin aikaerotteinen luminesenssi (eksitaatio 340 nm, emissio 616 nm, viive 400  $\mu$ s).

Vertaamalla näytteiden mittaustuloksia standardeihin näytteille saatiin määritettyä vasta-aine konsentraatiot (taulukko 1).

Taulukko 1. Vasta-ainepitoisuudet.

Näyte	Vasta-ainepitoisuus (mg/ml)	Konsentraatio ( $\mu$ M)
Ajo 2	0,355	5,89
Ajo 4	0,284	4,71
Ajo 5	0,342	5,68
Ajo 6	0,261	4,33

### 6.2.1 Vasta-aineen spesifisyyden määrittäminen

Uusista vasta-aineista valittiin se, jolla oli korkein vasta-ainepitoisuus (Ajo 2) ja sillä tehtiin GTP- ja GDP titraukset tarkoituksena selvittää, kuinka uudet vasta-aineet toimivat aiemmin pienemmässä mittakaavassa tuotettuun vasta-aineeseen nähden.<sup>15</sup>

Määrityksessä 7 nM vasta-aine, 5 nM Eu-GTP ja 1 nM - 1 mM GTP:n ja GDP sekä 2  $\mu$ M sammuttaja pipetoitiin kuoppalevyille edellä mainitussa järjestyksessä. Aikaerotteinen luminesenssi mitattiin (eksitaatio 340 nm, emissio 616 nm, viive 600  $\mu$ s) eri aikapisteissä tarkoituksena havainnoida miten signaalitasot muuttuvat ajan funktiona. Aikapisteistä valittiin 60 minuuttia ja tämän pisteen mittaustuloksista piirrettiin titrauskäyrät (kuvaaja 3). Oletuksena oli, että IC<sub>50</sub> arvot GTP:lle ja GDP:lle ovat 50 nM ja 10  $\mu$ M. (Henkilökohtainen tiedonanto)

### 6.2.2 GTP-lisäyksen ja entsyymiaktiivisuuden vaikutus GTP-määrään

Määrittelyn tavoitteena oli selvittää vaikuttaako näytteen säilyttäminen huoneenlämpötilassa ja sen mahdollistama entsyymiaktiivisuus näytteen GTP-konsentraatioon. Lisäksi määrittelyllä testattiin mitataanko teoriassa oikeaa asiaa eli GTP-konsentraatiota vai mahdollisesti jotain muuta.

Määrittelyssä käytettiin kaupallista solu-uutetta, jonka GTP-konsentraatio oli tunnettu (120  $\mu\text{M}$ ). Solu-uutteesta tehtiin neljä näytettä, joista kahteen lisättiin kaupallista GTP:tä niin, että niiden loppukonsentraatiot olivat 600  $\mu\text{M}$  ja 3 mM. Näytteitä säilytettiin 80 °C:ssa lukuun ottamatta yhtä, jota pidettiin huoneenlämpötilassa yön yli. Kaikista neljästä näytteestä valmistettiin laimennossarja 32 nM asti. Näytteillä tehtiin homogeeninen määrittely, jossa vasta-aineen konsentraatio oli 7 nM, vasta-aineen 5 nM ja sammuttajan 2  $\mu\text{M}$ .

### 6.3 Määrittelyn optimointi

GTP-konsentraatiomäärittelyn kehittämistä jatkettiin optimoimalla määrittelyolosuhteita (kuva 6).



Kuva 6. GTP-konsentraatiomäärittelyn olosuhteiden optimoinnin vaiheet.

GTP-konsentraatiomäärittelyissä käytettiin näytteen (GTP) lisäksi vasta-ainetta, GTP-Eu-kelaattia ja sammuttajaa. Reagenssit pipetoitiin 384-kuoppalevyille järjestyksessä: vasta-aine, näyte, Eu-GTP ja lopuksi sammuttaja. Sammuttajan lisäystä seurasi inkubointi tasoravistelijalla huoneenlämpötilassa valolta suojattuna ja aikaerotteisen luminesenssin mittaaminen 15 minuutin välein.

### 6.3.1 Vasta-aine- ja GTP-Eu -konsentraatioiden optimointi

Määrityksen on aikaisemmin osoitettu toimivan 7 nM vasta-aineella, 5 nM Eu-kelaatilla ja 2  $\mu$ M sammuttajalla, mutta näiden optimaalisuudesta ei olla varmoja.<sup>35</sup> Optimoinnit aloitettiin lähtemällä liikkeelle näistä konsentraatioista tavoitteena sellaiset konsentraatiot, joilla pystytään säätämään määrittäminen sopivaksi halutulle GTP-konsentraatioalueelle, sekä saamaan näytteen ja taustan signaaleille suurin mahdollinen suhdeluku. Mitä suurempi suhdeluku näytteen ja taustan välillä on, sitä paremmin vasta-aine toimii ja luotettavampia saadut tulokset ovat.

Optimointi aloitettiin määrittämällä parhaiten toimiva konsentraatio vasta-aineelle väliltä 5-70 nM ja Eu-GTP:lle väliltä 2-50 nM testaamalla näiden erilaisia yhdistelmiä. Määrityksissä käytettiin näytteenä kaupallista GTP:tä, jonka konsentraatio vaihteli välillä 0,5-5  $\mu$ M. GTP:tä käytettiin useammassa pitoisuudessa, sillä sen konsentraatio solussa voi vaihdella riippuen olosuhteista jopa kymmenkertaisesti.<sup>4</sup>

Sopivia konsentraatioita lähdettiin etsimään kolmella vasta-ainepitoisuudella (7, 28 ja 70 nM) ja kolmella GTP-Eu -pitoisuudella (5, 20 ja 50 nM), kun GTP-konsentraatio oli 1  $\mu$ M. Määrityksen perusteella paras signaali-tausta -suhde saatiin matalalla GTP-Eu-konsentraatiolla ja hiukan korkeammalla vasta-ainekonsentraatiolla.

Seuraavan määritykseen valittiin uudet kolme vasta-aine- ja GTP-Eu-konsentraatiota (5, 10, 25 nM ja 2, 5, 10 nM) ja näitä testattiin 2  $\mu$ M GTP:llä. Signaalin ja taustan suhde 5 nM GTP-Eu:lla oli matala, joten se hylättiin, mutta muut vasta-aine- ja GTP-Eu-konsentraatiot pidettiin samoina seuraavassa määrityksessä.

Vasta-aine- ja GTP-Eu-konsentraatio-optimointien jälkeen testattiin määrittäystä kahdella eri näytteellä eli GTP-konsentraatiolla (500 nM ja 5  $\mu$ M). Lisäksi testattiin samoilla näytteillä, kuinka aikaeroitteen luminesenssimittauksen viiveajan nostaminen 600  $\mu$ s:sta 800  $\mu$ s:iin vaikuttaa signaaleihin, koska viiveen nostaminen vaikuttaa enemmän jo sammutettuihin signaaleihin.

Vasta-aine- ja GTP-Eu-optimointien jälkeen lähdettiin etsimään sammuttajalle sopivaa konsentraatiota, koska sammutetut näytesignaalit olivat liian korkealla. Sammuttajan määrää kasvatettiin alkuperäisestä 2  $\mu$ M:sta riippuen GTP-Eu pitoisuudesta (2, 5 tai 10 nM) joko 2,3; 2,5 tai 3,7  $\mu$ M:iin. Mitä suurempi määrä liuoksessa on kelaattia, sitä suurempi määrä sammuttajaa tarvitaan. Määrittäminen tehtiin edelleen kahdessa eri näytteellä.



konsentraatioissa (500 nM ja 5  $\mu$ M). Sammuttajan lisääminen auttoi kasvattamaan signaalitausta -suhdetta, mutta sammutetut signaalit 5 ja 10 nM GTP-Eu:lla vaikuttivat edelleen olevan liian korkealla.

