

Opinnäytetyö (AMK) / (YAMK)

Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma

Biotekniikka

2012

Henri Lähteenmäki

# KALLIKREIININ KALTAISTA PEPTIDAASI 2:TA TUNNISTAVAN FAB- FRAGMENTIN TUOTON OPTIMOINTI



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU  
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Henri Lähteenmäki

# KALLIKREIININ KALTAISTA PEPTIDAASI 2:TA TUNNISTAVAN FAB-FRAGMENTIN TUOTON OPTIMOINTI

Tuottaessa jotakin pyritään aina mahdollisimman suureen kustannustehokkuuteen. Tuotannon optimoimiseksi voidaan testata erilaisten muuttujien vaikutusta tuotannon tehokkuuteen. Kyseisessä työssä tutkittiin ravinteiden määrän, sekä indusoitavan solutiheyden vaikutusta muodostuvan tuotteen kokonaismäärään. Tavoitteena oli löytää näitä parametreja testaamalla kombinaatio, jolla saavutettaisiin mahdollisimman korkea tuottotaso. Optimoitavana tuottolinjana käytettiin kallikreinin kaltaista peptidaasi kahta tunnistavaa Fab-fragmenttia solun sisäisesti tuottavaa *Eschericia coli* -pohjaista linjaa (XL-1). Linja indusoimiseen käytettiin IPTG:ta.

Linjan optimointi suoritettiin kolmessa osassa. Ensimmäisissä kahdessa osassa suoritettiin koekasvatuksia 30 mL tilavuudessa. Ensimmäisen koekasvatuksen tarkoitus oli rajata tutkittavaa optimoitavaa aluetta ja toisen osan tarkoitus tutkia tarkemmin valittua aluetta. Lopullinen kolmas osa testattiin 4 L fermentoinnissa.

Testauksissa havaittiin tuoton kannalta optimaalisimmiksi parametreiksi olevan alhainen ravinne pitoisuus ja suhteellisen varhainen indusointi. Valituilla parametreilläkin tuottotaso jäi kuitenkin alhaiseksi.

Tuloksista pääteltiin alhaisen tuottotason johtuvan alhaisen ravinnepitoisuuden aiheuttamasta solujen aikaisesta hajoamisesta. Myös solumassan aiheuttaman viskositeetin kasvaessa erilaiset aineensiirtoon liittyvät ongelmat saattoivat olla osatekijänä alhaiseen tuottotasoon.

## ASIASANAT:

tuotto, fermentointi, Fab-fragmentti, optimointi

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food Technology | Biotechnology

2013 | 34 pages

Ilari Suominen, Principal Lecturer; Mari Peltola, Senior Researcher

Henri Lähteenmäki

# PRODUCTION OPTIMIZATION OF KALLIKREIN-RELATED PEPTIDASE 2 BINDING FAB FRAGMENT

In production optimization the goal is to reach high cost efficiency. In order to optimize the production process, the effect of different factors can be evaluated on production efficiency. In this particular thesis, the effect of the amount of nutrients and the density of induced cells were tested for the highest amount of product formed. The goal was to find a combination of these parameters that would give the highest productivity. The cell line that was optimized was an *Escherichia coli* (XL-1) based line that produced human kallikrein 2 binding Fab –fragments. The induction of the line was conducted by adding IPTG.

The optimization was performed in three parts. The first two parts consisted of test cultures in a volume of 30 mL. The purpose of the first culture was to narrow down the region to be optimized and the second culture was performed to optimize that region. The final third culture was performed in a 4 L fermentation process.

During the tests it was discovered that a low nutrient concentration and a fairly early induction were the most optimal parameters for the production. However with the selected parameters, the product yield was still low.

It was inferred from the results that the low yield was caused by the early cell lysis which was due to the low nutrient amount. Also the different problems related to mass transfer and the high viscosity caused by the increased concentration of cells played a role in the low product formation.

