

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Laboratoriotekniikka

2012

Kowstan Eskandari

ELONGAATIOTEKIJÄ ALFA YHDEN SITOUTUMINEN PROMOOTTORIALUEELLE



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Kowstan Eskandari

ELONGAATIOTEKIJÄ ALFA YHDEN SITOUTUMINEN PROMOOTTORIALUEELLE

Tämä opinnäytetyö tehtiin Åbo Akademin biotieteiden laitoksella, professori Lea Sistosen laboratoriossa BioCityssä.

Opinnäytetyössä tutkittiin, miten solut reagoivat stressiin ja miten ne selviävät stressistä. Päähuomiona oli lämpöshokkitekijä 1:n (HSF1) ja elongaatitekijä alfa 1:n (eEF α -1) vuorovaikutus DNA:n kanssa. Opinnäytetyössä käytettiin oligonukleotidipresipitaatio-menetelmää, jolla tietyille emäsjärjestykselle sitoutuneet proteiinit eristetään. Työ sisälsi paljon soluviljelyä, tuman eristystä, sekä proteiini-DNA -vuorovaikutusten analysointia.

Oligonukleotidipresipitaatio-menetelmällä eristettiin DNA:han sitoutunut HSF1:n solun muusta HSF-populaatiosta. Tällä menetelmällä voidaan tutkia, mitä muita proteiineja sitoutuu DNA:han HSF-perheen kanssa ja millaisessa tilassa HSF1 sitoutuu DNA:han. Tilalla tarkoitetaan sitä, että HSF1:tä säädellään liittämällä siihen eri molekyylejä, esimerkiksi fosfaattiryhmiä, joka puolestaan viestittää geeniluennan aloittamisesta. Tällä uudella tekniikalla voidaan tutkia, mitkä nämä kyseiset fosforylaatiokohdat HSF1:ssä ovat ja mitä ne viestittävät DNA:lla.

Oligonukleotidipresipitaatio-menetelmällä tutkittiin viljeltyjä ihmisen kohdunkaulansyöpäsoluja, joita lämpökäsikelttiin 42 °C:ssa puoli tuntia. Solujen keräämisen jälkeen tehtiin kokosolu- ja tumalysaatteja. Ennen varsinaista menetelmää tumat rikastettiin ja solut esipuhdistettiin. Näiden jälkeen solulyysaatteihin lisättiin oligonukleotidi, jolla eristettiin DNA:n sitoutuva HSF1 sekä mahdolliset muut proteiinit.

DNA:n sitoutuneiden proteiinien analysointiin käytettiin akryyliamidigeeliä, joka erottelee proteiinit koon perusteella, sekä vasta-aineita, joilla proteiinit tunnistetaan. Pääasiassa käytetyt vasta-aineet olivat HSF1, HSF2 ja eEF α -1. Tässä opinnäytetyössä keskityttiin lämpöshokkitekijöihin ja elongaatitekijä alfa 1:een. Tuloksien perusteella lisätutkimuksia ja testejä tarvitaan edelleen.

ASIASANAT: HSF, proteiini, hybridisaatio, eEF α -1, transkriptio, oligonukleotidipresipitaatio

Kowstan Eskandari

BINDING OF ELONGATION FACTOR ALPHA ONE TO PROMOTOR REGION

This thesis was conducted in Lea Sistonen's laboratory in BioCity at the Department of Biosciences, Åbo Akademi University.

In this thesis it was studied how cells react to stress and how they survive under stress conditions. The main focus was on the interactions of heat shock factor 1 (HSF1) and eukaryote elongation factor alpha 1 (eEF1 α -1) with DNA. In the thesis the oligonucleotide precipitation method was used, which isolates proteins that bind DNA with a specific nucleotide sequence. The work included cell culture, isolation of nuclei, and analysis of protein-DNA interactions.

In the oligonucleotide precipitation method, HSF1 that is bound to DNA is isolated from the rest of HSF population. This method can be used to examine which other proteins bind to the DNA together with the HSF family and how the DNA-bound HSF1 is modified. By modification small molecules are referred to, such as phosphate groups which can be attached to HSF1 and, in turn, affects the initiation of gene transcription. With this new technique the phosphorylation sites in HSF1 and the messages they mediate can be studied.

In the oligonucleotide precipitation method, human cervical cancer cells were cultured and heat shocked (42 °C) for half an hour. After collecting the cells, whole-cell lysates or nuclear lysates were made.

The isolated proteins were analyzed by SDS-PAGE and acrylamide gel Western blotting with antibodies against HSF1, HSF2 and eEF α -1. In the present study the focus was on HSF1 and eEF α -1. Based on the results further investigations and tests are needed.

KEYWORDS: HSFs, protein, Western blotting, eEF α -1, transcription, oligoprecipitation

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET	6
1 JOHDANTO	6
2 LÄMPÖSHOKKI (HEAT SHOCK)	7
2.1 Lämpöshokkivaste (HSR)	7
2.2 Lämpöshokkiproteiini (HSP)	7
2.3 Lämpöshokkivasteen säätely	8
2.4 Lämpöshokkitekijät (HSFs)	9
2.5 Transkriptio eukaryoottisoluissa	12
2.6 Eukaryoottinen elongaatiotekijä alfa 1	14
2.7 Miksi elongaatiotekijä alfa 1:tä tutkittiin	16
3 MATERIAALIT JA MENETELMÄT	17
3.1 Soluviljely	17
Lämpöshokkikäsittely ja solujen harvestointi	17
3.2 Tuman rikastus ja proteiinipitoisuuden määrittäminen	17
3.3 Oligonukleotidinmäärittäminen (ON-PUDA)	18
5`-BIOTIN-TCG ACT AGA AGC TTC TAG AAG CTT CTA G-3`	18
4 SDS-PAGE JA WESTERN BLOT	21
4.1 Proteiinien erottaminen molekyylikoon perusteella (SDS-PAGE)	21
4.2 Hybridisaatio-menetelmä (Western blot)	21
5 TULOKSET	23
5.1 Solulysaatin ja fraktionin arvonnit	24
5.2 eEF α -1:n eristys ja tarkastelu tumassa	28
6 JOHTOPÄÄTÖKSET	31
7 YHTEENVETO	34
LÄHTEET	35

LIITTEET

- Liite 1. Massaspektrometrian tulokset
- Liite 2. Työssä käytetyt reagenssit ja muut materiaalit
- Liite 3. 8 %- Akryyliamidigeelin valmistus

KUVAT

Kuva 1. Lämpöshokkielementtien järjestys a) banaanikärpäsellä ja b) ihmisellä (Åkerfelt ym. 2010).	9
Kuva 2. Lämpöshokkitekijöiden rakenne ja toiminnalliset alueet (Åkerfelt ym. 2010).	11
Kuva 3. Lämpöshokkivaste a) HSF1:n rakenne, b) HSF1:n toiminta stressin aikana (Åkerfelt ym. 2010).	12
Kuva 4. Eukaryoottisen eliön transkriptiosysteemi (Maston ym. 2006).	14
Kuva 5. Oligopresipitaation päävaiheet (muokattu: Seijas 2011).	20
Kuva 6. HeLa-solut.	23
Kuva 7. Solut (a) Optimaali- ja lämpöshokkiolosuhteissa (b) tumaneristyksessä.	24
Kuva 8. Tuman (a) ja sytoplasman (b) eristäminen sekä kokosolu- että tumalysaatissa.	25
Kuva 9. HSF1:n eristys kokosolu- ja tuma-uutteessa hybridisaatiossa.	26
Kuva 10. HSF2:n tulos a) kokosolu- tumauutteessa b) hybridisaatiossa.	27
Kuva 11. KDEL:n eristys hybridisaatiolla tumauutteessa.	29
Kuva 12. Proteiinin 14-3-3 eristys kokosolulysaatissa hybridisaatiolla.	30

TAULUKOT

Taulukko 1. Käytetyt oligonukeotit ON-PUDA –menetelmässä (Seijas 2011).	18
---	----

KÄYTETYT LYHENTEET

BSA	Naudan seerumialbumiini
ChIP	Kromatiinin immunosaostus
CCS-3	Cervical cancer suppressor 3
DBD	eng. DNA binding domain
DMEM	eng. Dulbecco's Modified Eagle Medium
DTT	Ditioteitol
EDTA	Etyylenidiamiinitetraetikkahappo
eEF α -1	Eukaryootinen translaation elongaatiotekijä alfa 1
FCS	Vasikan sikiön seerumi
GTFS	Yleistranskriptiotekijät
HEPES	N-2-hydroksietyylipiperatsiini-N-2-etaanisulfonihappo
HS	Lämpöshokki
HSE	Lämpöshokkielementti
HSFs	Lämpöshokkitekijät
HSR	Lämpöshokkivaste
HSR 1	Lämpöshokki RNA 1
HSPs	Lämpöshokkiproteiinit
NHS	Ei-lämpöshokki optimaaliset olosuhteet
ON-PUDA	Oligonukleotidipresipitaatio
PBS	Fosfaattipuskuri
PIC	eng. Preinitiation complex
PMSF	Fenyylimetyylisulfonyylifluoridi
PTMs	Post-translaationaaliset modifikaatiot
SDS-PAGE	Natriumdodekyylisulfaatti-polyakryyliamidigeelielektroforeesi
SUL	Streptavidini ULTRALINK
TSS	Transkription aloituskohta

1 JOHDANTO

Tässä opinnäytetyössä tutkittiin elongaatiotekijä alfa 1:n kykyä sitoutua DNA:han oligopresipitaatio-menetelmällä. Tämä menetelmä mahdollistaa määritetyille emäsuosteelle sitoutuneen proteiinikompleksin eristämisen ja sen koostumuksen määrittämisen.

Lämpötila on yksi ympäristötekijä, johon solujen on sopeuduttava, koska solut ovat vuorovaikutuksessa ympäristönsä kanssa. Lämpöshokki (HS) on altistumista korkealle lämpötilalle, jonka vaikutuksesta proteiinit ovat alttiita laskostumaan virheellisesti. Elävät eliöt ovat kehittäneet suojausjärjestelmän nimeltä lämpöshokkivaste (HSR). Tämä suojaussysteemi voi estää lämpöshokkin aiheuttamia solutason vaurioita. (Morimoto ym. 1998.)

Lämpöshokkivaste on säilynyt evoluutin aikana bakteereista nisäkkäisiin ja on tärkeä solun selviytymiselle. Lämpöshokkivasteelle on tyypillistä kaperonimolekyylien lisääntynyt synteesi. Kaperonit suojaavat proteiineja, helpottavat uudelleenlaskostusta sekä samalla auttavat vahingoittuneita proteiineja hajoamaan. Näitä kaperoneja sanotaan lämpöshokkiproteiiniksi (Hsps), ja niiden ilmentystä ohjaavat lämpöshokkitekijät (HSF). (Morimoto ym. 1998; Åkerfelt ym. 2010.)

HSF:t aktivoituvat korkean lämpötilan, raskasmetallien ja bakteeri-infektioiden vaikutuksesta. HSF:t ovat mukana myös muissa solun toiminnoissa, jotka eivät liity stressiin. HSF:iä ohjataan monilla post-translaationaalisilla muutoksilla (PTMs), muun muassa fosforylaatiolla, asetylaatiolla ja sumoylaatiolla. (Åkerfelt ym. 2007.)

Transkription toisin sanoen geeniluennan säätely edellyttää vuorovaikutusta transkriptiotekijöiden ja kromatiinin välillä. Transkriptiotekijöiden on kyettävä vuorovaikuttamaan muiden geeniluentaa ohjaavien proteiinien kanssa vallitsevassa kromatiiniympäristössä (Maston ym. 2006).