Sammuttajan määrää nostettiin 5 nM GTP-Eu:lla 2,7  $\mu$ M:iin ja 10 nM GTP-Eu:lla 2,9  $\mu$ M:iin. Sammuttajan lisääminen ei kuitenkaan auttanut enää signaali-tausta -suhteen kasvattamisessa vaan maksimisignaali ja tausta laskivat samassa suhteessa.

### 6.3.2 Solukasvatusmediumtesti

Kehitettävässä menetelmässä on tarkoitus mitata solunsisäistä GTP-konsentraatiota solu-uutteesta. Ennen mittaamista soluja täytyy kasvattaa ja kasvatuksessa käytetään kasvatusmediumia.

Kasvatusmediumtestissä valmistettiin 1  $\mu$ M GTP-näyte erilaisiin kasvatusmediumilaimennoksiin (1:2, 1:5, 1:10, 1:20 ja 1:50). Vasta-aineen konsentraatio määrittämisessä oli 8 nM ja GTP-Eu:n 5 nM. Konsentraatiot oli osoitettu toimiviksi vasta-aine- ja GTP-Eu-optimoinneilla. Kontrollina määrittämisessä toimi pelkkään puskuriin valmistettu näyte.

### 6.3.3 Soluhajotus kemiallisesti

GTP on solunsisäistä, joten jotta sitä voidaan mitata, on solut hajotettava. Soluhajotus voidaan tehdä mekaanisesti esimerkiksi ultraäänikäsittelyllä (sonikointi) tai kemiallisesti esimerkiksi Triton X-100-detergentillä. Sonikointi ei menetelmänä sovellu seulontaan, sillä seulonnassa kuoppalevyllä olevien reagenssien tilavuudet ovat liian pieniä sonikaattorille ja lisäksi sonikoinnissa on muitakin haasteita kuten esimerkiksi liuoksen lämpeneminen. Seulontaa varten solujen hajotus on tehtävä kemiallisesti. Tämän testin tarkoituksena oli kokeilla paljonko määrittäminen kestää Triton X-100-detergenttiä ilman, että se vaikuttaa mitattavaan signaaliin.

Määrittämisessä näytteinä toimivat erilaiset Triton-laimennokset 5  $\mu$ M GTP:n kanssa ja ilman. Laimennokset (0,5 %, 0,2 % ja 0,125 %) valmistettiin milli-Q veteen tai GTP-liuokseen. Vasta-aineen konsentraatio määrittämisessä oli 8 nM ja GTP-Eu:n 5 nM.

## 6.4 Soluviljely

Solujenkasvatusprotokolla ja reagenssit olivat kaikille solutypeille samat poikkeuksena HL-60-solut, joita ei tarvinnut pestä eikä irrottaa kasvualustastaan trypsinoimalla, vaan ne voitiin siirtää suoraan kasvatuspullosta seuraavaan astiaan. Soluviljelyprotokolla ja käytetyt reagenssit on esitelty seuraavassa kappaleessa.

Solujen kasvatuksessa käytettiin DMEM-mediumia, joka sisältää glukoosia, L-glutamiinia sekä fenolipunaista. Lisäksi kasvatusmedium sisälsi 10 % FB-seerumia ja 1 % penisilliini-streptomysiini-yhdistelmäantibioottia. Kaikki soluviljelyssä käytetyt reagenssit esilämmitettiin ja pidettiin 37 °C:ssa inkubaattorissa toiminnan aikana.

Solujen kasvattaminen aloitettiin sulattamalla soluampulli lämpimässä vedessä. Lähes kokonaan sulanut solususpensio kaadettiin sentrifugiputkeen, jossa oli viisi millilitraa lämmintä kasvatusmediumia, ja soluja sentrifugoitiin (10 min 1000 g) Sentrifugoinnin jälkeen supernatantti imettiin pois pellettiä varoen ja tilalle pipetoitiin kaksi millilitraa kasvatusmediumia. Solususpensio siirrettiin T25-kasvatuspulloon, johon oli valmiiksi pipetoitu kolme millilitraa kasvatusmediumia ja T25-pullo laitettiin kasvamaan inkubaattoriin (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>).

Solujen kasvutiheyden ollessa riittävän suuri, solut joko jaettiin tai kerättiin talteen riippuen tutkimustarpeesta. Molemmissa tapauksissa solujen kasvatusmedium poistettiin kasvatuspullosta ja tilalle pipetoitiin kasvatusmediumia vastaava määrä PBS-puskuriliuosta. Puskuriliuoksen annettiin vaikuttaa noin minuutin, jonka jälkeen se imettiin pois. Pesun jälkeen lisättiin kasvatuspulloon 0,05 % trypsiini-EDTA. (T25-pulloon 2 ml ja T75-pulloon 2,5 ml). Soluja inkuboitiin ja solujen irtoamista seurattiin mikroskoopilla. Kun solut olivat irronneet, trypsinointi pysäytettiin pipetoimalla kasvatuspulloon kasvatusmediumia kaksi kertaa trypsiinin verran, ja solususpensio siirrettiin sentrifugiputkeen. Solujen sentrifugoinnin jälkeen (10 min 1000 g) supernatantti imettiin pois ja tilalle pipetoitiin kasvatusmediumia, jonka tilavuus riippui seuraavasta työvaiheesta.

### 6.4.1 Solujen jakaminen ja kerääminen

Soluja jaettaessa pelletti liuotettiin kasvatusmediumiin siten, että kuhunkin uuteen kasvatuspulloon pipetoitiin kaksi millilitraa solususpensiota. Kasvatuspulloihin oli valmiiksi

pipetoitu loput kasvatusmediumista (T25 3 ml ja T75 8 ml). T-pullojen suuaukot liekitetiin kevyesti ennen korkkien asettamista ja pulloit laitettiin inkuboitumaan (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>).

Soluja kerättäessä solujen irrottamisen ja sentrifugoinnin jälkeen solupelletti liuotettiin kasvatusmediumiin. Suspensiosta otettiin pieni näyte solujen lukumäärän määrittämistä varten ja loput liuksesta sentrifugoitiin uudelleen. Sentrifugoinnin jälkeen supernatantti imettiin pois ja solut liuotettiin puskuriliukseen, jonka tilavuus ja koostumus riippuivat solujen käyttötarkoituksesta (usein 1-4 ml määrityspuskuria). Solujen lukumäärä määritettiin aikaisemmin otetusta näytteestä hemosytometrillä Trypan Blue -värjäyksen avulla. Kerätyt solut hajotettiin sonikaattorilla (3 x 30 s).

### 6.5 Määritykset solu-uutteella

Kehitettävän GTP-konsentraatiomäärityksen herkkyys on GTP-titrauksen perusteella noin 100 nM. Yleisesti GTP-konsentraatio on eri soluissa 18–80 nmol/10<sup>8</sup> solua, joten teoreettisesti määrittäessä tarvittava solumäärä on vähintään 10<sup>8</sup> solua. Tällaisia solumääriä ei kuitenkaan voida käyttää ennen kuin solujen vaikutusta mittaukseen on tutkittu pienemmällä määrällä. Tavoitteena oli testata määrittämistä käytännössä, ja lisäksi kokeilla onko solu-uutteen sentrifugoimisella vaikutusta tuloksiin.

Soluja kerättiin kasvatuksesta määrityspuskuriin (500 000 solua/ 300 µl määrityspuskuria). Kerätyt solut hajotettiin ultraäänikäsittelyllä (3 x 30 s) jonka jälkeen puolet solu-uutteesta sentrifugoitiin (5 min 16,1 g). Näytteitä laimennettiin määrityspuskuriin ja niille tehtiin homogeeninen QRET-määritys kahdessa eri vasta-aine (8 nM ja 16 nM) ja kahdessa eri GTP-Eu (5 nM ja 10 nM) konsentraatiossa. Solujen eri määrät kaivoissa olivat 1800, 900 ja 450. Standardina määrittäessä toimi GTP-laimennussarja välillä 0-2 µM.