## KEYWORDS:

production, fermentation, Fab fragment, optimization

# SISÄLTÖ

<b>KÄYTETYT LYHENTEET (TAI SANASTO)</b>	<b>6</b>
<b>1 JOHDANTO</b>	<b>7</b>
<b>2 VASTA-AINEIDEN TUOTTO PANOSPROSESSEISSA BAKTEERISOLUILLA</b>	<b>8</b>
2.1 Tuottuminen	8
2.2 Käytettävät bakteerisolut	8
<b>3 REAKTORIT</b>	<b>10</b>
3.1 Tuotto panosreaktorissa	10
3.2 Optimointi	10
<b>4 PSA JA HK2</b>	<b>12</b>
4.1 Yleisesti	12
4.2 Käyttö	12
4.3 Vasta-ainefragmentit	13
<b>5 KOKEELLINEN OSUUS</b>	<b>15</b>
5.1 Työn tavoite	15
5.2 Käytetyt menetelmät	15
5.3 Käytetty tuottolinja	16
5.4 Kasvatusalusta	17
5.5 Työn suoritus	17
5.5.1 Indusointi OD:n testaus (alustava kasvatus)	17
5.5.2 Glukoosipitoisuuden testaus (alustava kasvatus)	18
5.5.3 Varsinainen pienenmittakaavan kasvatus (glukoosipitoisuus)	19
5.5.4 Varsinainen pienenmittakaavan kasvatus (indusointava solutiheys)	19
5.5.5 Suuren mittakaavan (4l) kasvatus (varsinainen kasvatus)	20
<b>6 TULOKSET</b>	<b>22</b>
6.1 Indusointi OD:n testaus (alustava kasvatus)	22
6.2 Glukoosipitoisuuden testaus (alustava kasvatus)	23
6.3 Varsinainen pienenmittakaavan kasvatus (glukoosipitoisuus)	25
6.4 Varsinainen pienenmittakaavan kasvatus (indusoitava solutiheys)	27
6.5 Suuren mittakaavan (4l) kasvatus (varsinainen kasvatus)	29

6.6 Päätelmät	32
<b>LÄHTEET</b>	<b>34</b>

## KUVAT

Kuva 1. Fluoresenssiin perustuvan immunomäärityksen perusperiaate	13
Kuva 2. Immunoglobuliinin rakenteet. Kuva Maria Lahti.	14
Kuva 3. Alustavan indusointitestauksen solunäytteiden vasta-ainepitoisuudet	22
Kuva 4. Vasta-ainepitoisuudet indusointitestauksen kasvatusliuoksesta	23
Kuva 5. Glukoosipitoisuuden testauksen solunäytteiden vasta-ainepitoisuudet.	24
Kuva 6. Glukoosipitoisuuden testauksen kasvatusliuoksen vasta-ainepitoisuudet	24
Kuva 7. Testattujen glukoosipitoisuuksien solunäytteiden vasta-ainepitoisuudet	26
Kuva 8. Glukoosipitoisuuden testauksen kasvatusliuokseen tuottuneet vast- ainepitoisuudet	26
Kuva 9. Testattujen indusointitiheyksien solunäytteiden vasta-ainepitoisuudet	28
Kuva 10. Indusointitiheyden testauksen kasvatusliuokseen tuottuneet vasta- ainepitoisuudet	28
Kuva 11. Varsinaisen kasvatuksen soluihin tuottunut vasta-ainepitoisuus	30
Kuva 12. Varsinaisen kasvatuksen kasvatusliuokseen tuottunut vasta-ainepitoisuus	31
Kuva 13. Varsinaisen kasvatuksen intrasellulaarisen ja ekstrasellulaarisen vasta- ainepitoisuuden vertailu	32

## TAULUKOT

Taulukko 1. Indusoinnin solutiheydet.	17
Taulukko 2. Indusoidut solutiheydet	18
Taulukko 3. Laimennosten indusoinnit	20
Taulukko 4. Esikasvatuksen seuranta	21
Taulukko 5. Varsinaisen kasvatuksen kasvun seuranta	21
Taulukko 6. Alustavan indusointitiheystestauksen vasta-ainepitoisuudet	22
Taulukko 7. Alustavan glukoosipitoisuuden testauksen solunäytteiden vasta- ainepitoisuudet	23
Taulukko 8. Glukoosipitoisuuksien testausten numeeriset arvot	25
Taulukko 9, Testattujen solutiheyksien numeeriset arvot	27
Taulukko 10, 4L kasvatuksen numeeriset arvot	29