2 LÄMPÖSHOKKI (HEAT SHOCK)

2.1 Lämpöshokkivaste (HSR)

Useimmissa elävissä eliössä korkeille lämpötiloille altistuminen laukaisee lämpöshokkivasteen, jossa ilmennetään lämpöshokkiproteiineja (Hsps). Tämä reaktio on säilynyt evoluution kautta, koska se on havaittu kaikissa taksonomisissa ryhmissä, muun muassa eubakteeriasta ja archeobakteeriasta kasveihin ja nisäkkäisiin. (Lindquist ym.1986.)

1900-luvun puolen välin jälkeen havaittiin erityisiä laajentuneita alueita banaani-kärpästoukkien sylkirauhassolujen kromosomien rakenteessa lämpökäsittelyn jälkeen. Havaittiin, että nämä rakenteet esiintyivät toistuvasti samassa kromosomin paikassa sen jälkeen, kun ne altistuivat korkeaan lämpötilaan. Lämpöshokkivaste on huomattavan nopea kaikissa eliöissä. Lajin mukaan HSR laukeaa eri lämpötiloissa, esimerkiksi banaanikärpäsillä välillä 33–37 °C ja joillain erityisen kylmissä olosuhteissa elävillä kaloilla välillä 5–10 °C. (Lindquist & Craig ym. 1988.)

Tutkimukset ovat osoittaneet, että myös raskasmetallit, sekä tulehdusreaktion ja bakteeri-infektiot käynnistävät lämpöshokkivasteen. Nämä häiritsevät solujen tasapainoa siten, että niiden elintoiminnat muuttuvat. Solut ilmentävät lämpöshokkiproteiineja estääkseen proteiinitoiminnan muuttumista, sillä välin kun muiden geenien transkriptio on vaimennettu. Nämä ovat lämpöshokkivasteen tärkeitä ominaisuuksia, jotka auttavat solua vaurioiden ehkäisemisessä. (Jolly & Morimoto ym. 2000.)

2.2 Lämpöshokkiproteiini (HSP)

Lämpöshokkiproteiinit ovat ryhmä molekyylikapereoneja, jotka auttavat proteiinien laskostamisessa (Jolly & Morimoto ym. 2000). Lämpöshokkiproteiineja kutsutaan myös stressiproteiineiksi johtuen niiden toiminnoista solujen suojaamisessa stressiolosuhteissa (Hartl & Hayer-Hartl ym. 2002). Optimaalisissa oloissa lämpöshokkiproteiinit muodostavat noin 2 % solun tai solujen kokonaisproteiinimäärästä. Tämä viittaa siihen, että niillä on

myös muita fysiologisia toimintoja, jotka eivät liity solustressiin (Lindquist & Craig ym. 1988).

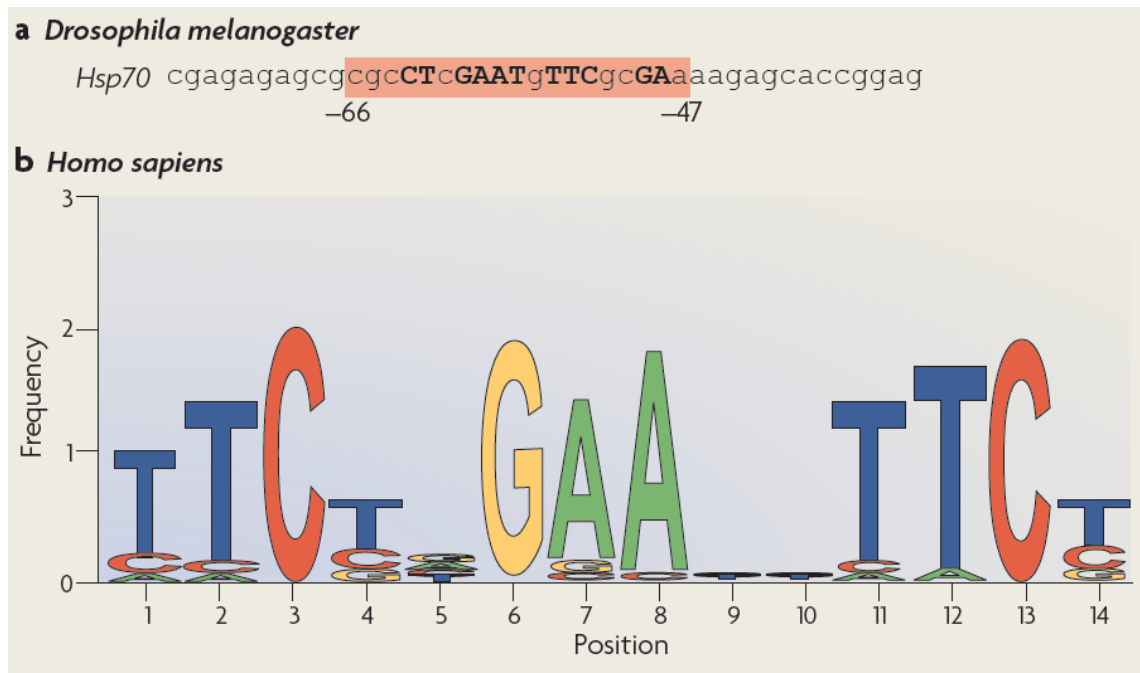
Lämpöshokkiproteiineilla on monta tehtävää, ja ne ovat tiukan säätelytoiminnan alla. Eukaryoottisissa eliöissä on useita säätelykohtia ennen geenin koodaamista proteiiniksi. Nämä vaiheet ovat transkription aloittaminen, transkription eteneminen (elongaatio), lähetti-RNA:n (l-RNA) säätely, l-RNA:n kuljetus ribosomeihin, proteiinien laskostaminen sekä oikeaan paikkaan vieminen solussa. Lämpöshokkiproteiineille yksi tärkeimmistä säätelykohdista on geeniluennan aloittaminen. (Lindquist & Craig ym.1988.)

Lämpöshokkiproteiinit luokitellaan niiden molekyylipainon mukaan kuuteen pääperheeseen: Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 ja pienet HSP:t. HSP:t tunnistavat hydrofobisia aminohappoja ja niitä proteiinien alueita, joita ei ole kunnolla jäsennelly. Nämä ovat yleisiä ominaisuuksia laskostumattomille proteiineille. (Jolly & Morimoto ym. 2000.)

2.3 Lämpöshokkivasteen säätely

Lämpöshokkiproteiinigeenien luentaa aktivoivat HSF-transkriptiotekijät, jotka sitoutuvat promoottorialueilla sijaitseville DNA-alueille, jotka tunnetaan nimellä lämpöshokkielementti (HSE). HSE-sekvenssissä toistuu nGAAn –emäsjärjestys, jossa "n" edustaa mitä tahansa nukleotidia. Koska tämä sekvenssi on todettu kolmen ryhmässä, on mahdollista ilmaista lämpöshokkielementti tällaisena sekvenssina: nTTCnnGAAnnTTCn (kuva 1). (Amin ym. 1988; Perisic ym. 1989.)

Kuvassa 1 on lämpöshokkielementtien emäsjärjestys; a-kohdassa nähdään banaanikärpästen lämpöshokkielementtijärjestys ja vastaavasti b-kohdassa näytetään ihmisen. Vaaka-akselilla näkyy sekvenssien sijainti ja pystyakselilla nukleotidin yleisyys.



Kuva 1. Lämpöshokkielementtien järjestys a) banaanikärpäsellä ja b) ihmisellä (Åkerfelt ym. 2010).

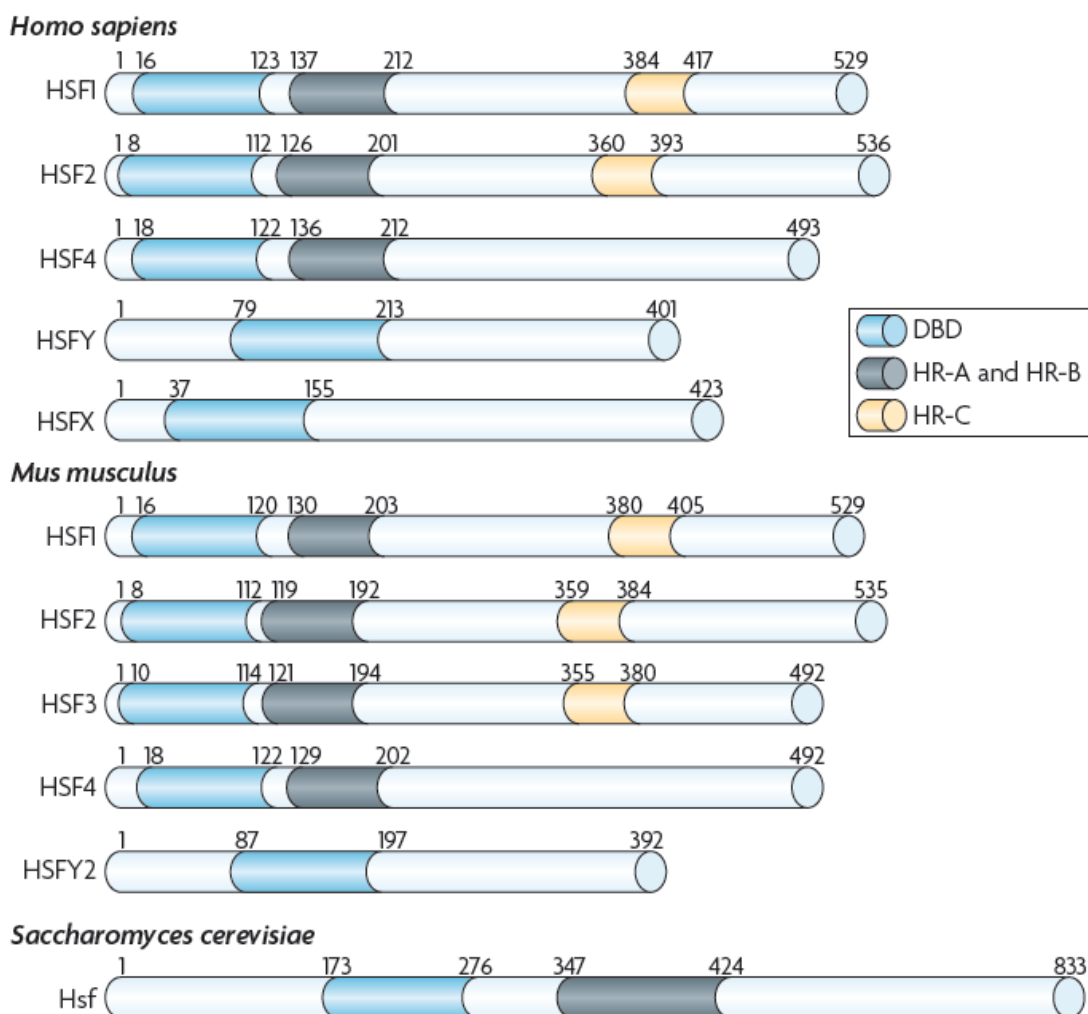
2.4 Lämpöshokkitekiäjät (HSFs)

Lämpöshokkitekiäjät on löydetty hiivoissa, kasveissa ja nisäkkäissä, mutta niiden määrä vaihtelee eri eliöissä. Selkärangaisilla on neljä lämpöshokkitekiäjää, hiivoilla on taas vain yksi. Joissain kasveissa on havaittu enemmän kuin kaksikymmentä lämpöshokkitekiäjää. (Åkerfelt ym. 2007; Koskullin-Döring ym. 2007.) Selkärangaisissa on löydetty neljä lämpöshokkitekiäjää: HSF1, HSF2, HSF3 ja HSF4. HSF1:n ja HSF3:n toiminnot liittyvät lämpöshokkiproteiinien ilmiintymiseen stressitilanteiden yhteydessä, kun taas HSF2:n ja HSF4:n ajatellaan pääasiassa toimivan kehitysbiologian säätelytehtävissä (Åkerfelt ym. 2007; Pirkkala ym. 2001).