### 6.6 Sitoutumisominaisuuksiltaan muunnetut vasta-aineet

Alkuperäisen 2A4<sup>GTP</sup>-Fab-fragmentin sitoutumisominaisuuksia oli muutettu affiniteettimaturaation avulla toisessa projektissa. Muutoksia tehtiin positiivisesti varatun GTP-sitoutumistaskun läheisyydellä oleviin aminohappoihin. Alkuperäisestä vasta-aineesta oli valmistettu kokonainen vasta-ainekirjasto, josta valittiin parhaat faaginäyttötekniikalla.

Uusia Fab-fragmentteja oli yhteensä yhdeksän uutta. Seuraavien määritysten tavoitteena oli testata, paransiko sitoutumisominaisuuksien muuttaminen vasta-aineiden toimivuutta ja lisäksi, miten uudet vasta-aineet toimivat suhteessa alkuperäiseen. Uusille vasta-aineille tehtiin kokonaisvasta-ainemääritys, jotta niiden pitoisuudet saatiin selvitettyä. Määrityksen periaate on kerrottu kohdassa 6.2.

#### 6.6.1 Heterogeeninen vasta-ainemääritys

Kaikille vasta-aineille tehtiin heterogeeninen vasta-ainemääritys alkuperäisen 2A4<sup>GTP</sup>-Fab-fragmentin toimiessa kontrollina. Määritys tehtiin kahdessa eri suolapitoisuudessa, sillä uusien vasta-aineiden sitoutumisominaisuuksien parantaminen oli tehty korkeammassa suolapitoisuudessa, kuin mitä määrityksissä oli ollut tapana käyttää.

96-kuoppalevy (Polyclonal rabbit anti-mouse IgG) esipestiin levypesurilla ja levyille pipe-toitiin 5 nM vasta-aineita. Levyä inkuboitiin huoneenlämpötilassa kaksi tuntia hitaassa ravistelussa, jonka jälkeen se pestiin neljä kertaa levypesurilla. Kaikkiin kaivoihin lisättiin 50 nM Eu-GTP ja inkuboinnin jälkeen levy pestiin jälleen neljä kertaa ennen aikaerotteisen luminesenssin mittaamista.

#### 6.6.2 Homogeeninen vasta-ainemääritys

Kaikilla uusilla vasta-aineilla tehtiin homogeeninen kilpaileva QRET-määritys, jossa keikittiin vasta-aineiden sitoutumista GTP- ja GDP-molekyyleihin. Määrityksessä testattiin kahta eri GTP-konsentraatiota, jotka olivat 100 nM ja 1  $\mu$ M, ja yhtä GDP-konsentraatiota, joka oli 1  $\mu$ M. Käytetty NaCl<sub>2</sub> suolapitoisuus oli 1mM.

Toiseen homogeeniseen määritykseen valittiin heterogeenisen määrityksen perusteella parhaiten toiminut A9 ja lisäksi A5 Fab-fragmentti, jonka oletettiin toimivan parhaiten aikaisempien testien perusteella. Alkuperäinen 2A4<sup>GTP</sup>-Fab-fragmentti toimi edelleen kontrollina. Määritys tehtiin kolmessa eri NaCl<sub>2</sub> suolapitoisuudessa, jotka olivat 1 mM, 50 mM ja 150 mM. Vasta-aineen konsentraatio määrityksessä oli 7 nM, Eu-kelaatin 9 nM, sammuttajan 1,5  $\mu$ M ja kaupallisen GTP:n 500 nM.

## 7 TULOKSET JA PÄÄTELMÄT

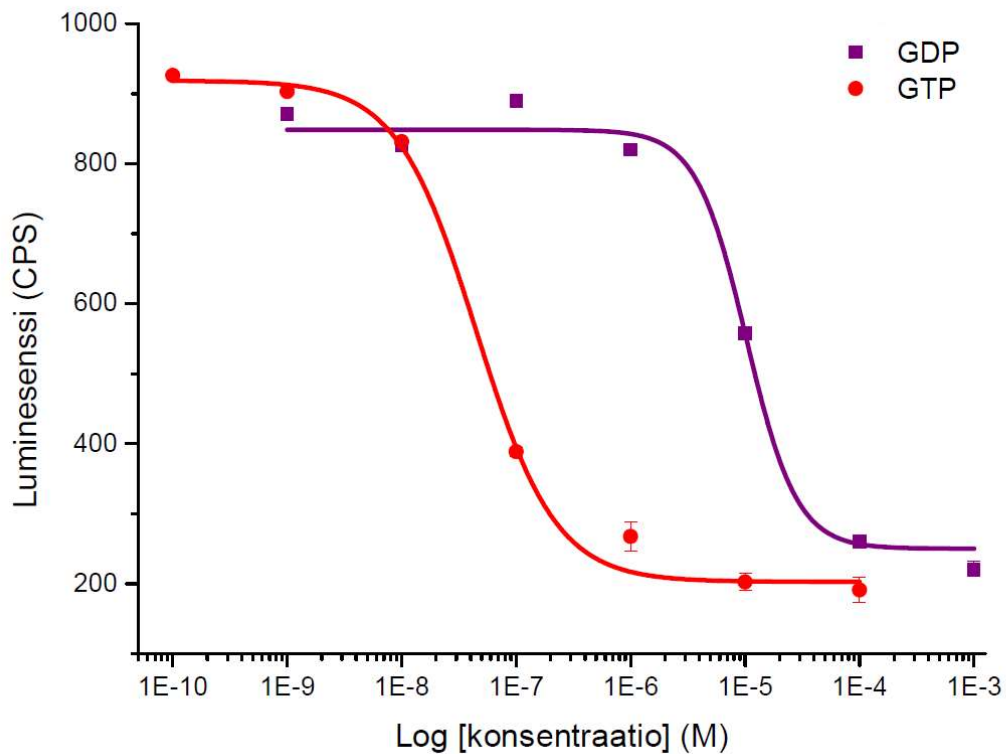
Seuraavissa kappaleissa on esitetty opinnäytetyön aikana saadut tulokset ja päätelmät. Tulokset on esitetty samojen otsikoiden alla kuin käytännöntyön vaiheet.

### 7.1 Vasta-aineen analysointi

Fermentoimalla tuotetun vasta-aineen pitoisuudet määritettiin ja vasta-aineen toimintakykyä verrattiin aikaisemmin pienemmässä mittakaavassa tuotettuun vasta-aineeseen. Vasta-aineella tehtiin lisäksi GTP-lisäysmääritys, jossa tutkittiin, mitataanko teoriassa oikeaa asiaa. Näiden määritysten tulokset on esitetty seuraavaksi.

#### 7.1.1 Vasta-aineen spesifisyyden määrittäminen

Tuotetun vasta-aineen toimivuus ja spesifisyys GTP:lle määritettiin tekemällä sille homogeeninen titrausmääritys verraten vasta-aineen spesifisyyttä kahdelle eri nukleotideille (GTP ja GDP). Määrityksessä  $IC_{50}$  arvot GTP:lle (50 nM) ja GDP:lle (10  $\mu$ M) olivat, kuten aikaisempien määritysten mukaan oli oletettu. Käytännössä tämä tarkoittaa, että  $2A4^{GTP}$ -vasta-aine sitoutuu noin 100 kertaa herkemmin GTP-molekyylisiin kuin GDP-molekyylisiin. Titrauskäyristä näkee myös, että GTP:tä ei ole tarvittavaa käyttää yli 1  $\mu$ M konsentraatioita, sillä suuremmilla konsentraatioilla ei ole enää vaikutusta signaalin suuruuteen. (kuvaaja 3).