## KÄYTETYT LYHENTEET (TAI SANASTO)

Lyhenne	Lyhenteen selitys (Lähdeviite)
OD	optical density, optinen tiheys. Solutiheyttä kuvaava asteikko
IPTG	isopropyyli- $\beta$ -D-galaktopyranosidi, yleisesti käytetty indukori
Fab-fragmentti	fragment antigen-binding

# 1 JOHDANTO

Eturauhassyövä ollessa miesten yleisin syöpäsairaus Suomessa, se todetaan vuosittain noin 4700 miehellä. Syövän tunnistukseen käytettävien merkkiaineiden tunnistukseen on kehitetty erilaisia diagnostisia menetelmiä. Näiden menetelmien tarkoitus on auttaa lääkereitä diagnooseissaan ja potilaan jälkiseurannassa (Syöpäjärjestöt, 2009). Vaikkakin lääkäreiden omaa ammattitaitoa tullaan aina tarvitsemaan, nämä diagnostiset työkalut ovat silti hyödyksi. Tarkkempien diagnoosien avulla välttyttäisiin turhilta toimenpiteiltä ja täten säästettäisiin molempien sekä potilaan, että lääkärin aikaa (Peltola, 2012). Siksi juuri on tärkeää tutkia näitä menetelmiä. Tutkimuksen etenemisen oletuksena ovat toimivat ja luotettavat reagenssit. Reagenssien helppo ja luotettava tuotanto mahdollistaa tehokkaan tutkimuksen tekemisen. Aika, joka säästetään tehokkaalla valmistusprosessilla, voidaan käyttää muihin tehtäviin. Tämän vuoksi tuottoprosessien optimoinnilla on tärkeä rooli myös tutkimuksen tukena.

## 2 VASTA-AINEIDEN TUOTTO PANOSPROSESSEISSA BAKTEERISOLUILLA

### 2.1 Tuottuminen

Proteiinien tuotanto on osa solujen geeniekspressiota. Luonnossa solut eivät valmista proteiineja ilman syytä. Jos jotain proteiinia ei esimerkiksi elinolosuhteiden vuoksi enää tarvita, aletaan proteiinia valmistaa vasta, kun sitä taas tarvitaan (Aittomäki *et al.* 2002). Proteiinit voivat tuottua solujen sisään tai erittyä solukalvon ulkopuolelle. Proteiinien tuotannosta vastaavat geenien säätelyjärjestelmät. Yksi tällaisista säätelyjärjestelmistä on *lac*-operoni, joka aktivoituu laktoosin indusoimana. Laktoosin korvikkeena voidaan myös käyttää synteettistä vastiketta/analogia, IPTG:tä (isopropyyli- $\beta$ -D-galaktopyranosidi) (Baneyx, 1999). Operonin aktivoituessa solut alkavat muodostamaan tuottogeenin määrittelemään proteiinia. Tuottumista voidaan hyödyntää mm. terapeuttisten tai teollisten proteiinien valmistuksessa. Kuten esim. insuliinin valmistukseen (hormoneilla) (Aittomäki *et al.* 2002).

### 2.2 Käytettävät bakteerisolut

Rekombinanttiproteiinien tuotossa yleisimmin käytettyjä linjoja ovat *Escherichia coli* -pohjaiset linjat, sekä *Corynebacterium* ei-patogeeniset linjat.