HSF-proteiineilla on useita toiminnallisia alueita, jotka ovat tärkeitä niiden säätelylle ja transkription toiminnalle (kuva 2). Yksi tärkeimmistä alueista on DNA:han sitoutuva alue, joka on evoluutiossa säilynein toimialue lämpöshokkitekiäjöiden rakenteessa.

Toinen toimialue, joka löytyy lämpöshokkitekijöissä, on trimerisointialue, jossa toistuu säännönmukaisesti, joka seitsemänneen aminohapon kohdalle hydrofobinen aminohappolähde esim. Leusiini tai iso leusiini. Tämä hydrofobinen sekvenssi HR-A/B on välttämätön HSF:lle, koska se mahdollistaa HSF:n trimerisoinnin ja täydellisen DNA:n sitoutumistoiminnan. Lähellä C-päätä esiintyy toinen hydrofobinen sekvenssi, HR-C, joka estää oligomerointiprosessia normaalitilassa, jolloin HSF esiintyy monomeerimuodossa. Lämpöshokkitekijät sisältävät myös säätelyalueita HR-A/B:n ja HR-C:n välillä. (Pirkkala ym. 2001; Morimoto ym. 1998.)

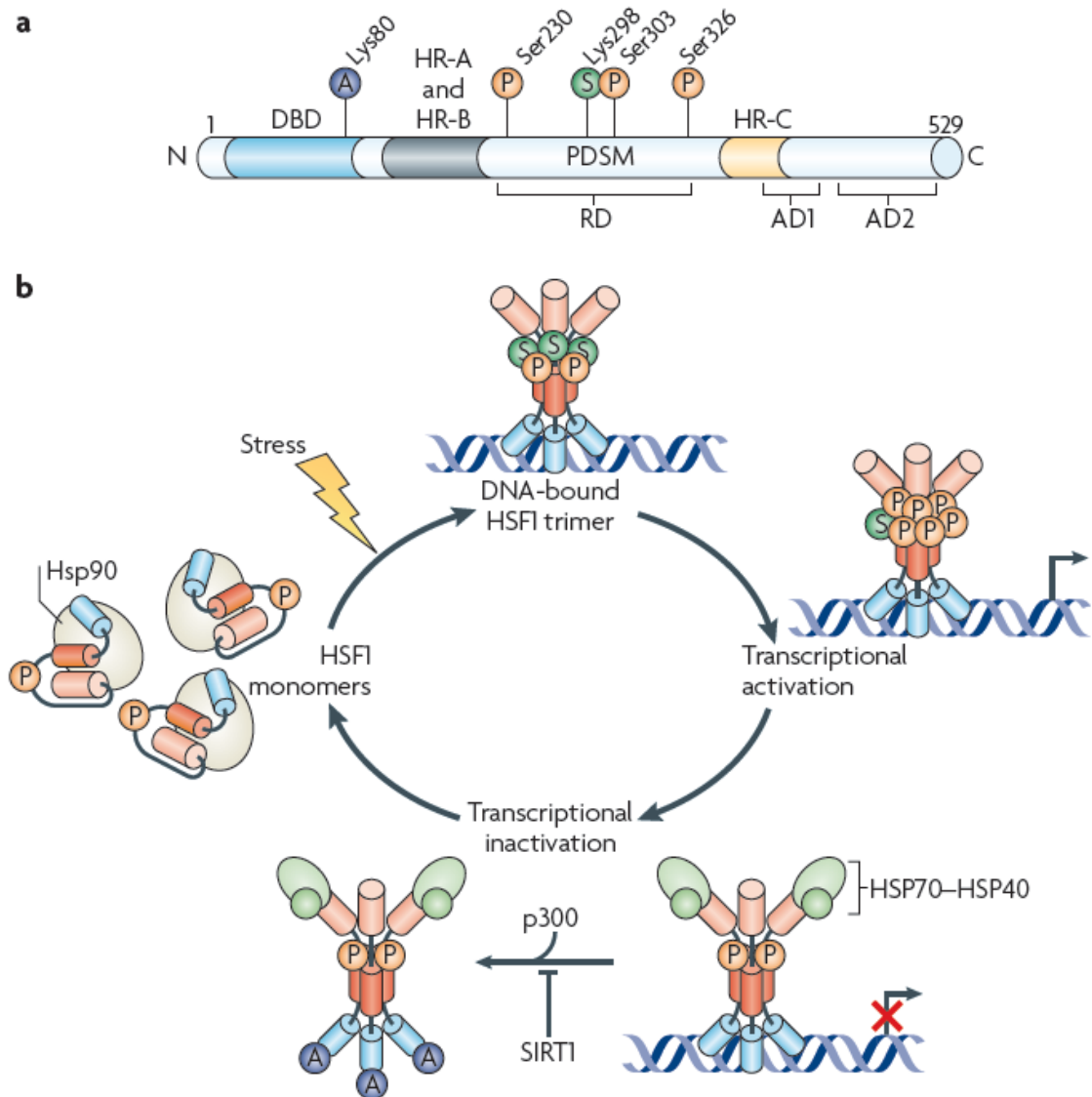
Kuvassa 2 nähdään lämpöshokkitekijöiden rakenne ja toiminnalliset alueet kolmessa eri eliössä. Alla olevassa kuvassa on havaittavissa järjestyksessä ihmisen, hiiren ja hiivan *Saccharomyces cerevisiae* toiminnalliset alueet. DBD-alue on näkyvissä vaaleansinisellä, HR-A/B-alue harmaalla ja HR-C-alue vaaleankeltaisella värillä.



Kuva 2. Lämpöshokkitekiäjien rakenne ja toiminnalliset alueet (Åkerfelt ym. 2010).

Lämpöshokkitekijä yksi (HSF1) (kuva 3) on läsnä selkärankaisten kaikissa kudoksissa ja soluissa. HSF1 käy läpi useita PTM-muutoksia stressin aikana. Nämä muutokset ovat perusta lämpöshokkiproteiinien geenitranskription käynnistymiselle ja pysäyttämiseksi HSR:n aikana. PTM-muutokset ja HSF1-proteiinien vuorovaikutus on esitetty aktivointi-vaimennussyklissä (kuva 3b). (Åkerfelt ym. 2010.)

Kuvan 3 a-kohdassa nähdään HSF1:n rakenne, jossa keskeiset alueet ovat, DBD, HR-A/B, HR-C, ja säätelyalue (RD). Erityisesti RD käy läpi useita PTM-muutoksia, mukaan lukien fosforylaatio (P), asetylaatio (A) ja sumoylaatio (S). HSF1:n toiminta stressivasteen aikana on kuvattuna b-kohdassa.



Kuva 3. Lämpöshokkivaste a) HSF1:n rakenne, b) HSF1:n toiminta stressin aikana (Åkerfelt ym. 2010).

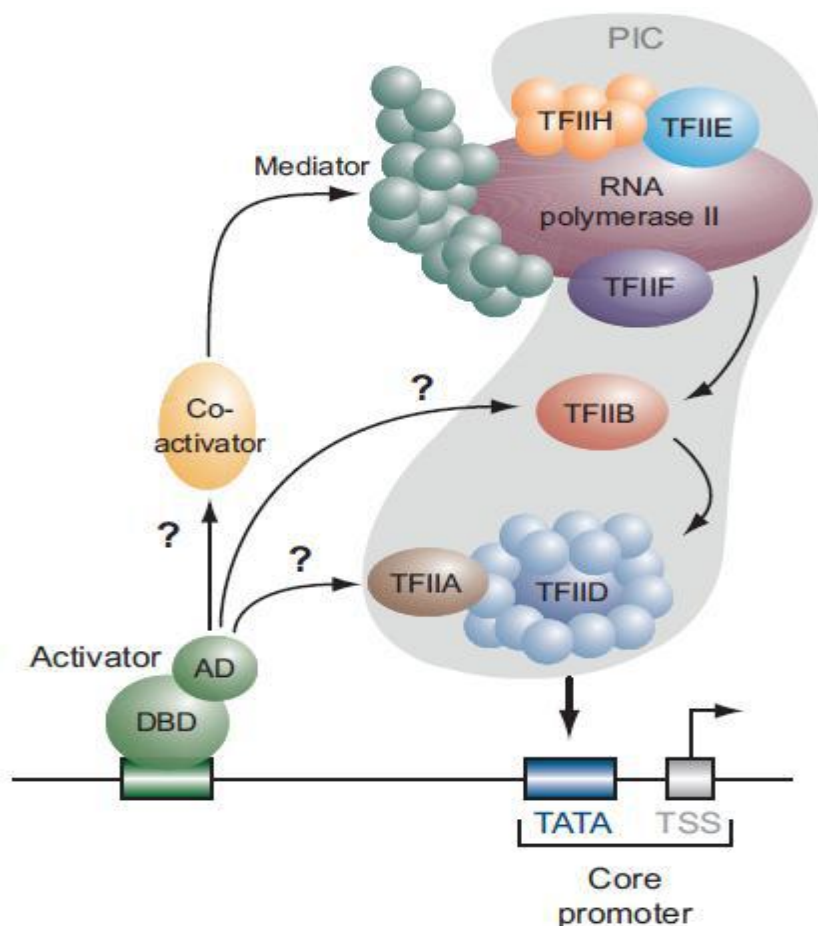
2.5 Transkriptio eukaryoottisoluissa

Eukaryooteissa transkriptio alkaa kromatiinin avautumisella. Kun kromatiini avautuu, transkriptiotekijät liittyvät DNA:han. Transkriptiotekijät tunnistavat geenissä promoottoreita ja tehostajia. Nämä transkriptiotekijöiden aktiivisuuden säätely on merkittävä proteiinisynteesin säätelykohta. Jotta transkriptiotekijät kiinnittyvät DNA:han, ne poistavat DNA:ssa kiinni olevat histonit tai muuttavat nukleosomien järjestäytymistä. (Solunetti viitattu 23.7.2010).

Transkriptiota ohjataan yleistranskriptiotekijöillä (GTFs) ja välittäjäkompleksilla (Mediator). Nämä kompleksit toimivat yhdysiteinä transkriptiotekijöiden (esim. HSF) ja transkriptiosysteemin välillä ja ovat välttämättömiä transkription aloittamiselle (Casamassimi & Napoli ym. 2007).

Transkriptiosysteemi (kuva 4) koostuu proteiiniiryhmästä, mukaan lukien RNA-polymeraasi II ja GTF-komponentit: TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF ja TFIIH. Näiden transkriptiofaktoreiden on kerääntävä koodausgeenien promoottori-alueelle (Maston ym. 2006). Muut transkriptiotekijät, jotka ovat ainutlaatuisia tietyille geeneille, ovat mukana PIC:n muodostumisessa. Useimmat niistä säätelevät PIC:n muodostumista välittäjäkompleksien avulla. Osa saa myös aikaan muita prosesseja kuten elongaatiota (Lee & Young ym. 2000).

Kuvassa 4 nähdään transkriptiosysteemin proteiineja ja PIC:n muodostumista. Kuvassa GTF-komponentit kerääntyvät promoottorialueelle ja aiheuttavat PIC:n muodostumista. PIC ohjaa RNA-polymeraasi II:n transkription aloituspaikalle.



Kuva 4. Eukaryoottisen eliön transkriptiosysteemi (Maston ym. 2006).

On mainittava, että useimmissa transkriptiotutkimuksissa keskitytetään yhteen tekijään kerrallaan. Tutkimukset ovat kuitenkin paljastaneet useiden tekijöiden yhteisvaikutuksen tärkeyttä transkriptioprosessissa ja ovat suuntautumassa tunnistamaan kaikki välittäjäkompleksien toiminnot. Näissä tutkimuksissa käytetään hyväksi muun muassa massaspektrometriaa, jolla voidaan eristää ja määrittää eri proteiineja muodostavia välittäjäkomplekseja (Casamassimi & Napoli ym. 2007).