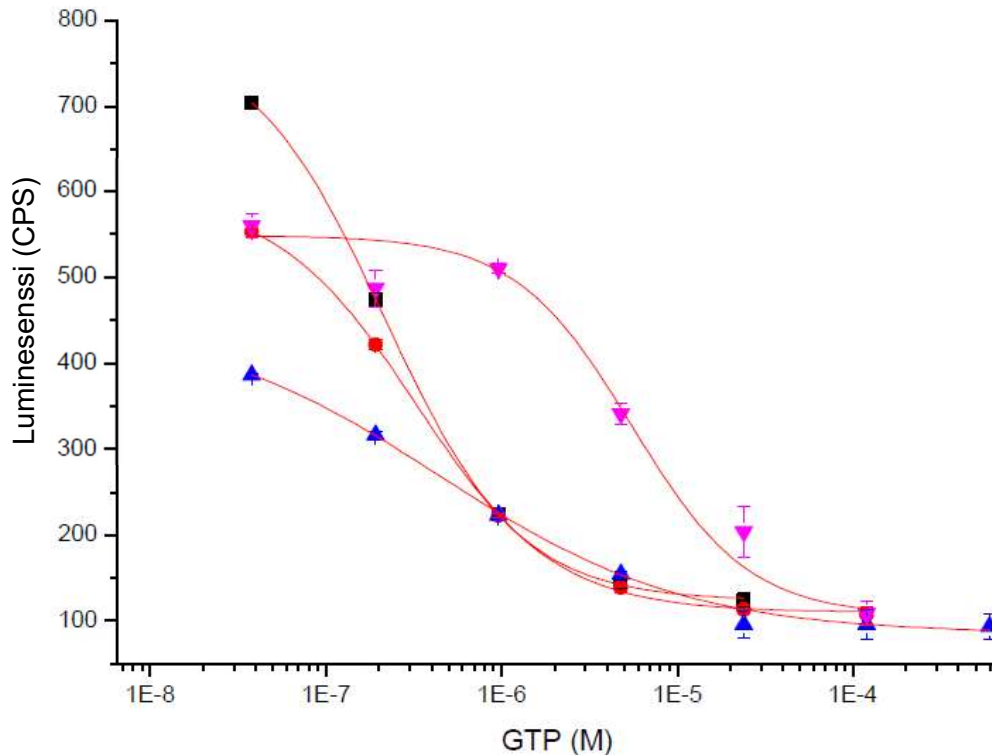


Kuvaaja 3. Vasta-aineen spesifisyyden testaus GTP- ja GDP-titrauksilla.

### 7.1.2 GTP-lisäyksen ja entsyymiaktiivisuuden vaikutus GTP-määrään

Homogeenisessa määrittäyksessä yön yli huoneenlämpötilassa seisotetulla näytteellä saatiin korkeampia signaaleja kuin näytteellä, jota oli säilytetty pakastimessa. Huoneenlämpötilan mahdollistama entsyymiaktiivisuus siis kulutti GTP:tä näytteestä. Lisäksi GTP:tä hajosi luontaisen, ei-entsyymäattisen hajoamisen kautta mahdollisesti jopa enemmän, kuin entsyymien vaikutuksesta, sillä entsyymien aktiivisuus ei kestä pitkään huoneenlämpötilassa.

GTP:n lisääminen toimi kuten oli oletettu. Näytteillä, joihin oli lisätty kaupallista GTP:tä, saatiin suhteessa matalampia signaaleja kuin näytteellä jonka GTP tuli pelkästä solu-utuksesta. Teoriassa signaalien tulisi olla yhtä suuret riippumatta GTP:n alkuperästä, kun lopullinen GTP-konsentraatio on kaikilla sama. GTP:n lisäys kuitenkin osoitti, että mitataan GTP:n sitoutumista ja signaalit muuttuivat oikein riippuen lisätyn kaupallisen GTP:n konsentraatiosta (kuvaaja 4).



Kuvaaja 4. GTP-lisäyksen ja entsyymiaktiivisuuden vaikutus GTP-määrään. Mustilla neliöillä merkattu alkuperäistä näytettä, vaaleanpunaisilla kolmioilla näytettä, jota on seisoitettu huoneen lämmössä ja punaisilla ympyröillä sekä sinisillä kolmioilla näytteitä joihin lisättiin kaupallista GTP:tä.

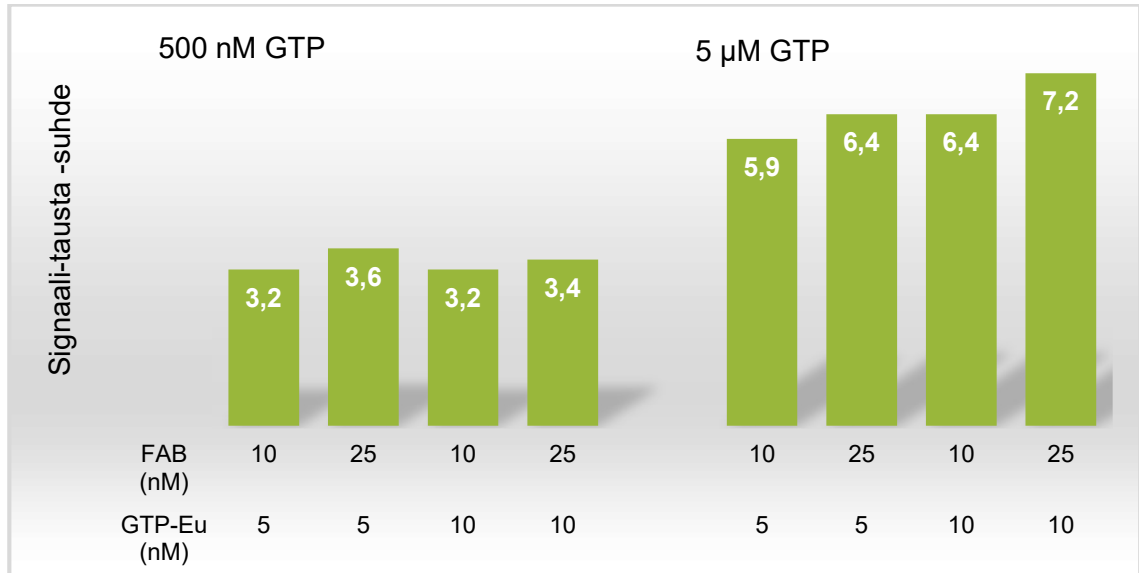
## 7.2 Määrityksen optimointi

GTP-konsentraatiomäärityksen olosuhteita sekä reagenssien pitoisuuksia optimoitiin ja optimointien tulokset on esitetty seuraavissa kappaleissa.

### 7.2.1 Vasta-aine- ja GTP-Eu-konsentraatioiden optimointi

Optimointimäärityksillä saatiin selville, että pieni GTP-Eu määrä toimii parhaiten matalassa GTP-konsentraatiossa ja suuri GTP-Eu määrä toimii parhaiten korkeassa GTP-konsentraatiossa. Lisäksi selvitetiin, että vasta-ainetta on hyvä käyttää enemmän kuin GTP:tä. Parhaiten testatuista yhdistelmistä toimi 25 nM vasta-aine + 10 nM GTP-Eu. Erot eivät kuitenkaan olleet suuria, ja kun tavoitteena on kehittää seulontamääritys jossa

materiaalien kulutus mahdollisimman pientä, voidaan jatkossa käyttää 8 nM vasta-ainetta ja 5 nM GTP-Eu:ta. Mittauksissa korkeammat signaali-tausta -suhteet saatiin 5  $\mu$ M GTP-näytteellä (kuvaaja 5). Nostamalla mittauksen viiveaikaa saatiin kasvatettua signaali-tausta -suhdetta, mutta viiveen nostamisella ei saavutettu merkittävää hyötyä, joten se pidettiin 600  $\mu$ s:ssa.