Erityisesti *E. coli* on yksi käytetyimmistä linjoista koska se kykenee jakaantumaan nopeasti suuriksikin solutiheyksiksi edullisilla kasvatusalustoilla. Myös lajin genetiikka tunnetaan hyvin, minkä vuoksi sille on saatavilla useita tuottovektoreita ja monia mutanttilinjoja (Baneyx, 1999). *E.coli*lla ei kuitenkaan pystytä tuottamaan isoja kompleksisia molekyylejä tai post posttranslacionaalista muokkausta vaativia proteiineja (Lee,



1996). Vektorien käyttöön liittyy myös ongelmia, kuten ilmentymiseen liittyvät tekijät. On myös mahdollista, että solut alkavat hylkimään haluttua plasmidia, jolloin kasvatus alkaa täyttyä soluista, jotka eivät tuota haluttua tuotetta. Plasmidin ”karkaamista” voidaan kuitenkin estää liittämällä plasmidiin antibiottiresistenssia koodaava geeni. Tällöin solut, jotka eivät sisällä haluttua plasmidia hajoavat ja tuottavien solujen osuus kasvualustalla kasvaa. (Baneyx, 1999)

Solujen hajoaminen voidaan tehdä myös viemällä soluihin geeni tai repressori, joka aiheuttaa solukuoleman plasmidin irrotessa (Baneyx, 1999).

Yksi vektoreihin liitettävä ongelma on käytettävä indusori. On väitetty, että erityisesti suuressa mittakaavassa käytettävän IPTG-indusorin hinta rajoittaa tuotannon kannattavuutta. IPTG:n käyttöön liittyy myös sen toksisuus soluille. IPTG:stä voi tulla soluille myrkyllistä sen pitoisuuden noustessa. Suuressa mittakaavassa nämä ongelmat voidaan kuitenkin välttää korvaamalla osa IPTG:stä laktoosilla. (Baneyx, 1999)

Aina ei kuitenkaan tarvitse käyttää *lac*-operonia, vaan soluihin voidaan viedä esimerkiksi fosfaateilla indusoituva geeni (Hannig, Makrides, 1998).

Proteiinin tuottumistilaan voidaan myös vaikuttaa muokkaamalla proteiinia ja vektoria. Proteiini voidaan tuottaa intrasellulaariseksi joko solukalvon sisään tai sisemmän ja ulomman väliin, periplasmiseen tilaan. Proteiini voidaan tehdä myös solusta erittyväksi. Kaikissa näissä tekniikoissa on oma etunsa muun muassa jälkikäsittelyn kannalta. (Hannig, Makrides, 1998)

Proteiinien tuottuminen periplasmaan on suotuisa menetelmä, koska tällöin haluttu proteiini erotellaan huomattavasti pienemmästä määrästä erilaisia proteiineja. Myös solun ulkopuolelle tuottuva proteiini on helppo puhdistaa, sillä *E. coli* erittää hyvin harvoja proteiineja solun ulkopuolelle. Kasvatusliuoksen proteolyttinen aktiivisuus on myös näiden tekniikoiden vähäisin. Solun ulkopuolelle erittyminen vaatii kuitenkin hyvin paljon metaboliaa, koska proteiinin on läpäistävä kaksi eri solukalvoa päästäkseen kasvatusliuokseen. (Hannig, Makrides, 1998)

## 3 REAKTORIT

### 3.1 Tuotto panosreaktorissa

Panosreaktorilla tarkoitetaan reaktoria, johon ei lisätä tai poisteta komponentteja ennen reaktion loppumista (Farlex inc. 2012). Panosreaktori on yksinkertainen reaktoryyppi. Tavanomainen fermentoinneissa käytettävä panosreaktori koostuu itse tankista, lämmitysvaipasta ja sekoittajasta. Vähäisten liikkuvien osien ja muuttujiensa ansiosta reaktori on helppo mallintaa matemaattisesti. Yksinkertaisuutensa ja vähäisten muuttujiensa vuoksi se on myös hyvin helppo skaalata ylöspäin ja optimoida. Yksinkertaisuus mahdollistaa myös sovellettavuuden erilaisille tuotoille. Tästä syystä panosreaktorit ovat yleisesti käytettyjä myös tutkimuskäytössä.

Päätavoitteena jokaisessa tuotossa on kustannustehokkuus. Koska useimmat tuotteet muodostuvat *E. coli*ssa solunsisäisiksi, voidaan tuottuneen proteiinin määrää kuvata myös muodostuneella solumassalla. (Hannig , Makrides, 1998)

### 3.2 Optimointi

Kasvatuksissa saattaa kuitenkin ilmetä erilaisia ongelmia, kuten substraatti-inhibitiota, sivutuotteiden aiheuttamaa inhibitiota, sekä ongelmia liittyen hapen ja lämmön siirtoon.