2.6 Eukaryoottinen elongaatiotekijä alfa 1

Eukaryooteissa aminohappoketjun pidentyminen tapahtuu elongaatiotekijöiden avulla. Elongaatiotekijä 1 muodostuu nukleotidia sitovasta proteiinista eEF1- α ja nukleotidia vaihtavasta kompleksista eEF1-beeta-gammasta, sillä välin kun eEF2 katalysoi siirtäjä-RNA:n translokaatiota. Elongaatiotekijät eEF1- α ja eEF1-beeta-gammasta osallistuvat polypeptidien muodostamiseen proteiinisyn-

teesissä solussa. Nämä kaksi tekijää on puhdistettu erilaisista eukaryootti lähteistä ja niitä pidetään toiminnallisina analogeina eräille bakteereille kuten eEF-Tu ja eEF-Ts. (Weissbach H. & Ochoa S. ym. 1976). Bakterissa EF-Tu -elongaatiotekijä alfa yksi auttaa aminoasyyli-siirtäjä-RNA:n sitoutumista ribosomille hydrolysoimalla guanosiinitrifosfaattia. (Janssen & Möller ym. 1987).

Elongaatiotekijöillä voi olla proteiinisynteesin lisäksi muitakin tehtäviä kuten säätelyalueiden kehittäminen, muuntaminen ja ikääntyminen. Hiivoissa esiintyy elongaatiotekijä 3, mutta sen toiminta sekä rakenne ovat yhä epäselviä. (Riis & Rattan ym. 1990). Translaatiotekijä alfa 1 on mukana polyglutamiinin hermostosairauksissa. Lisäksi eEF α -1 voi parantaa solun elinkykyä jossain soluissa. (Mitsui & Nakayama ym. 2002).

Elongaatiotekijä alfa 1:n geeni koodaa eEF α -1 ja eEF β -1 -proteiineja. eEF α -1 esiintyy nisäkkäissä lähes kaikissa kudoksissa. eEF1 α -2 esiintyy taas aivoissa, sydämessä ja luustolihaksissa. Sekä eEF1- α että eEF2- α molemmat toimivat translaatioissa. Elongaatiotekijä alfa 1 on yksi runsaimmin ilmentymistä proteiineista nisäkkäissä. (Lund & Knudsen ym. 1997.)

eEF1- α on vuorovaikutuksessa polypeptidien kanssa myös sen jälkeen kun polypeptidit vapautuvat ribosomista. Translaatiotekijä alfa 1 ei sitoudu laskostuneisiin proteiineihin vaan se on vuorovaikutuksessa proteiinien kanssa, jotka eivät kykene laskostumaan sytoplasmassa. (Hotokezaka & Tobben ym. 2002.) Lähetti-RNA ja eEF α -1 ovat vuorovaikutuksessa toistensa kanssa. Lisäksi eEF α -1:llä on tärkeä rooli siirtäjä-RNA:n siirtämisessä. On mahdollista, että eEF α -1 on mukana lähetti-RNA:n kuljetuksessa. (Shamovsky ym. 2006; Shamovsky & Nudler 2008.)

Shamovsky ym. (2006) kuvailee, että eEF α -1 muodostaa kompleksin HSF1:n kanssa helpottaen HSF1:n trimerisointia ja sitoutumista lämpöshokkielementille HSP-geenien promoottoreilla. Lisäksi he kertovat HSF1:n ja eEF α -1:n vuorovaikutuksen lisääntymisestä lämpöshokin aikana.

Shamovsky:n ym. (2006) tutkimukset eEF α -1:n ja HSF1:n vuorovaikutukset perustuvat immunopresipitaatio- ja massaspektrometriatutkimuksiin.

2.7 Miksi elongaatiotekijä alfa 1:tä tutkittiin

Hanser Seijas kartoitti tutkimuksissaan (2011) HSE:hen sitoutuvia proteiineja massaspektrometrian avulla (liite 3). Yllättävin tulos oli, että eEF α -1 nähtiin ensimmäisenä listalla massaspektrometrian avulla löydetyistä HSE:hen sitoutuneista proteiineista. Tämä herätti kysymyksen, että voiko elongaatiotekijä, joka on tärkeä tekijä proteiinien translaatiossa, sitoutua promoottorialueelle. Seijaksen tuloksissa (liite 3) nähdään myös ribosomaalisia komponentteja kuten 40S, S7 ja SA, sekä tumahuokosen proteiinit Nup98 ja Nup96.

Seijaksen (2011) tulosten pohjalta lähdin kartoittamaan, sitoutuuko eEF α -1 HSE:hen, ja tapahtuuko tämä sitoutuminen tumassa. Ovatko HSF1 ja eEF α -1 samassa kompleksissa ja onko olemassa suora yhteys transkriptiosta translaatioon solustressin aikana? Haluttiin tietää eEF α -1:n ja HSF1:n välinen vuorovaikutus DNA:n kanssa.

Lämpöshokki aiheuttaa HSF1:n nopean sitoutumisen DNA:han ja tässä tutkimuksessa kartoitin, sitoutuuko myös eEF α -1 DNA:han lämpöshokin vaikutuksesta. Opinnäytetyössä valikoitiin oligonukleotidipresipitaatio tutkimusmenetelmäksi, sillä yhdistettynä Western blot -menetelmään, DNA:han sitoutuneen proteiinit voidaan tunnistaa vasta-aineiden avulla.

3 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

3.1 Soluviljely

Ihmisen HeLa-kohdunkaulansyöpäsoluja viljeltiin DMEM-soluviljelyliuoksessa (valmistaja Sigma-Aldrich). Viljelyliuokseen lisättiin liitteessa 1 olevat reagenssit bakteeri-infektioiden välttämiseksi. Solut pidettiin 37 °C: n lämpötilassa.

Lämpöshokkikäsittely ja solujen harvestointi

Lämpöshokkikäsittelyssä parafilmillä suojatut Hela-soluja sisältävät maljat upotettiin vesihauteeseen (42 °C) puoleksi tunniksi, minkä jälkeen maljat otettiin pois vesihauteesta ja siirrettiin jäihin. Maljojen sisällä oleva liuos poistettiin ja solut pestiin kaksi kertaa kylmällä (4 °C) fosfaattipuskurilla (PBS). Sitten solut kaavittiin maljan pohjasta käyttämällä 2 ml kylmää PBS:ää. Saatua liuosta sentrifugoitiin (1000 x g, 4 °C, 4 min). Ylempi faasi poistettiin ja solupelletti säilytettiin -70 °C:ssa.

3.2 Tuman rikastus ja proteiinipitoisuuden määrittäminen

Kokonaissolujen pelletit liuotettiin puskuriin C (liite 1) ja näytteitä pidettiin jäissä (20 min), minkä jälkeen ne sentrifugoitiin (3500 x g, 30 min). Ylempi, liukenevien proteiinien faasi säilytettiin ja pakastettiin -20 °C:ssa.

Tuman rikastuksessa jäädytetyt solupelletit liuotettiin puskuriin A (liite 1), pidettiin jäällä (10 min) ja homogenoitiin. Homogenointi suoritettiin jäällä ja sen jälkeen sentrifugoitiin (450 x g, 4 °C, 10 min). Saadut tumapelletit hajoitettiin puskurilla C (liite 1), pidettiin jäällä 10 minuuttia ja sentrifugoitiin (15000 x g, 4 °C, 30 min).

Näytteet tutkittiin mikroskoopilla. Tällä tavalla varmistettiin, että tumen eristäminen oli onnistunut ja että tumat olivat säilyneet vahingoittumattomina. Kokonaissolu- ja tumalysaatin proteiinipitoisuudet mitattiin käyttäen Bradford-menetelmää (Bradford 1976). Tumanrikastus vahvistettiin tutkimalla tuma-

spesifisen laminiinin sekä sytosoli-spesifisen tubuliinin proteiinitasot Western blot -menetelmällä (liite 1).

3.3 Oligonukleotidinmääritys (ON-PUDA)

Oligonukleotidimäärityksessä käytettiin kolmea oligonukleotidivektoria. Kaksi oligoa sisälsivät ihmisen HSE-sekvenssejä, ja yksi oligo toimi negatiivisena kontrollina (scrambled). Oligo A on kuvailtu julkaisussa Vuori ym. (2010), oligo B ja scrambled julkaisussa Anckar ym. (2006) (liite 2). Yksijuosteiset oligonukleotidit liitettiin komplemettäärisiin lämpökäsittelmällä ne 100 °C:ssa, minkä jälkeen annettiin liuoksen jäähtyä tunnin verran huoneen lämpötilassa. Oligonukleotidipresipitaatio-menetelmä on esitelty kuvassa 5.

Taulukko 1. Käytetyt oligonukleotidit ON-PUDA -menetelmässä (Seijas 2011).

Oligonukleotidi	Sekvenssi
HSE sense A	5`-Biotin-TCG ACT AGA AGC TTC TAG AAG CTT CTA G-3`
HSE antisense A	5`-CTA GAA GCT TCT AGA AGC TTC TAG TCG A-3`
HSE sense B	5`-Biotin-AAC GAG AAT CTT CGA GAA TGG CT-3`
HSE antisense B	5`-AGC CAT TCT CGA AGA TTC TCG TT-3`
Scrambled sense	5`-Biotin-AAC GAC GGT CGC TCC GCC TGG CT-3`
Scrambled antisense	5`-AGC CAG GCG GAG CGA CCG TCG TT-3`

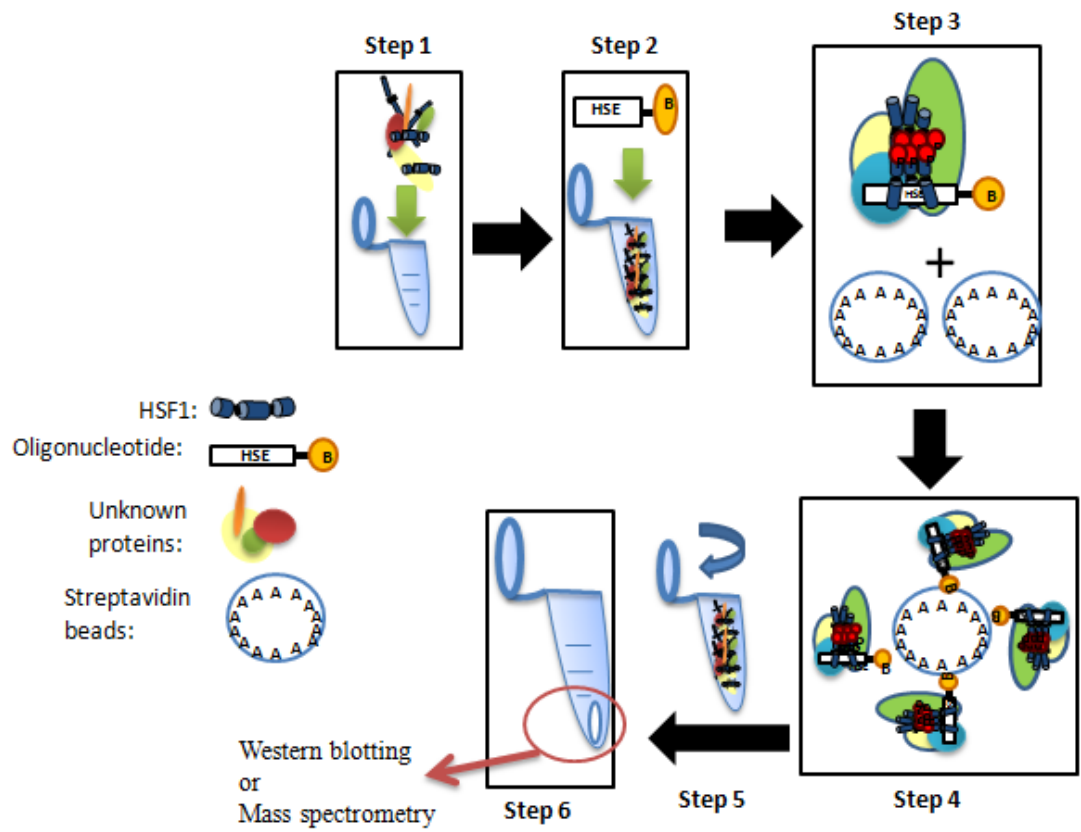
Saostaakseen proteiinikomplekseja oligonukleotidit oli yhdistetty biotiiniin, ja proteiini-DNA-biotiini -kompleksi eristettiin Streptavidin-ULTRALINK -geelillä (Pierce) . Streptavidiini-molekyylit sitoutuvat vahvasti biotiinille, ja koska niillä on

suuri molekyylipaino, ne saostuvat hyvin. Streptavidiini-helmet pestiin ennen käyttöä TEG-puskurilla (liite 1) ja sentrifugointiin (2000 x g, 4 °C, 4 min). Pelletti liuotettiin TE-puskuriin (500 µl) (liite 1).