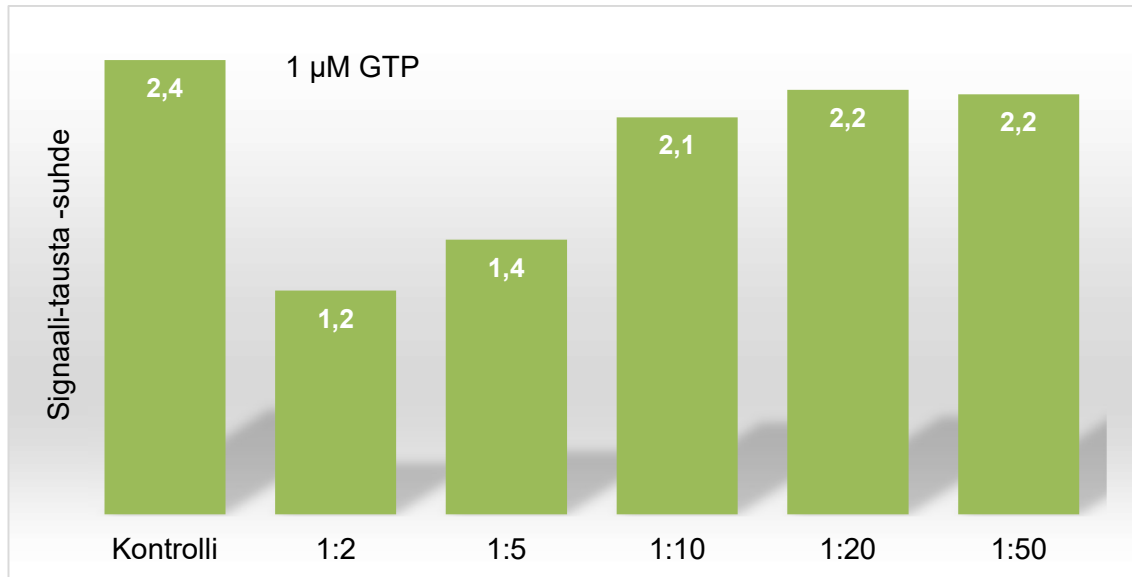


Kuvaaja 5. Vasta-aine- ja GTP-Eu-konsentraatioiden optimoinnin tulos.

### 7.2.2 Solukasvatusmediumtesti

Lopullisen menetelmän kehittämistä varten tuli tietää, häiritseekö kasvatusmedium määrittystä, eli täytyykö medium pestä pois vai voiko mediumia sisältävää solu-uutetta käyttää suoraan määrittäksessä. Määrittäksessä selvisi, että kasvatusmediumlaimennos 1:2 ja 1:5 häiritsevät määrittystä, mutta niitä suurempi laimennos ei (kuvaaja 6). Myöhemmissä määrittäksissä voidaan siis käyttää näytteenä kasvatusmediumia sisältävää solu-uutetta, sillä se laimentuu kaivoissa riittävästi.

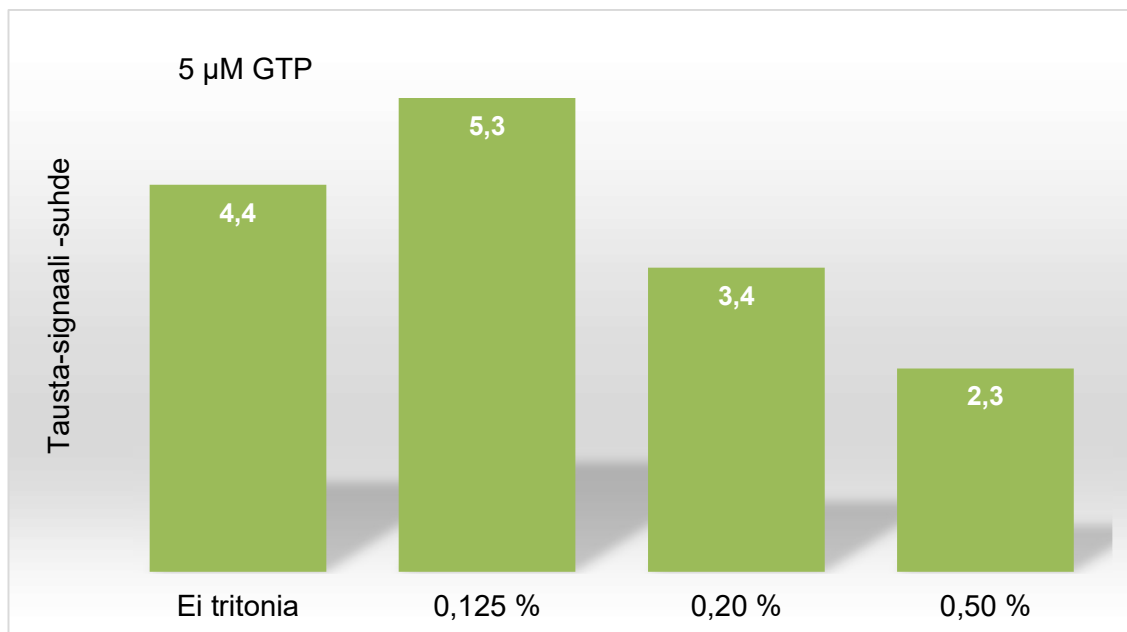




Kuvaaja 6. Erialaisten kasvatusmediumlaimennosten vaikutus määrittämiseen.

### 7.2.3 Soluhajotus kemiallisesti

Tavoitteena oli selvittää, onko solujen hajotus mahdollista tehdä kemiallisesti Triton X-100-detergentillä. Määrittämissä sisältämä pieni määrä Triton X-100-detergenttiä on mittauksen onnistumisen kannalta välttämätöntä. Solujen hajotustestissä selvisi, että levyllä voi olla 0,20 % tai sitä pienempi määrä Triton X-100-detergenttiä ilman, että se vaikuttaa liikaa luminesenssisignaaleihin. Solujen hajotukseen tarvittava Triton-konsentraatio on 1 %. Mittauksessa solunäytettä usein laimennetaan ennen annostelua kuoppalevyille, ja lisäksi solunäyte laimenee kuoppalevyllä lisää johtuen muista määrittämissä käytettävistä reagensseista. Solujen hajottaminen kemiallisesti on siis mahdollinen vaihtoehto mekaanisen hajottamisen tilalle, sillä solunäyte laimenee riittävästi kuoppalevyllä (kuvaaja 7).

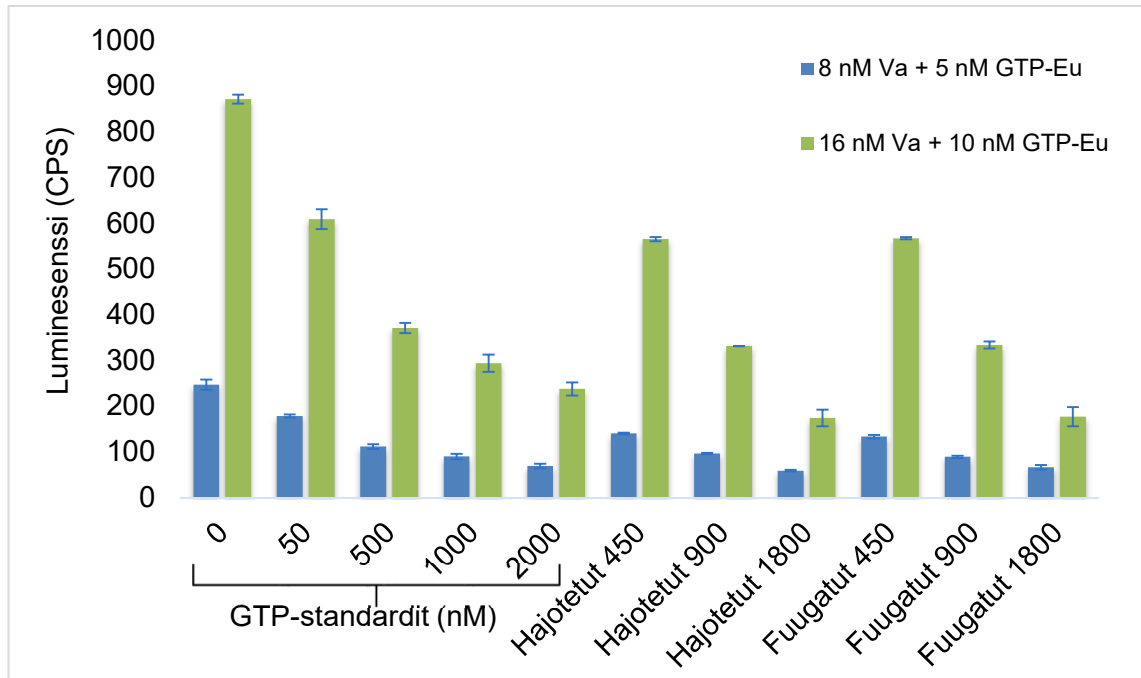


Kuvaaja 7. Triton X-100-detergentin vaikutus TRF-signaaleihin.