Yksi yleisimmistä substraatin aiheuttamista repressioista on glukoosi-inhibitio, jossa korkea glukoosipitoisuus alkaa estää proteiinien ilmentymistä soluissa (Aittomäki *et al.* 2002). Myös jotkin ravinneaineet, kuten ammoniakki, rauta ja fosfaatit voivat olla soluille myrkyllisiä korkeina pitoisuuksina. Tällaisista syistä kasvualustan korkea ravinnepitoisuus ei välttämättä tarkoita korkeaa saantoa.

Sivutuotteena muodostuva hiilidioksidi saattaa rajoittaa solujen jakaantumista erityisesti suuremmissa kasvatuksissa. Kasvunopeuden lisäksi hiilidioksidi saattaa lisätä myös haitallisten asetaattien muodostumista. (Lee, 1996)

Myös lämpötila on tärkeä muuttuja kasvatuksissa. Lämpötilan avulla voidaan säädellä solujen aineenvaihduntaa. Alentamalla kasvatulämpötilaa  $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ :sta  $+26\text{--}30\text{ }^{\circ}\text{C}$ :een, voidaan vähentää solujen jakaantumista ja ravinteiden kulutusta. Vähentämällä solujen kasvunopeutta, voidaan vähentää haitallisten sivutuotteiden muodostumista, sekä vähentää aineenvaihdunnan aiheuttamaa lämmön syntymistä. Aineenvaihdunnan kontrolloinnilla voidaan myös vaikuttaa hapenkulutukseen. Lämpötiloilla voidaan myös vaikuttaa joidenkin proteiinien stabiliteettiin. (Lee, 1996)

Suurissa kasvatuksissa hapen kulutus on yleensä yksi rajoittavista tekijöistä. Hapen liukoisuus veteen on hyvin alhainen. Liukoisuutta voidaan kuitenkin parantaa säätelemällä sekoitusnopeutta ja sekoitustapoja. Sekoitukseen liittyy kuitenkin omat ongelmansa. Sekoituksen on oltava tasaista, jotta kasvatusreaktoriin ei pääse muodostumaan happigradietteja. Sekoitusnopeuteen voidaan myös vaikuttaa rajoitetusti, sillä korkea sekoitusnopeus saattaa aiheuttaa leikkausvoimia, jotka ovat haitallisia soluille. Leikkausvoimat voivat myös aiheuttaa muutoksia kasvatuslämpötilaan. (Lee, 1996)

## 4 PSA JA HK2

### 4.1 Yleisesti

Prostata-spesifinen antigeeni (PSA) on diagnostiikassa käytetty eturauhas-syöpämarkkeri. Elimistössä proteiinin tehtävänä on toimia voiteluaineena siemennesteessä. Myös verenkierrossa esiintyy pieniä määriä kyseistä proteiinia. PSA kuuluu kallikreiniproteiineihin (hK3). PSA:sta esiintyy vapaata muotoa elimistössä. (Väisänen, *et al* 2006; Peltola, 2012)

Kallikreinin kaltainen peptidaasi 2 (hK2, KLK2) on yleensä eturauhasessa tuot-  
tuva proteiini kuten PSA. Myös hK2:ta esiintyy elimistössä enimmäkseen va-  
paassa muodossa. Vapaa muoto on vähemmän tutkittu kuin PSA. Elimistössä  
hK2:n tehtävänä on toimia PSA:n aktivaattorina. Lisäksi hK2:lla on todennäköi-  
sesti osuutta myös muiden kallikreinien aktivoinnissa.