Oligopresipitaatio-menetelmällä (kuva 5) näytteet oli standardoitu konsentraatioon 3,5 µg/µl käyttäen TEG-puskuria (liite 1). Näytteet esipuhdistettiin lisäämällä pestyjä helmiä (6 µl pestyjä helmiä/100 µg proteiinia), jonka jälkeen näytteet sentrifugoitettiin (1000 x g, 4 °C, 4 min) ja helmet poistettiin. Esipuhdistuksen jälkeen lisättiin 1,2 µg/µl lohen spermaa kantaja DNA, 1,2 µg/µl BSA:ta ja 0,5 µM oligonukleotideja. Proteiinien annettiin kiinnittyä oligonukleotideihin kahden tunnin ajan (4 °C, rotaatio).

Tämän vaiheen jälkeen lisättiin 120 µl pestyjä Streptavidiini-helmiä ja annettiin olla rotaatiossa jälleen tunti samassa lämpötilassa. Tässä vaiheessa oligonukleotidit sitoutuivat helmiin. Näytteet sentrifugoitettiin kolme minuuttia (1000 x g, 4 °C) ja helmi-DNA-proteiini -pelletit pestiin kolme kertaa TEG-puskurilla. Proteiinien rakenteet hajotettiin lisäämällä Laemmli-puskuria pelletteihin. Oligoilla eristetut proteiinit tutkittiin SDS-PAGE:n ja Wertern blot -menetelmän avulla.

Kuvassa 5 nähdään oligonukleotidipresipitaation päävaiheet. Ensimmäisessä vaiheessa solut hajotetaan ja niiden proteiinipitoisuus mitataan. Vaiheessa kaksi näytteisiin lisätään oligonukleotideja. Kolmannessa vaiheessa lisätään taas Streptavidiini-molekyylejä. Viimeisessä vaiheessa näytteet sentrifugoidaan, pestään TEG-puskurilla ja keitetään Laemmli-puskurissa. Tämän jälkeen näyte on valmis ajattevaksi joko massaspektrometrialla tai hybridisaatio-menetelmällä.



Kuva 5. Oligopresipitaation päävaiheet (muokattu: Seijas 2011).

4 SDS-PAGE JA WESTERN BLOT

4.1 Proteiinien erotus molekyylikoon perusteella (SDS-PAGE)

SDS-PAGE on menetelmä, jolla erotetaan proteiinit toisistaan jatkoanalyysia varten. SDS-PAGE:n toiminta perustuu SDS-molekyyliin, joka on negatiivisesti varautunut peittäen proteiinit negatiivisella latauksella. Keittäminen β -merkaptoetanolissa denaturoi proteiinit nauhamaisiksi. Sähkövirran vaikutuksesta negatiivisesti latautuneet proteiinit vaeltavat sähkövirrassa kokonsa perusteella kohti positiivista napaa.

Solupelletti keitettiin Laemmli-puskurissa. Tämän jälkeen proteiinit erotettiin sähkövirran avulla 8-prosenttisella akryliamidigeelillä. Akryliamidigeeli koostuu ylä- ja ala-geelistä (liite 1). Proteiinit pakattiin ylägeelissä (80 V, 30 min), minkä jälkeen ne erotettiin toisistaan alageelillä (120 V, 2-3 h). Proteiinistandardina käytettiin "Prestained Protein Marker" (liite 1), jonka avulla saatiin tietää tutkittujen proteiinien massa. Toisin sanoen proteiinistandardin avulla tulokset oli mahdollista vertailla tutkittujen proteiinien vaeltamista geelillä massaltaan tunnettuihin standardeihin.

4.2 Hybridisaatio-menetelmä (Western blot)

Tutkittujen proteiinien tasoja analysoitiin Western blot -menetelmällä. Akryliamidigeelistä erotetut proteiinit siirrettiin geeliltä nitroselluloosakalvolle transfer-laitteella (35 V, 400 mA, 45 min). Membraani käsiteltiin 3 %-maito-PBST -liuoksella 30 minuuttia RT:ssa (blocking). Kalvo käsiteltiin 3 %-maito-PBST:lla, jotta vältetään tai vähennetään vasta-aineiden sitoutumista epäspesifisiin kohtiin kalvolla.

Seuraavaksi pestiin membraani PBST-puskurilla (liite 1) kolme kertaa viisi minuuttia. Membrania inkuboitiin yön yli primäärivasta-aineessa.

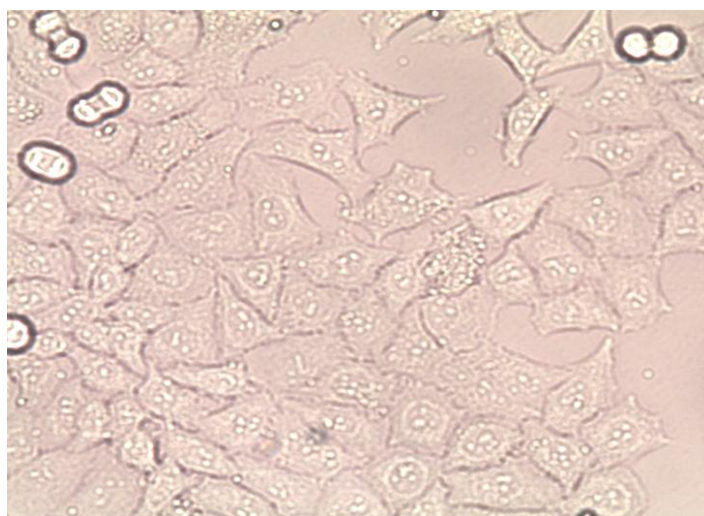
Inkuboinnin jälkeen membraani pestiin kolmesti PBST-puskurilla. Seuraavaksi membraani laitettiin sekundäärivasta-aineeseen kahdeksi tunniksi. PBST-pesun jälkeen lisättiin 500 μ l ECL-liuoksia, joiden avulla HRP-konjugoidut

sekundäärivasta-aineet voidaan kehittää filmille. (liite 1). Käytetyt primäärivasta-aineet ovat liitteessä 1. Sekundäärivasta-aineita olivat hiiren ja kanin vasta-aineita (Promega).

5 TULOKSET

HeLa-solut optimaalisissa olosuhteissa

Kuvassa 6 nähdään ihmisen HeLa-kohdunkaulansyöpäsoluja. Optimaalisissa olosuhteissa (37 °C). Kuvassa nähdään, että jotkut soluista ovat jakautumassa, mutta suurin osa soluista on kiinnittyneinä soluviljelymaljan pohjalla. Solujen muodot ovat selvästi näkyvissä. Kuvassa 6 HeLa-soluja on 20 kertaa suurennettu mikroskoopilla.

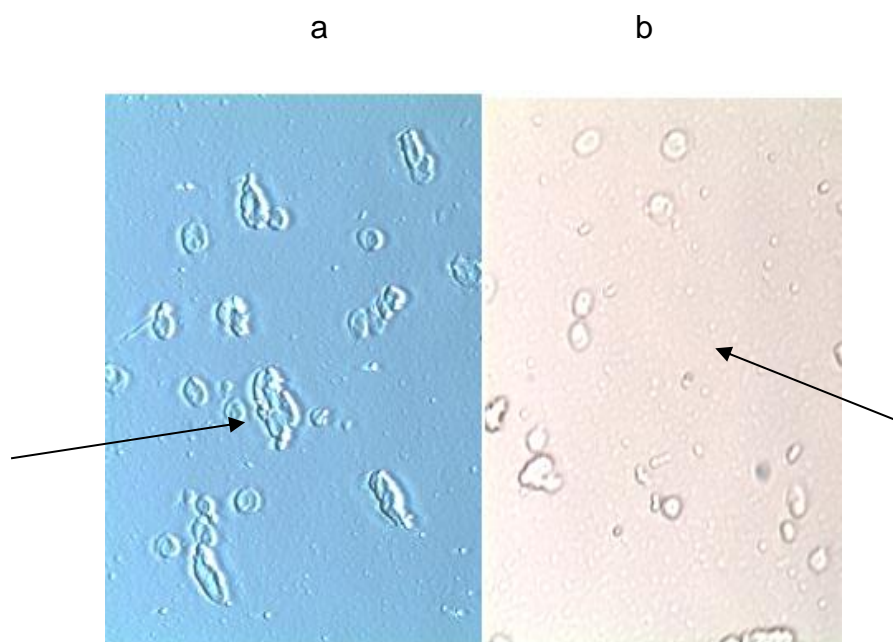


Kuva 6. HeLa-solut.

Kuvassa 7 nähdään HeLa-soluja tumien rikastumisessa. Tumien eristämiseksi solut liuotetaan puskuriin A (liite 1), jotta solukalvo voidaan hajottaa. Hajottamalla solukalvo tumat saadaan talteen. Puskurilla C (liite 1), vastaavasti hajotetaan solujen rakenteet analysointia varten. Kuvan 7 a-kohdassa nähdään ei-lämpökäsiteltyjä solujen tumia puskuri A lisäyksen jälkeen. Lämpökäsiteltyjen HeLa-solujen tumia havaitaan b-kohdassa puskuri A käsittelyn jälkeen.

Molemmassa kuvassa nähdään pieniä hajotettuja kappaleita. Kuvat ovat 20 kertaa suurennettu mikroskoopilla. Vasemman puolisessa kuvassa nuolen avulla on näytetty solukalvon palasia (a), ja oikealla puolella on solun hajontunut rakenne havaittavissa. Solun hajontunut rakenne on myös nuolen avulla näytetty (b). Tumien eristämiseksi näytteiden homogenisointi (Dounce glass-homogenizer) jäillä on tärkeä lopputuloksen kannalta. Jos tässä vaiheessa

solukalvon tai solun rakenne ei hajoteta hyvin, saadaan vähän materiaalia talteen.



Kuva 7. Solut (a) Optimaali- ja lämpöshokkiolosuhteissa (b) tumaneristyksessä.

5.1 Solulysaatin ja fraktionin arvonnit

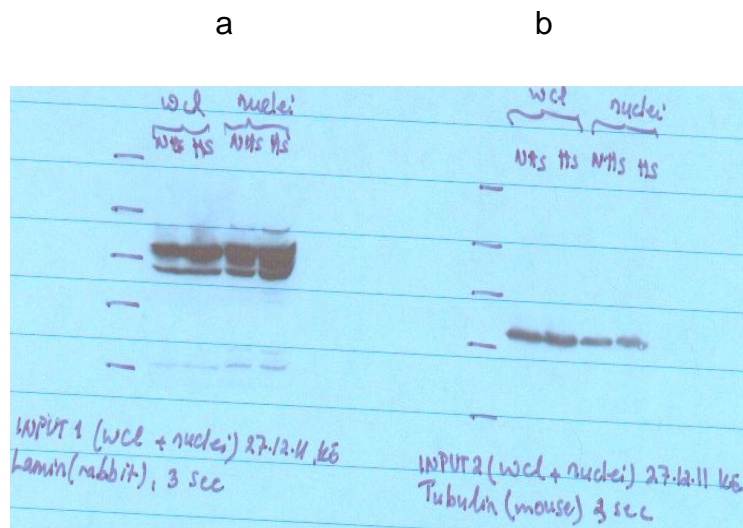
Tuman ja sytoplasman eristämiset tutkittiin oligopresipitaatio -menetelmällä HeLa-soluissa. Hybridisaatiossa primäärivasta-aineet anti-lamiini ja anti-tubuliini olivat käytössä. Sekundäärivasta-aineita lamiinille oli anti-kani ja tubuliinille anti-hiiri.