### 7.3 Määritykset solu-uttelella

Määrityksen tavoitteena oli testata homogeenista QRET-määritystä käytännössä pienellä määrällä solu-utetta, ja lisäksi selvittää, onko soluja tarpeellista sentrifugoida hajottamisen jälkeen. Määrityksessä käytettiin pieniä solumääriä menetelmän alkukehitysvaiheen häiriöiden kartoittamiseksi.

Tuloskuvaajasta (kuvaaja 8) näkee, että solujen sentrifugoinnilla ei vaikuta olevan merkitystä signaaleihin, joten se ei ole pakollinen työvaihe määrityksessä. Sentrifugoinnin poisjättäminen mahdollistaa, että määritys voitaisiin suorittaa suoraan kuoppalevyllä. Tämä tarkoittaisi sitä, että soluja ei tarvitsisi kerätä soluviljelystä erilliseen keräysastiaan, vaan soluja voitaisiin viljellä, ne voitaisiin hajottaa ja määritys voitaisiin tehdä suoraan levyllä. Lisäksi kuvaajasta nähdään, että mitä enemmän määrityksessä on soluja, sitä pienempi signaali saadaan, ja sitä suurempi GTP-konsentraatio näytteellä on. Kuvaajan perusteella näyttää siltä, että jo hyvin pienellä määrällä soluja saadaan korkea GTP-konsentraatio. Esimerkiksi noin 900 solussa olisi melkein 1  $\mu\text{M}$  GTP-konsentraatio. Käytännössä tämä ei kuitenkaan ole mahdollista, joten solu-utteleessa on jotain komponentteja, jotka häiritsevät määritystä. Signaalien suunta on kuitenkin oikea, joten menetelmällä on jatkokehitysmahdollisuuksia.

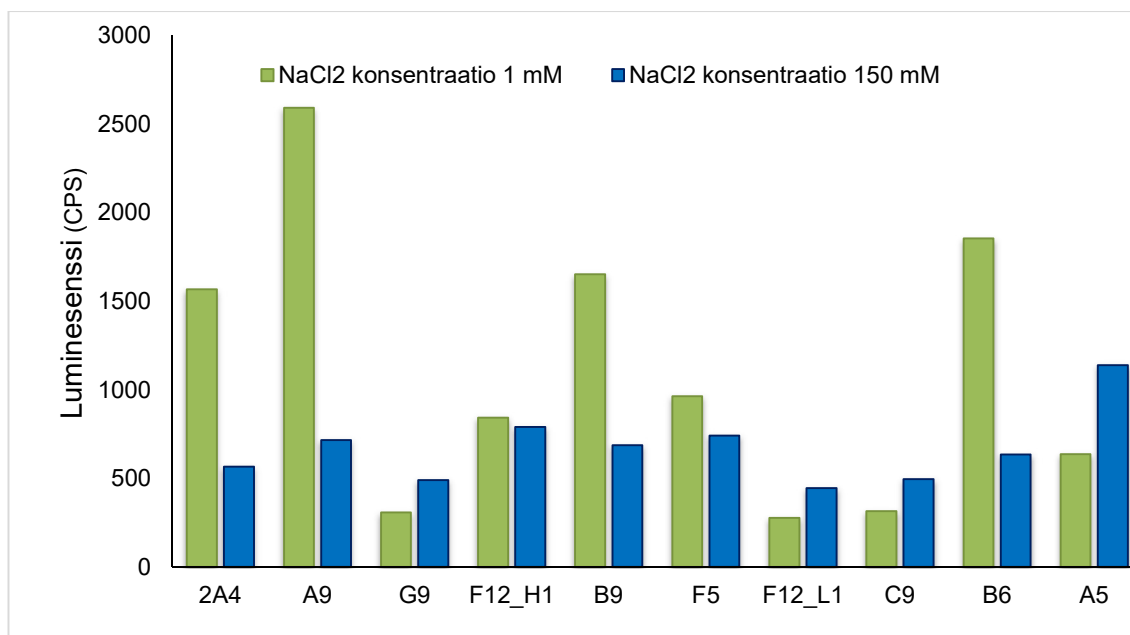


Kuvaaja 8. Määrityksen testaus solu-utteella, ja hajotettujen solujen sentrifugoinnin vaikutus signaaleihin.

#### 7.4 Sitoutumisominaisuuksiltaan muunnetut vasta-aineet

Alkuperäisen 2A4<sup>GTP</sup>-Fab-fragmentin pohjalta oli luotu vasta-ainekirjasto, joka oli seulottu faaginäyttötekniikalla, ja seulonnan perusteella valittu yhteensä yhdeksän uutta potentiaalista fragmenttia. Uusille vasta-aineille tehtiin kokonaisvasta-ainemääritys ja lisäksi sekä heterogeeninen että homogeenin määritys. Näille uusille vasta-aineille määritystä ei optimoitu, vaan mittaukset tehtiin samoilla reagensseilla sekä samoissa olosuhteissa, kuin aikaisemmat määritykset. Poikkeuksena oli kolmen eri suolakonsentraation käyttäminen, sillä vasta-aineiden seulonta oli tehty korkeammassa suolapitoisuudessa, ja oli siis oletettavaa, että uudet vasta-aineet toimivat paremmin korkeassa suolapitoisuudessa. Seulonnan tulosten perusteella uuden A5-fragmentin tulisi toimia selkeästi paremmin, kuin alkuperäisen 2A4<sup>GTP</sup>-Fab-fragmentin.

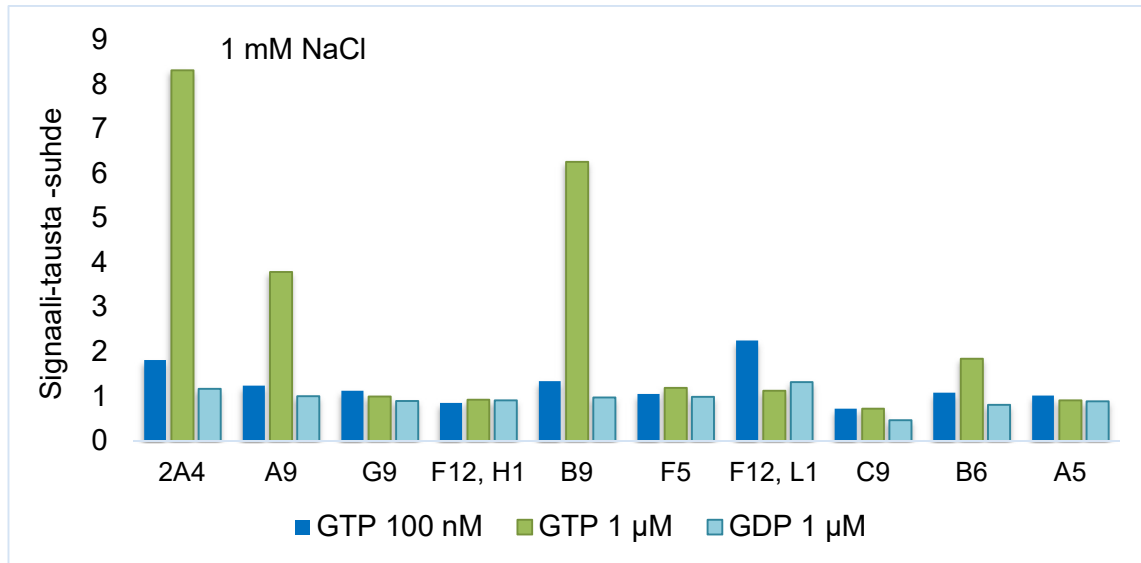
Heterogeeninen määritys toimi kuten oli oletettu, ja A5-fragmentti toimi parhaiten, mutta vain kun käytettiin korkeampaa 150 mM suolapitoisuutta. Matalammassa suolapitoisuudessa paras tulos saatiin A9-fragmentilla (kuvaaja 9).