PSA:n lisäksi myös hK2:ta voidaan käyttää eturauhasdiagnostiikassa. Kuitenkin  
hK2:n pitoisuudet elimistössä ovat alle 2 % verrattuna PSA-pitoisuuksiin, minkä  
vuoksi hK2:n tunnistukseen käytettävien määritysten tulee olla hyvin herkkiä.  
(Peltola, 2012)

### 4.2 Käyttö

PSA- ja hK2 -proteiineja tunnistavia vasta-aineita tai niiden fragmentteja voi-  
daan käyttää diagnostisiin määrittäksiin. Yksi tällaisista sovelluksista on kaksi-  
paikkainen immunomääritys. Kyseinen määrittäys koostuu kahdesta proteiinia  
tunnistavasta vasta-aineesta, joista toinen on kiinnitettynä kaivon pohjaan ja  
toinen leimataan mitattavalla kelaatilla.



Kuva 1. Fluoresenssiin perustuvan immunomäärityksen perusperiaate

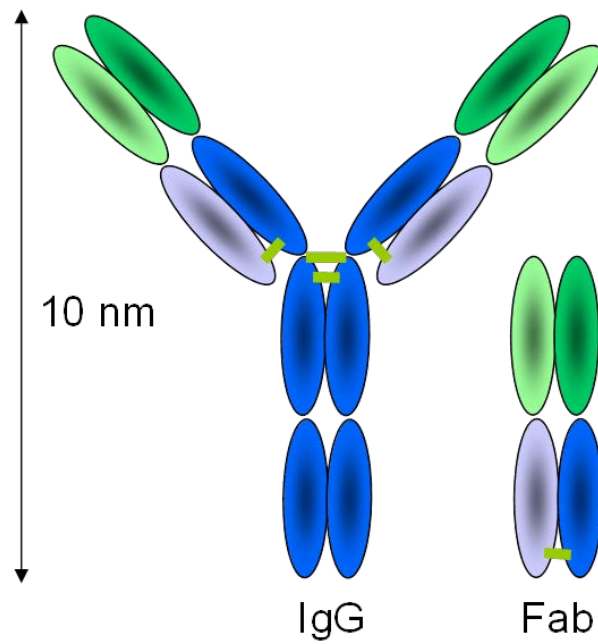
hK2- ja PSA- tasojen on havaittu kohoavan eturauhashäiriöiden yhteydessä. Mittaamalla näitä proteiiniarvoja voidaan arvioida potilaan eturauhassyöpäriskiä. Arvioimalla syöpäriskiä näytteestä, voidaan säästyä turhilta toimenpiteiltä. (Peltola, 2012)

#### 4.3 Vasta-ainefragmentit

Diagnostisissa määrityksissä saattaa kuitenkin esiintyä häiriöitä. Häiriötekijöitä voivat olla esimerkiksi seerumissa esiintyvät proteiinit, rasvajäänteet tai kuidut, jotka eivät kuitenkaan itsessään muodosta mitattavaa signaalia. Myös näytteen käsittelystä johtuvat tekijät voivat häiritä mittausta. Häiriöt saattavat aiheuttaa mitattavan signaalin madaltumista tai kohoamista, jolloin varsinainen määrittäminen saattaa antaa joko väärän positiivisen tai negatiivisen tuloksen. Tuloksien tarkkuus on merkittävä silloin kuin potilaalle annettava diagnoosi riippuu näistä tuloksista. Häiriöt ovat erittäin merkittävä tekijä erityisesti määrityksissä, joilla mitataan pieniä pitoisuuksia. (Peltola, 2012)

Mittaushäiriöiden vähentämiseksi voidaan käyttää vain vasta-aineen sitovia osia, eli Fab(fragment antigen-binding)-fragmentteja. Nämä fragmentit koostuvat vasta-ainemolekyylin kevyestä ketjusta, sekä raskasketjun pätkästä. Erityisesti seerumista löytyvien vasta-aineita sitovien komponenttien aiheuttamia häiriöitä voidaan vähentää käyttämällä pelkkää Fab-fragmenttia määrittäyskomponenttina. Ihmisen seerumi sisältää immunoglobuliineja, jotka tunnistavat erityisesti kehon ulkopuoleisia vasta-aineita. Poistamalla määrittäyskomponentista FC-osa tai ”varsi”, voidaan vähentää näiden vasta-aineiden sitoutumista määrittä-

komponentteihin ja täten vähentää niiden aiheuttamia häiriötä määrittämisessä.  
(Peltola, 2012)



Kuva 2. Immunoglobuliinin rakenteet. Kuva Maria Lahti.