Saatu proteiinipitoisuus kokosolulysaateissa oli välillä 5-9 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Tuman rikastumisessa proteiinikonsentraatio oli välillä 4-7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Tuma-spesifisen (lamiini) ja sytosoli-spesifisen (tubuliini) proteiinien avulla tarkasteltiin tuman eristämisen onnistumista (kuva 8 a & b). Sytosolista tubuliinia oli runsaasti vain kokosolunäytteissä (8 b), kun taas lamiinia havaittiin tumauutenäytteissä (8 a).

Kuvan 8 a-kohdassa havaitaan lamiinin vahvoja signaaleja sekä kokosolu- että tumauutteessa. Tuman signaalit ova yhtä vahvoja optimaali- ja lämpöshokki-näytteissä. Lamiinin avulla tarkasteltiin tumafraktion onnistumista. Kuvan 8 b -kohdassa havaitaan hybridisaatio ja vasta-aineiden avulla saatu tubuliinin

tulos. Tubuliini esiintyy sekä kokosolu- että tumalysaatissa optimaali- ja lämpökäsittelyssä. Tubuliininsignaali optimaaliolosuhteissa näyttää huomattavasti vahvemmalta kuin lämpöshokissa. Signaalit kokosolu-uutteessa samoin kuin tumauutteessa osoittavat tuman ja sytoplasman eristyksen onnistuneen.

Molemmassa kuvissa proteiinistandardi on pipetoitu ensimmäiseen kuoppaan, joka on merkattu sekä tuman että sytoplasman kuvassa viivoilla. Proteiinistandardin avulla tulokset on mahdollista vertailla tutkittujen proteiinien vaeltamista geelillä massaltaan tunnettuihin standardeihin. Molemmassa kuvissa näkyy viisi proteiinistandardin viivaa. Ensimmäinen viiva on 175 kilo daltonin kohdalla, toinen on 83 kDa, kolmas 62 kDa, neljäs 46 kDa ja viides 30 kDa kohdalla. Käytetyt solut ovat kokosolu- ja tumalysaatteja sekä lämpökäsittelimättömiä että lämpökäsiteltyjä.

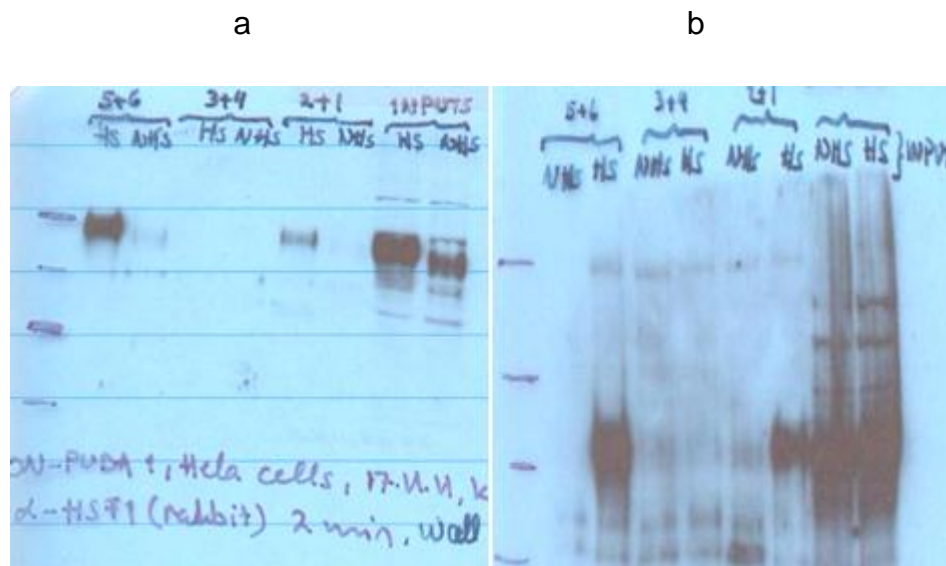


Kuva 8. Tuman (a) ja sytoplasman (b) eristäminen input-kontrollinäytteissä.

Kuvassa 9 nähdään oligopresipitaatio -menetelmällä eristetty HSF1 HeLa-solun (a) kokosolu- ja tumauutteessa (b). HSF1:n eristämiseen on käytetty scrambled-kontrollioligoa (3+4) ja HSE-oligot A (1+2) ja B (5+6). Immunoblot-menetelmä suoritettiin vasta-aineiden avulla. Primäärivasta-aineena anti-HSF1 ja sekundäärivasta-aineena oli anti-kani. Kuvan 9 molemmissa kohdissa tulee katsoa, missä oligoissa ja millaisessa kasvuolosuhteissa HSF1 sitoutuu HSE:hen. Lisäksi täytyy ottaa huomioon myös sitoutumissignaalin vahvuutta,

kun HSF1 sitoutuu HSE:hen. HSF1 havaittiin lämpöshokkinäytteissä positiivisissa oligoissa A ja B. Tumauutteessa oligon A signaali lämpökäsittelyolosuhteissa on vahvempi kuin kokosolulysaatin signaali oligossa A. Negatiivisessa oligossa ei havaittu mitään signaalia.

Kokosolulysaatin optimaalinäytteessä, oligossa B näkyy heikosti signaali, joka ei taas näy oligossa A. Tämä osoittaa, että HSF1 voi sitoutua HSE:hen myös optimaaliolosuhteissa. Tumalyssaateissa (b) havaittiin HSF1:n heikkoja signaaleja ei-lämpöshokkinäytteissä oligossa A ja B. Molemmista tuloksista voidaan päätellä, että signaali lämpöshokkiolosuhteissa oligossa B on vahvempi kuin oligossa A. Jokaisesta näytteestä tehtiin kolme toistoa HeLa-soluissa. Proteiinistandardi on pipetoitu ensimmäiseen kuoppaan, mikä on merkattu viivoilla. Viivojen koot ovat aikaisemmin jo mainittu kuvan 8 -tekstissä.



Kuva 9. HSF1:n eristys kokosolu- ja tumauutteessa hybridisaatiossa.

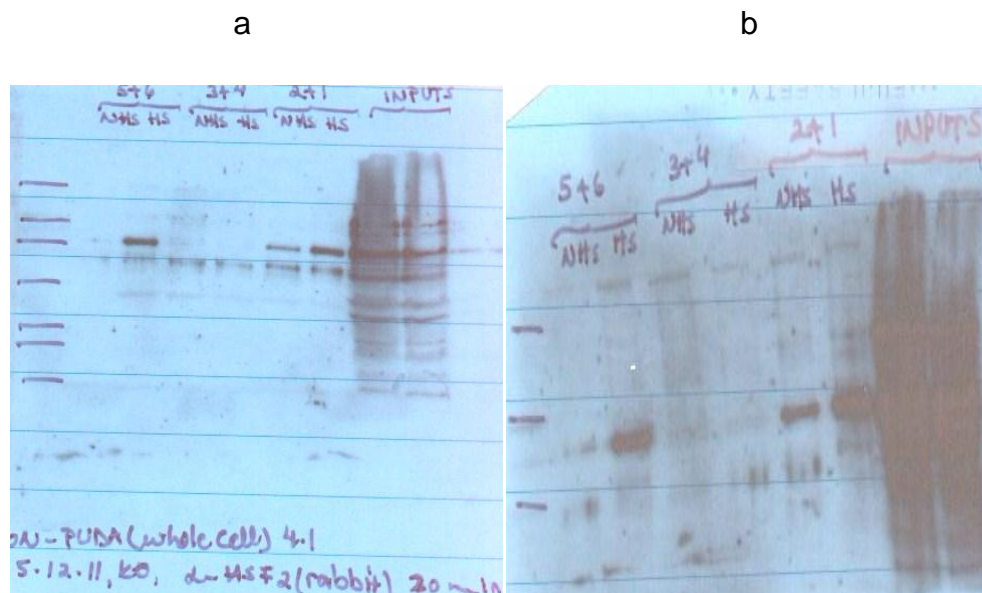
HSF2 havaittiin immunoblotilla HSE-oligoissa (kuva 10). HSF2:n havaitseminen onnistui vasta-aineiden avulla immunoblotissa, jossa käytettiin vasta-aineina anti-HSF2 ja anti-kani. HSF2:n sitoutuminen HSE:hen tutkittiin HeLan sekä (a) kokosolu- että tumalyssaateissa (b). Kaksi positiivista oligoa ja scramble-kontrollioligo olivat käytössä. Kuvan 10 molemmissa kohdissa tulee katsoa,

missä oligoissa ja millaisessa kasvuolosuhteissa HSF2 sitoutuu HSE:hen. Signaaliin voimakkuuteen myös tulee kiinnittää huomiota.

Kuvassa 10 a havaitaan kaksi vyöhykettä oligossa A ja input-kontrollinäytteissä sekä lämpökäsittelyssä että optimaaliolosuhteissa. Tämä tulos osoittaa, että molemmat HSF2- α ja HSF2- β sitoutuvat HSE:hen optimaalisissa kasvuoloissa ja lämpökäsittelyn aikana. Signaali oligoissa A ja B sekä input-kontrollinäytteissä oli vahvempi lämpökäsittelyssä verrattuna optimaaliin. Oligossa B optimaaliolosuhteissa ei näy signaalia.

HeLa-solun tumauutteissa HSF2 havaittiin myös oligoissa A ja B. Oligossa B HSF2:n signaali näkyi heikosti lämpöshokkinäytteessä. Vastaavasti oligossa A HSF2 havaittiin molemmissa näytteissä ja olosuhteissa. Oligossa A optimaalinäytteen signaali oli heikompi kuin lämpöshokkinäytteen signaali.

Input-kontrollinäytteissä sekä optimaaliolosuhteissa että lämpöshokin aikana nähtiin HSF2:n sitoutumista HSE-oligolle. Negatiivisessa oligossa ei havaittu mitään, kuten oli odotettavissa. Käytetyt vasta-aineet hybridisaatio-menetelmässä olivat tässä tapauksessa samoja, toisin sanoen anti-HSF2 ja anti-kani. Näytteistä tehtiin kolme peräkkäistä toistoa.



Kuva 10. HSF2:n tulos (a) kokosolu- tumauutteessa (b) hybridisaatioissa.

5.2 eEF α -1:n eristys ja tarkastelu tumassa

eEF α -1:n sitoutuminen HSE-oligolle havaittiin immunoblottilla HeLa-solujen tumauutteessa primäärivasta-aineella anti-eEF α -1 ja sekundaäärivasta-aineella anti-hiiri. Elongaatiotekijä alfa 1 on sitoutunut HSE:ta sisältävät oligoihin A (2+1) ja B (5+6). Scrambled-kontrollioligossa (3+4) ei näy mitään signaalia. Elongaatiotekijä alfa 1:n sitoutumissignaali havaittiin HSE-oligoissa sekä optimaaliolosuhteissa että lämpökäsittelyn aikana. Tämä osoittaa, että eEF α -1:llä on taipumus sitoutua HSE:hen ennen lämpöshokkikäsittelyä ja myös sen jälkeen.