Kuvaaja 9. Heterogeeninen vasta-ainemääritys kahdessa suolapitoisuudessa.

Kaikilla vasta-aineilla tehtiin homogeeninen kilpaileva määrittys. Kuvaajasta 10 näkee, että matalalla GTP-konsentraatiolla tai GDP:llä määrittys ei toimi lainkaan, ja signaalitasta -suhde jää matalaksi. Hiukan korkeammalla GTP-konsentraatiolla signaalin ja taustan suhde on sen sijaan selkeästi suurempi alkuperäisellä vasta-aineella ja lisäksi kahdella uudella vasta-aineella (A9 ja B9). Aikaisempien määritysten mukaan A5-vasta-aineen pitäisi toimia selkeästi paremmin kuin alkuperäisen 2A4<sup>GTP</sup>-vasta-aineen. Uusien vasta-aineiden kehitys on kuitenkin tehty korkeammassa suolapitoisuudessa kuin mitä tässä määrittäksessä käytettiin, joten oli epätodennäköistä, että ne toimisivat optimaalisesti 2A4<sup>GTP</sup>-vasta-aineelle optimoiduissa olosuhteissa.

Toiseen homogeeniseen määrittäykseen valittiin vain heterogeenisessä määrittäyksessä molemmassa suolapitoisuuksissa parhaiten toimineet Fab-fragmentit (A9 ja A5) sekä kontrolli, ja näitä testattiin kolmessa eri suolapitoisuudessa. Määrittäyksessä 2A4<sup>GTP</sup> ja A9 käyttäytyivät melko samalla tavalla ja vaikuttivat toimivan. Sen sijaan A5 ei näyttänyt toimivan lainkaan edes korkeammassa suolapitoisuudessa. Uudet vasta-aineet kuitenkin osoittivat selkeää sitoutumista GTP-molekyylisiin.



Kuvaaja 10. Homogeeninen kilpaileva määrittäminen.

## 8 MENETELMÄN JATKOKEHITTÄMINEN

Tämän työn tarkoituksena oli kehittää GTP:n tunnistavaan vasta-aineeseen ja QRET-menetelmään pohjautuvaa GTP-konsentraationmäärittystä. Opinnäytetyön aikana testattiin tuotetun vasta-aineen toimivuutta teoriassa, optimointiin mittausolosuhteita alkuperäiselle 2A4<sup>GTP</sup>-Fab-fragmentille, ja testattiin määrittelyn toimivuutta solu-uutteella. Lisäksi tehtiin määrittelyjä affiniteettimaturoiduilla uusilla vasta-aineilla.

Tutkitun vasta-aineen on aikaisemmin osoitettu sitoutuvan herkemmin guanosiinipohjaisiin nukleotideihin kuin muihin nukleotideihin. Tässä työssä testattiin 2A4<sup>GTP</sup>-vasta-aineen teoreettista spesifisyyttä GTP- ja GDP-molekyyleihin. Määrittysten perusteella voidaan sanoa, että tuotettu vasta-aine tunnistaa GTP-molekyylin muita nukleotideja spesifemmin. Menetelmä toimii teoriassa hyvin puhtaissa olosuhteissa, ja signaalille ja taustalle saatiin selkeää eroa. Solu-uutteen kanssa tehdyissä QRET-määrittelyissä signaalien suunta oli oikea, eli pienellä solumäärällä saatiin korkeampia signaaleja kuin suuremmalla solumäärällä. Solu-uutteella vaikuttaa kuitenkin tapahtuvan epäspesifistä sitoutumista, tai solu-uutteen komponentit häiritsevät muuten määrittystä, sillä jo hyvin pienellä määrällä solu-uutetta saatiin hyvin korkeita GTP-konsentraatioita. Tähän ongelmaan saattaisi olla ratkaisuna solu-uutteen lisäpuhdistaminen tai mittaustekniikan vaihtaminen, sillä QRET-menetelmässä käytettävä liukoinen sammuttaja ei toimi optimaalisesti kompleksisissa liuoksissa.

Affiniteettimaturoiduille vasta-aineille ei tämän opinnäytetyön puitteissa ehditty optimoimaan määrittelyolosuhteita, vaan kaikki määrittelyt tehtiin alkuperäiselle 2A4<sup>GTP</sup>-vasta-aineelle optimoiduissa olosuhteissa. Uusien vasta-aineiden seulonta ja kehitystyö on tehty korkeammassa suolapitoisuudessa kuin mitä 2A4<sup>GTP</sup>-vasta-aine tarvitsee toimiakseen, joten tässä työssä uusilla vasta-aineilla tehdyt määrittelyt tehtiin useammassa suolapitoisuudessa. Tavoitteena on, että uudet vasta-aineet saataisiin toimimaan fysiologisessa suolapitoisuudessa, joka on usein määrittysten kannalta käytettävämpi. Osa uusista vasta-aineista vaikuttaa tunnistavan GTP-molekyylin hyvin, mutta koska uusille vasta-aineille ei ole vielä tehty optimointia, ei voida sanoa, tuottiko sitoutumisominaisuuksien muuttaminen merkittävää hyötyä. Olosuhteiden optimoinnin myötä uudet vasta-aineet saattaisivat auttaa solu-uutteesta johtuviin ongelmiin, jolloin solu-uutetta ei tarvitsisi puhdistaa lisää, ja säästyttäisiin yhdeltä tai useammalta välivaiheelta.

Jatkotavoitteena tälle menetelmälle on käyttää sitä GTP-konsentraatioon vaikuttavien lääkemolekyylin seulonnassa. Tarkoituksena on seuloa molekyyliä, joiden avulla solujen GTP-konsentraatiota voitaisiin muuttaa ja sen kautta pystyttäisiin esimerkiksi vaikuttamaan solujen erilaistumiseen tai saattamaan solu apoptoosiin. Tällaisten molekyylien löytäminen olisi merkittävää muun muassa syöpähoitojen kehittämisessä.

## 9 LÄHTEET

1. *The Lipid Kinase PI5P4Kb Is an Intracellular GTP Sensor for Metabolism and Tumorigenesis.* Kazutaka Sumita, Yu-Hua Lo, Koh Takeuchi, ..., Dimitrios Anastasiou, Toshiya Senda, Atsuo T. Sasaki. 2016, Molecular Cell.
2. *Intracellular GTP level determines cell's fate toward differentiation and apoptosis.* Azadeh Meshkini, Razieh Yazdanparast, Kazam Nouri. 2011, Toxicology and Applied Pharmacology.
3. *A homogeneous quenching resonance energy transfer assay for the kinetic analysis of the GTPase nucleotide exchange reaction.* Kari Kopra, Alessio Ligabue, Qi Wang, Markku Syrjänpää, Olga Blaževitš, Stefan Veltel, Arjan J. van Adrichem, Pekka Hänninen, Daniel Abankwa, Harri Härmä. 2014.
4. *Non-competitive aptamer-based quenching resonance energy transfer assay for homogeneous growth factor quantification.* Kari Kopra, Markku Syrjänpää, Pekka Hänninen, Harri Härmä. 2013.
5. *GTP-Specific Fab Fragment-Based GTPase Activity Assay.* Kari Kopra, Anita Rozwandowicz-Jansen, Markku Syrjänpää, Olga Blaževitš, Alessio Ligabue, Stefan Veltel, Urpo Lamminmäki, Daniel Abankwa, Harri Härmä. 2015, Analytical chemistry.
6. *Modeling ischemia in vitro: selective depletion of adenine and guanine nucleotide pools.* Dagher, Pierre C. 2000, American Journal of Physiology - Cell Physiology.
7. Study Guide - Biotechnology and Cell Culture, University of Kent. [Online] [Viitattu: 16. Helmikuu 2016.]  
<https://moodle.kent.ac.uk/external/mod/book/view.php?id=2604&chapterid=160>.
8. Cambridge research chemicals. [Online] [Viitattu: 16. Tammikuu 2016.]  
<http://www.crbdiscovery.com/products/immunological/homogenous-assay-products.php>.
9. ECACC. *Fundamental Techniques in Cell Culture.* 2015.
10. *Mammalian cell culture.* Marquis, C.P.