## 5 KOKEELLINEN OSUUS

### 5.1 Työn tavoite

Tavoitteena oli optimoida a-hK2 -vasta-ainefragmenttia solun sisäisesti tuottavan 11B6 -solulinjan kasvuolosuhteet maksimaalisen tuoton saavuttamiseksi. Tarkoituksena oli ensin testata muuttujia pienessä 30 mL tilavuudessa ja sen jälkeen soveltaa parhaaksi todettuja parametrejä 4 l kasvatustilavuuteen.

Vaikka happipitoisuus on yleensä yksi hyvin vaikuttava kasvutekijä, sen pitoisuuden määrittäminen ja muuttaminen pienessä tilavuudessa on kuitenkin mahdotonta, jonka vuoksi tämä tekijä rajattiin pois testeistä. Jäljelle jäävistä tekijöistä testattaviksi valittiin solujen indusointi solutiheys, sekä kasvatuslioksen ravinnepitoisuus. Muita mahdollisia tekijöitä olisivat olleet indusorin pitoisuus, sekä kasvatuslämpötilan säätö. Yleensä myös jälkikäsittely on oleellinen osa prosessin optimointia, mutta mahdollisuudet vaikuttaa protokollaan tässä tapauksessa olivat hyvin rajoitetut, jolloin se rajattiin myös pois optimoinnista.

Työn alkuvaiheella ei ollut vielä selvillä millaisista pitoisuuksista ja suuruusluokista oli kyse, jonka vuoksi suoritettiin alustavat testaukset vain yhdellä rinnakkaisella. Alustavissa testeissä käytettiin myös mainittua 30 mL kasvatustilavuutta. Näiden testien avulla saatiin määritettyä tarkempi vaihteluväli halutuille parametreille.

Valittuja parametrejä testattiin tämän jälkeen kahdella rinnakkaisella kasvatuksella ja tiheämmällä näytteenottovälillä. Myös näytteenottoaikaa pidennettiin nähdäksemme muutosten vaikutukset paremmin. Esimerkiksi ravinnon määrän muutoksen uskottiin näkyvän erityisesti pitkällä aikavälillä.

### 5.2 Käytetyt menetelmät

Pienen mittakaavan testit (alustavat testaukset, sekä varsinaiset kokeet) suoritettiin kasvattamalla soluja 100 mL erlemayerissa 30 mL kasvatustilavuudessa.

Tuloksista verrattiin eri parametrien intrasellulaarista pitoisuutta ajan funktiona, sekä ekstrasellulaarista pitoisuutta. Ekstrasellulaarista pitoisuutta tutkittiin, jotta saataisiin selville mahdollinen solujen ennenaikainen hajoaminen. Solujen ennenaikainen hajoaminen johtaisi tuotteen hävikkiin, sekä mahdollisten tuotetta hajottavien entsyymien vapautumiseen kasvatusliuokseen. Tuottonäytteet saatiin ottamalla 1 mL kasvatusliuosta ja erottamalla solut sentrifugoimalla. Saatu solumassa hajoitettiin sonikoimalla voidaksemme tutkia solujen sisälle tuotuttua proteiinipitoisuutta.

Pitoisuuksien mittaukseen käytettiin Fab-assay protokollaa (Turun Yliopisto). Näytelaimennokset ja standardit pipetoitiin anti-mouse-IgG -vasta-aineella pinnotettuihin kaivoihin (Kaivogen). Standardilaimennoksiin käytettiin F(ab) -standardeja 0-150 ng/mL väliltä (Turun Yliopisto). Standardien ja vasta-ainenäytteiden inkuboinnin jälkeen kaivot pestiin neljä sykliä Perkin Elmer Delfia plate washerilla ja kaivoihin lisättiin europiumilla leimattua anti-mouse-IgG -vasta-ainetta (Turun Yliopisto) 100 ng/100 µl. Leimainkubaation jälkeen levyjä kehitettiin 10 minuuttia Delfia enhancement -liuoksessa (Turun Yliopisto). Kaivojen antamien aikaerotteisen fluorosenssisignaalin mittamiseen käytettiin Perkin Elmerin (Wallac) Victoria. Tulosten laskennassa käytettiin valmista Fab assay -protokollaa MultiCalc-ohjelmassa (PerkinElmer Wallac).