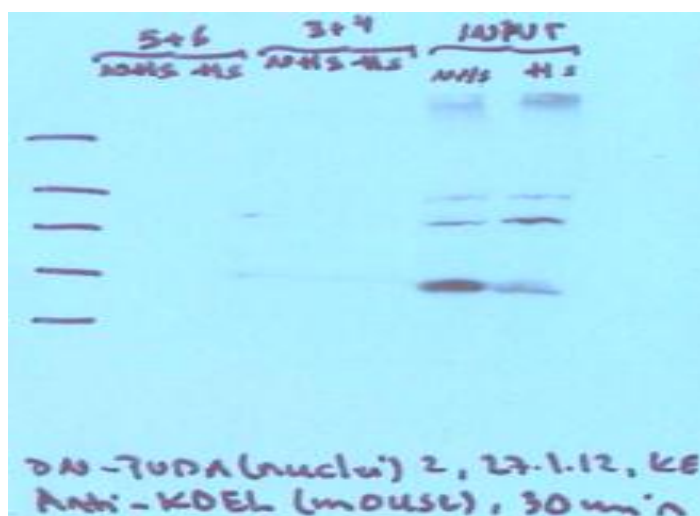
Molemmissa oligoissa A ja B signaali oli vahvempi optimaalikasvuolosuhteissa. Input-kontrollinäytteissä, joissa on presipitoimaton lyaatti, signaalin voimakkuus oli sama. Lisäksi havaittiin, että input-kontrollinäytteissä eEF α -1 oli geelissä hieman alempana verrattuna HSE-oligoilla eristettyihin elongaatiotekijä alfa 1:n sijaintiin. Tämä tulos yritettiin toistaa kolme kertaa, mutta valitettavasti tuloksissa oli vaihtelua.

Oligopresipitaatio -menetelmällä tutkittiin myös massaspektrometrian (liite 3) avulla löydetyt proteiinit KDEL ja 14-3-3. Proteiini KDEL:n sitoutuminen HSE-oligolle tapahtui HeLa-solujen tuma- ja kokosolulysaateissa. Analyyseissa käytettiin immunoblottia primäärivasta-aineen anti-KDEL avulla. Sekundaäriivasta-aineena KDEL-proteiinille oli käytössä anti-hiiri. Kuvassa nähdään, että ensimmäiseen kuoppaan on pipetoitu proteiinistandardi, joka on merkattu viivoilla. Viivojen koot ovat ylhäältä alas: 80 kDa, 58 kDa, 46 kDa, 30 kDa ja 25 kDa.

Kuvassa 11 tulee katsoa, sitoutuuko proteiini- KDEL HSE:hen positiivisessa oligossa ja input-kontrollinäytteissä. Lisäksi katsotaan tapahtuuko situoutuminen optimaaliolosuhteissa tai lämpökäsittelyssä vai molemmissa olosuhteissa. Sitoutumissignaalin voimakkuus on myös tärkeä havaita.

Positiivista oligonukleotidia B (5+6) ja negatiivista scramble-oligoa käytettiin oligonukleotidipresipitaatio -menetelmässä. Toinen positiivinen oligonukleotidi ei ollut mukana tässä tutkimuskokeessa.

KDEL-proteiini -signaaleja havaittiin input-näytteissä optimaali- ja lämpökäsittely-olusuhhteissa. Signaali optimaalikasvuolosuhteissa oli vahvempi kuin lämpökäsittelyssä. Oligoissa scramble ja B ei havaittu mitään signaalia. Tästä voi päätellä, että tämä proteiini ei ole osa niitä proteiinikompleksia, jotka liittyvät HSE:hen. Jokaisesta näytteestä tehtiin kolme toistoa sekä tuma- että kokosolulysaateissa. (kuvat 11)



Kuva 11. KDEL:n eristys hybridisaatiolla tumauutteessa.

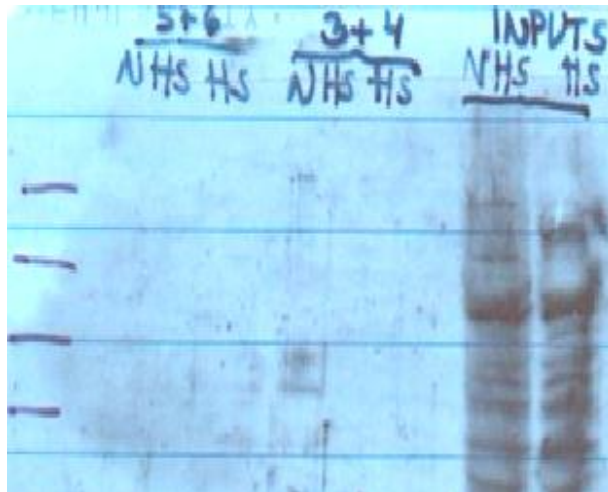
Kuvassa 12 oligopresipitaatiolla analysoitiin Seijaksen (2011) tuloksissa (liite 3) oleva proteiini- 14-3-3. Analysointi tapahtui hybridisaatio -menetelmällä vastaaineiden avulla. Primäärivasta-aineena käytettiin anti-14-3-3 ja sekundääri-vasta-aineena oli anti-kani.

Geeliin ensimmäiseen kuoppaan on pipetoituu proteiinistandardi, joka näkyy viivoilla kuvassa 12. Viivojen koot ovat ylhäältä alaspäin: 80 kDa, 58 kDa, 46 kDa ja 35 kDa.

Proteiini 14-3-3:n sitoutuminen HSE-oligolle oli HeLa-solujen tuma- ja kokosolulysaateissa. Kuvassa 12 tulee katsoa, sitoutuuko proteiini- 14-3-3 HSE:hen positiivisessa oligossa ja input-kontrollinäytteissä. Lisäksi katsotaan, tapahtuuko situoutuminen optimaaliolosuhteissa vai lämpökäsittelyssä vaiko

molemmissa olosuhteissa. Sitoutmissignaalin voimakkuus on myös tärkeä tietää.

14-3-3:n eristämiseen on käytetty scrambled-kontrollioligoa (3+4) ja HSE-oligoa B (5+6). Proteiinin 14-3-3 signaaleja havaittiin input-kontrollinäytteissä optimaali- ja lämpökäsittelyolosuhteissa. Signaalit sekä optimaalikasvuolosuhteissa että lämpökäsittelyssä ovat yhtä vahvoja. Positiivisessa ja negatiivisessa oligoissa ei havaittu mitään signaalia. Tästä tuloksesta voidaan päätellä, että tämä proteiini ei sitoudu HSE:hen, vaikka se on havaittu aiemmissa massaspektrometria-analyyseissa. Näytteistä tehtiin kolme peräkkäistä toistoa HeLa-soluissa. (kuvat 12)



Kuva 12. Proteiinin 14-3-3 eristys kokosolulysaatissa hybridisaatiolla.

6 JOHTOPÄÄTÖKSET

Oligonukleotidipresipitaatio- menetelmällä voidaan eristää DNA:han sitoutuneita ja sen kanssa vuorovaikutuksessa olevia transkriptiofaktoreita. Tämä tutkimusmetodi vaatii tarkkuutta, steriiliä työskentelyä sekä useita toistoja. Eristämisprosessin aikana tulee noudattaa protokollaa, jotta tulokset ovat keskenään vertailukelpoisia.

Koko prosessin aikana käytettyjen reagenssien säilytysolosuhteet, ikä ja valmistus vaikuttivat kokeiden lopputulokseen. Oligonukleotidipresipitaatio vaatii paljon solumateriaalia riittävän signaalin saamiseksi. Materiaalin kerääminen varsinaiseen työskentelyyn oli alkuvaiheessa haasteellista, koska solut eivät kasvaneet halutulla tavalla. Syyksi epäiltiin solujen vanhentumista ja niiden infektoitumista, jolloin alettiin viljellä uusia HeLa-soluja samoissa kasvuolosuhteissa. Solujen kasvamiseen meni jonkin verran aikaa, mutta uusilla soluilla materiaalien kerääminen oli jatkossa nopeampaa ja helpompaa.

Tumien eristämisessä homogenisointivaihe jäillä oli tärkeä, jotta tumat saatiin vahingoittumattomina talteen. Toisaalta jos homogenisointi jäi vaillinaiseksi, se heikensi proteiinisaantoa.

Näytteiden volyymin ollessa suuremman kuin kuoppien kapasiteettiin, näytteet valuivat kuopista alas tai siirtyivät toisiin kuoppiin ja tällä tavalla sekoittivat kokeiden lopputulosta. Oikean geelin huokoskoko on hyvä ottaa huomioon riippuen siitä, minkä kokoisia proteiineja halutaan tutkia. Transfer-vaiheessa nitroselluloosakalvon ja geelin puhtaus olivat ratkaisevia tekijöitä.

Tässä opinäytetyössä eristettiin ja tutkittiin oligonukleotidipresipitaatiomenetelmällä HSE-oligonukleotidiin sitoutuvia proteiineja. Tutkitut proteiinit olivat HSF1 ja HSF2, sekä Seijaksen (2011) tuloksista (liite1) löydetty eEF α -1, KDEL ja 14-3-3. Tuman rikastuminen ja sytoplasman eristäminen vahvistettiin tubuliinin ja lamiinin avulla. HSE:ta sisältävät positiiviset oligonukleotidit A ja B sekä negatiivinen oligo scramble olivat käytössä kaikissa kokeissa. Negatiivisella oligolla ei havaittu mitään signaaleja optimaaliolosuhteissa eikä lämpöshokin aikana. HSF1:n ja HSF2:n sitoutumissignaalia DNA:han oli jo

odotettavissa, koska aiemmat tutkimukset ovat antaneet siitä toistettavat tulokset.

Tässä tutkimuksessa voidaan havaita, jos jokin proteiini vaeltaa geelissä hitaammin tai nopeammin (indikoi PTM-muutosta), mutta mihin kohtaan proteiinia esimerkiksi fosfaattiryhmä kiinnittyy, ei voida immunoblottimenetelmän avulla osoittaa.

Tutkimuksen tuloksista päätellään, että lämpöshokki aktivoi HSF1:n sitoutumista DNA:han. HSF2:n puolestaan myös havaittiin sitoutuvan HSE-oligoon.

eEF1 α :n tulokset antavat viitteitä siihen, että eEF α -1 voi sitoutua DNA:han. Translaatiotekijän sitoutumista havaitaan sekä optimaali- että lämpöshokkiolosuhteissa. Tämä viittaa siihen, että elongaatiotekijä alfa yhdellä on taipumus sitoutua HSE:hen molemmissa olosuhteissa.

eEF1- α :n sitoutuminen optimaaliolosuhteissa oli yllättävä löytö. Yksi mahdollinen selitys tähän voi olla, että se on jo entuudestaan kiinnittynyt lämpöshokkielementtiin ja se aktivoituu lämpöshokin aikana. Toisin kuin HSF1 ja HSF2, signaalit eEF α -1:ssa olivat lämpöshokin aikana vahvempia, mikä toi esille näiden kolmen proteiinin välisen eron analyyseissa. eEF1 α -1, HSF1 ja HSF2 eivät sitoutuneet negatiiviseen oligoon, jossa ei ole HSE-sekvenssiä.

HSF1:n ja eEF1 α -1: on havaittu olevan vuorovaikutuksessa toistensa kanssa ja niiden vuorovaikutus kasvaa lämpöshokin aikana. eEF1 α -1 aktivoi HSF1:tä aiheuttamalla DNA:han sitoutumista ja trimerisointia. (Shamovsky ym. 2006.)

Vaikka eEF1 α -1:sta ei saatu kolme peräkkäistä positiivista tulosta, on silti mahdollista väittää, että Seijaksen (2011) saama tulos massaspektrometrialla pitää paikkansa. Tämän osoittamiseen tarvitaan lisää tutkimuksia ja aikaa. Tutkimuksissa analysoitujen KDEL- ja 14-3-3 -proteiinien, joiden oli myös havaittu massaspektrometrialla sitoutuvan HSE-sekvenssille, ei havaittu sitoutuvan HSE:hen tämän tutkimuksen aikana.