11. lifelinecell technology. [Online] [Viitattu: 23. Helmikuu 2016.]  
<http://www.lifelinecelltech.com/5-things-to-know-primary-cells-versus-cell-lines/>.
12. *Two ScFv antibody libraries derived from identical VL–VH framework with different binding site designs display distinct binding profiles*. Tuomas Huovinen, Markku Syrjänpää, Hanna Sanmark, Eeva-Christine Brockmann, Alex Azhayev, Qi Wang, Markus Vehniäinen ja Urpo Lamminmäki. s.l. : Protein Engineering, Design & Selection, 2013.
13. Biowest. [Online] [Viitattu: 27. tammikuu 2016.]  
<http://www.biowest.net/products/cell-culture-reagents-others/phenol-red/>.
14. Lonza. [Online] [Viitattu: 27. Tammikuu 2016.] <http://www.lonza.com/products-services/bio-research/cell-culture-products/reagents/antibiotics-antimycotics/penicillin-streptomycin.aspx>.
15. Sigma Aldrich. [Online] [Viitattu: 27. tamminkuu 2016.]  
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/f2442?lang=fi&region=FI>.
16. Sigma Aldrich. [Online] [Viitattu: 25. Tammikuu 2016.]  
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/g8877?lang=fi&region=FI>.
17. Solunetti. [Online] [Viitattu: 29. Tammikuu 2016.]  
<http://www.solunetti.fi/fi/patologia/fibroblasti/>.
18. HELDA – Helsingin yliopiston digitaalinen arkisto. [Online] [Viitattu: 29. Tammikuu 2016.] <https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/157159/Sinerv%C3%A4Anu-Maria1997.pdf?sequence=1>.
19. Thermofisher. [Online] [Viitattu: 27. tammikuu 2016.]  
<https://www.thermofisher.com/fi/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-protocols/freezing-cells.html>.
20. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. 2002.
21. Solunetti. [Online] [Viitattu: 22. Maaliskuu 2016.]  
<http://www.solunetti.fi/fi/histologia/vasta-aineet/>.

22. BitesizeBio. [Online] [Viitattu: 22. Maaliskuu 2016.] <http://bitesizebio.com/24645/11-reasons-why-you-should-use-recombinant-antibodies-rabs/>.
23. Kari Kopra, väitöskirja. *Functional GTPase Assays Utilizing Quenching Resonance Energy Transfer (QRET) Technology*. 2015.
24. Goldbio. [Online] [Viitattu: 30. Maaliskuu 2016.]  
<https://www.goldbio.com/blog/159/how-to-really-choose-a-cell-line-from-the-basics-to-the-complex-aspects-of-deciding-on-your-cell-line>.
25. Thermo Scientific. [Online] [Viitattu: 30. Maaliskuu 2016.]  
<https://www.thermofisher.com/fi/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-morphology.html>.
26. Freshney, I. R. *Culture of Animal Cells: A manual of basic techniques*. 2005.
27. Edu. [Online] [Viitattu: 31. Maaliskuu 2016.]  
<https://www.rpi.edu/dept/bcbp/molbiochem/MBWeb/mb1/part2/signals.htm>.
28. Matthew J Smith, Christopher B Marshall, Francois-Xavier Theillet, Andres Binolfi, Philipp Selenko ja Mitsuhiko Ikura. *Real-time NMR monitoring of biological activities in complex physiological environments*. s.l. : Current Opinion in Structural Biology, 2015.
29. Promega. [Online] [Viitattu: 2. Huhtikuu 2016.] <https://fi.promega.com/products/cell-signaling/gtpase-detection-system/gtpase-assay/>.
30. Härmä, Harri;ym. *A New Simple Cell-Based Homogeneous Time-Resolved Fluorescence QRET Technique for Receptor-Ligand Interaction Screening*. 2009.
31. Thermo Fisher. [Online] [Viitattu: 21. Huhtikuu 2016.]  
<https://www.thermofisher.com/fi/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-antibody-production-purification.html>.
32. Slideshare. *Principles of cell culture*. [Online] [Viitattu: 21. Huhtikuu 2016.]  
<http://www.slideshare.net/meghabedekar/principles-of-cell-culture>.
33. Edu. *NMR-spektrometria*. [Online] [Viitattu: 14. Huhtikuu 2016.]  
[http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/analyysimenetelmat\\_5-6\\_NMR-spektrometria.html](http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/analyysimenetelmat_5-6_NMR-spektrometria.html).

34. Solunetti. *Vasta-aineet*. [Online] [Viitattu: 14. Huhtikuu 2016.]  
<http://www.solunetti.fi/fi/histologia/vasta-aineet/3/>.

35. Bioinfoweb. [Online] [Viitattu: 10. Toukokuu 2016.] [http://bioinfoweb.com/Protocol-preparation-of-1000ml-10X-dulbeccos-phosphate-buffer-saline-\(PBS\).htm](http://bioinfoweb.com/Protocol-preparation-of-1000ml-10X-dulbeccos-phosphate-buffer-saline-(PBS).htm).

## Fermentoinnin solumedium

### SB-medium + 100 µg/ml ampicilliini

300 g MOPS

900 g Tryptoni

600 g Hiivauute

30 l H<sub>2</sub>O

pH säädettiin fermentorissa 7,00

Steriloitiin fermentorissa 20 min 121,5 °C.

## Proteiinipuhdistus- ja suolanpoistoliuoksia 1

### Puhdistuspuskuri, 20 mM phosphate + 0,5 M NaCl

35,598 g  $\text{HNa}_2\text{O}_4\text{P} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  / 1 L  $\text{H}_2\text{O}$  → 81,0 ml

27,6 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  / 1 L  $\text{H}_2\text{O}$  → 19,0 ml + 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$

29,22 g NaCl

100 ml 0,5 M EDTA

700 ml  $\text{H}_2\text{O}$

Suodatettiin 0,2  $\mu\text{m}$  imusuodattimella.

### Regenerointipuskuri, 20 mM phosphate + 0,5 M NaCl

35,598 g  $\text{HNa}_2\text{O}_4\text{P} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  / 1 L  $\text{H}_2\text{O}$  → 81,0 ml

27,6 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  / 1 L  $\text{H}_2\text{O}$  → 19,0 ml + 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$

29,22 g NaCl

800 ml  $\text{H}_2\text{O}$

pH säädettiin 7,4:een. Suodatettiin 0,2  $\mu\text{m}$  imusuodattimella.

### TBS-sitoutumispuskuri, 50 mM Tris-Cl, pH 7,5 (A-puskuri)

8,76 g NaCl

6,05 g Tris-base

1 L  $\text{H}_2\text{O}$

pH säädettiin 7,5:een 5 M suolahapolla.

Suodatettiin 0,2  $\mu\text{m}$  suodattimen läpi.

## Proteiinipuhdistus- ja suolanpoistoliuoksia 2

TBS eluutiopuskuri, 50 mM Tris-Cl, pH 7,5 (B-puskuri)

8,76 g NaCl

6,05 g Tris-base

1 L H<sub>2</sub>O

34,04 g Imidazole

pH säädettiin 7,5:een 5 M suolahapolla. Suodatettiin 0,2 µm imusuodattimella.

Suolanpoistoeluutiopuskuri, 10 mM Tris, 10 mM NaCl

0,5844 g NaCl

1,2114 g Tris Base

100 ml 0,1 M HCl

900 ml H<sub>2</sub>O

## Proteiinipuhdistuksen eluutiokuvaaja