Tiedetään, että translaatiotekijä eEF α -1 on olennainen osa translaatiokoneistoa, joka kuljettaa aminoasyyli-siirtäjä-RNA ribosomeille. Tämän vuoksi euka-

ryoottisen elongaatiotekijä alfa 1:n sitoutuminen HSE:hen on tärkeä tulos. Translaatiotekijä eEF α -1:llä on merkittävä rooli proteiinien tuottamisessa ja sen sitoutuminen DNA:han tuo mukanaan tärkeää tietoa solun toiminnasta lämpöshokin aikana.

7 YHTEENVETO

Opinnäytetyön tavoitteena oli tutkia, miten solut reagoivat stressiin ja miten ne selviytyvät stressitilanteista. Päähuomiona oli lämpöshokkitekijä yksi ja elongaatiotekijä alfa yhden vuorovaikutus DNA:n kanssa.

Oligonukleotidipresipitaatio-menetelmän käyttö onnistui, mikä osoitettiin tubuliinin ja lamiinin avulla. HSF1 ja HSF2 tulokset näyttävät onnistuneilta, mikä oli odotettavissa vaikka välillä signaalit olivat heikkoja proteiiniaanalyyseissä. Oligonukleotidipresipitaatio-menetelmää voidaan käyttää eristämään DNA:han sitoutuneita proteiineja.

Elongaatiotekijä alfa 1 havaittiin vain kerran tumauutteissa, minkä jälkeen sitä ei havaittu lämpöshokki- tai optimaaliolosuhteissa tämän opinnäytetyön aikana. Tämä löydös antaa kuitenkin toivoa situoutumisesta DNA:han, mutta lisätutkimuksia tulee tehdä, ennen kuin voidaan tehdä johtopäätöksiä. Näin ollen jää edelleen epäselväksi, pitävätkö Seijaksen (2011) massaspektrometrian tulokset (liite 3) paikkansa ja ovatko HSF1 ja eEF α -1 samassa kompleksissa.

Tavoitteena oli myös käyttää kromatiini-immunopresipitaatio-menetelmää (ChIP). ChIP:n avulla haluttiin selvittää mitkä ovat HSF1:n kohdegeenit optimaaliolosuhteissa ja lämpöshokissa, sekä tutkia eri kohdegeeni-populaatioiden (esim. Hsp:t vs solusykli) kinetiikkaa. Tämä työvaihe kuitenkin jätettiin suorittamatta, koska tarvittiin lisää tutkimuskokeita eEF α -1:sta tulosten varmistamista varten.

LÄHTEET

Amin J.; Ananthan J. & Voellmy R. 1988. Key features of heat shock regulatory elements. *Molecular and cellular biology*, 8: 371-3769.

Bradford M. 1976. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72: 248-254.

Casamassimi A. & Napoli C. 2007. Mediator complexes and eukaryotic transcription regulation. *Biochimie*, 89:1439-1446.

Hartl F. & Hayer-Hartl M. 2002. Molecular Chaperones in the Cytosol: From Nascent Chain to Folded Protein. *Science*, 295:1852-1858.

Hotokezaka Y.; Tobben U.; Hotokezaka H.; Van Leyen K.; Beatrix B.; Smith DH.; Nakamura T. & Wiedmann M. 2002. Interaction of the eukaryotic elongation factor 1 A with newly synthesized polypeptides. 2002. 24; 277 (21):18545-51.

Janssen G. M. C. & Möller W. 1987. Kinetic studies of role of elongation factors 1 β - and 1- γ in protein synthesis. *Biological chemistry*.

Jolly C. & Morimoto R. 2000. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *Journal of the National Cancer Institute*, 92:1564-157.

Koskull-Döring P.; Scharf K. & Nover L. 2007. The diversity of plant heat stress transcription factors. *Trends in plant science*, 12:452-457.

Kenichi Mitsui, Hiroshi Nakayama, Takumi Akagi, Munenori Nekooki, Kenji Ohtawa, Koji Takio, Tsutomu Hashikawa & Nobuyuki Nukina. 2002. Purification of polyglutamine aggregates and identification of elongation factor-1 α and heat shock protein 84 as aggregate-interacting proteins. *Cellular molecular*. 22 (21):9267–9277

Lee T. & Young R. 2000. Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annual review of genetics*, 34:77-137. References 44.

Lindquist S. & Craig E. 1988. The heat shock proteins. *Annual review of genetics*, 22:631-677.

Maston G.; Evans S. & Green M. 2006. Transcriptional regulatory elements in the human genome. *The annual review of genomics and human genetics*, 7:29-59.

Morimoto R. 1998. Regulation of the heat shock transcriptional response: Cross talk between a family of the heat shock factors, Molecular chaperones and negative regulators. *Genes & Development*, 12:3788-3796.

Pirkkala L.; Nykänen P. & Sistonen L. 2001. Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *Journal FASEB*, 15:1118-1131.

Riis B.; Rattan SI.; Clarck BF. & Merrick WC. 1990. Eukaryotic protein elongation factor. *Trends in biochemical science*, 15 (11): 420–424.

Seijas H. J. 2011. Identification of interacting proteins and post-translational modifications on DNA-bound HSF1. Department of Biosciences. Åbo academy university.

Shamovsky I.; Ivannikov M.; Kndel E.; Gershon D. & Nudler E. 2006. RNA-mediated response to heat shock in mammalian cells. *Nature*, 440: 556-560.

Shamovsky I. and Nudler E. 2008. New insights into the mechanism of heat shock response activation. *Cellular and molecular life Sciences*, 65:855-861.

Weissbach H. & Ochoa S. 1976. Soluble factors required for eukaryotic protein synthesis. *Annual review of Biochemistry*. 45, 191-216.

Åkerfelt M.; Trouillet D.; Mezger V. & Sistonen L. 2007. Heat shock factors at a crossroad between stress and development. *Annual New York Academy of Sciences*, 1113:15-27.

Åkerfelt M.; Morimoto R. & Sistonen L. 2010. Heat shock factors: Integrators of cell stress, development and lifespan. *Nature reviews molecular cell biology*, 11:545-555

Sähköinen lähde:

http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/transkriptio_1/2/

Työssä käytetyt liuokset ja muut materiaalit

Viljelymediaan lisätyt aineet:

10 % FCS
2 mM penisilliini
2 mM streptomysiini
2 mM L-glutamiini

Puskuri C (10.7.11, Hanser):

25 % glyserolia
20 mM HEPES
1,5 mM MgCl₂
0,42 M NaCl
0,2 mM EDTA
0,5 mM PMSF
0,5 mM DTT

Puskuri A (4.4.11, H.H.):

10 mM HEPES (pH 7,9)
1,5 mM MgCl₂
10 mM KCl
0,5 mM PMSF
0,5 mM DTT

Laemmlipuskuri: sisältää SDS ja β-merkaptoetanolia (11.3.11 A.V.)

TE-puskuri: sisältää 10 mM Tris-HCl ja 1 mM EDTA (11.5.11 H.H.)

TEG-puskuri (11.5.11 H.H.):

20 mM Tris-HCl (pH 7,5)
150 mM NaCl
1 mM EDTA
10 % glyserolia
0,1 % Triton X -100

Proteiinistandardi: Prestained Protein Marker, New England BIOLABS

Primäärivasta-aineet:

anti-HSF1 (Holmberg 2000)
anti-HSF2 (saatu Lea Sistosen laboratoriosta, Åbo Akademi, Suomi)
anti-eEF1-α (CBP-KK1, Millipore)

anti-lamiini (saatu Robert Goldmanin laboriosta, Northwestern University, USA)
anti-tubuliini (T3526, Sigma)

PBST (7.11.11, A.E.):
1xPBS+Tween puskuri

Transfer-puskuri (5.6.11, H.H.):
1xTransfer puskuri

ECL-liuos:
Detection reagent 1 (peroxide solution, prod. num. 1859688, PIERCE, Lot 6199755)
Detection reagent 2 luminol enhancer solution (prod num. 1859677 PIERCE, Lot 6199755)

8 %-Akryyliamidigeelin valmistus

1. Kaadettiin alla olevien taulukoiden mukaiset reagenssit kahteen falcon-putkeen
2. Koottiin lasit telineisiin
3. Erotusgeelin joukkoon lisättiin TEMED ja kaadettiin lasien väliin
4. Kaadettiin 500 µl mQ-vesi geelin päälle, jotta geeli tasantuu
5. Annettiin geelin olla noin 30 minuuttia
6. Lisättiin ylägeeli ja laitettiin kammat paikalle
7. Annettiin geelin jähmettyä
8. Laitettiin eppendorf-putket lämpöblokkiin (95 °C, 5 min)
9. Sentrifuoitiin (450 x g, 15 sec)
10. Pipetoitiin kuoppiin 15-25 µl näytettä/kuoppa sekä 10-15 µl proteiinistandardia

Alageeli	
Reagenssit	Määrä (µl)
Alageelin kantaliuos (pH 8,8)	3000
20 % SDS	60
Akryyliamidi	3200
vesi (mQ)	5800
10 % APS	60
TEMED	6

Ylägeeli	
Reagenssit	Määrä (µl)
Ylägeelin kantaliuos (pH 6,8)	1250
20 % SDS	25
Akryyliamidi	750
vesi (mQ)	3000
10 % APS	20
TEMED	10

Massaspektrometrian avulla havaitut proteiinit (muokattu: Seijas 2011).

Accession	MW	Protein description	#PSMC	#PSM HS	Σ Cov	Σ # PSMs	Σ # Pep
P68104	50.1	Elongation Factor 1-alpha 1 (eEF1a1)	6	13	12.12	19	7
Q00613-2	52.8	Heat Shock Factor protein 1 (HSF1)	0	13	16.56	13	9
O95678	59.5	Keratin, Type II Cytoskeletal 75 (K2C75)	0	11	5.99	11	5
P29401	67.8	Transketolase (TKT)	2	7	9.15	9	6
P02666_CON	25.1	Beta-casein precursor (CASB_BOVIN)	1	5	7.14	6	1
P11021	72.3	78 kDa Glucose-regulated Protein (GRP78)	2	4	4.59	6	3
P06733	47.1	Alpha-enolase (ENO α)	1	4	6.45	5	3
P55072	89.3	Transitional Endoplasmic Reticulum ATPase (TERA)	1	4	2.85	5	2
P04406	36.0	Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase (G3P)	2	4	10.15	6	3
O95486	119.7	Protein Transport Protein Sec24A (SC24A)	1	4	1.65	5	2
P01857	36.1	Ig Gamma-1 Chain C region (IGHG1)	1	4	5.76	5	2
P15311	69.4	Ezrin (EZRI)	0	4	3.41	4	2
P62258	29.2	14-3-3 Protein Epsilon (1433E)	1	3	9.02	4	2
P60660	16.9	Myosin Light Polypeptide 6 (MYL6)	0	3	15.89	3	2
P62081	22.1	40S Ribosomal protein S7 (RS7)	0	3	8.25	3	2
P08865	32.8	40S Ribosomal protein SA (RSSA)	0	2	4.41	2	1
O43390	70.9	Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein (HNRPR)	0	2	1.90	2	1
P30101	56.7	Protein disulfide-isomerase (PDIA3)	0	2	5.15	2	2
Q5D862	247.9	Filaggrin-2 (FILA2)	0	2	0.50	2	1
O75417	289.4	DNA Polymerase theta (DPOLQ)	0	2	0.31	2	1
P52948-4	96.0	Isoform 4 of Nuclear Pore Complex Protein Nup98-Nup96 (NUP98)	0	2	1.09	2	1

MW: [kDa]; PSMs C/HS: peptide spectral matches: Control/Heat Shock Conditions; Σ Cov.: Sum of total coverage; Σ # Pep.: Sum of all peptides founds