### 5.3 Käytetty tuottolinja

Työssä käytettiin *Escherichia coli* -pohjaista XL-1 (genotyyppi endA1 gyrA96(nalR) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB+ lacIq Δ(lacZ)M15] hsdR17(r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>) linjaa, jonka vektori oli suunniteltu tuottamaan hK2-proteiinia tunnistavaa vasta-ainefragmenttia. Vektorin indusaattorina käytettiin IPTG:lla (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) indusoituvaa lac-operonia, joka on yksi yleisimmistä ekspressiogeeneistä. Selektiogeeninä linjassa käytettiin kloramfenikoli- ja tetrasykliiniresistenssigeenejä.



## 5.4 Kasvatusalusta

Kantojen maljaamiseen käytetyt maljat(LA) sisälsivät 10g/L tryptonia, 5g/L hii-vauutetta, 10g/L natriumkloridia, 15g/L agaria, 0,5% glukoosia, 100 mg/mL tet-rasykliinia ja 100 mg/mL kloramfenikolia.

Pullokasvatuksissa ja suuressa kasvatuksessa käytetty kasvatusliuos (SB-medium) sisälsi 30g/L tryptonia 10g/L MOPS:a, 2mM MgSO<sub>4</sub>, sekä vaihtelevat määrät glukoosia (laimennettu 20% kantaliuoksesta). Antibioitteina kasvatuksis-sa käytettiin kloramfenikolia ja tetrasykliiniä.

## 5.5 Työn suoritus

### 5.5.1 Indusointi OD:n testaus (alustava kasvatus)

Kasvatus aloitettiin siirrostamalla 11B6 -linjan pesäkkeitä glyseroliprepistä mal-joille. Maljoja inkuboitin yön yli +37 °C:ssa. Aamulla maljoilta siirrettiin 50 ja 100 pesäkettä esikasvatukseen. Esikasvatus tehtiin 30 mL tilavuudessa, 0,5 % glukoosipitoisuudessa +37 °C:ssa 300 rpm ravistelussa. Kasvatusliuoksessa käytettiin myös samoja antibiootteja kuin maljauksessa. Iltapäivällä kasvatusten OD:n ollessa n. 2,00 (abs 600 nm, mitattu 1:10 laimennoksesta), kasvatukset jaettiin kolmeen 1:50 ja 1:100 laimennoksiin. Uusia kasvatuksia inkuboitin yön yli +26 °C:ssa, 300 rpm ravistelussa. Laimennosten tekeminen oli tärkeää, jotta aamulla kasvatusten solutiheyksissä olisi riittävästi vaihtelua.

Taulukko 1. Indusoinnin solutiheydet.

Laimennos	OD (abs 600nm)
1:50	2,66
1:50	2,23
1:50	2,20
1:100	1,50
1:100	1,50
1:100	1,65

Aamulla kasvatusten solutiheydet mitattiin ottamalla kasvatuksista 100µl näyte ja laimentamalla se 1 mL:ksi. Tarkoituksena oli valita indusointiin kasvatukset joiden solutiheydet eroavat riittävästi toisistaan. Indusointiväleiksi valittiin 1,0 absorbanssiyksikön välit. Kasvatukset indusointiin kun solutiheys oli haluttu (Taulukko 2). Indusointiin käytettiin 0,1mM IPTG:ta (0,1M laimennettu 1:1000 kasvatusliuoksessa). Indusoiduista kasvatuksista otettiin neljän ja kuuden tunnin inkuboinnin jälkeen näytteet. Näytteet sentrifugoitiin 10000 rpm 10 minuutin ajan ja supernatantinäytteet pakastettiin erillään -20 °C:een.

Taulukko 2. Indusoidut solutiheydet

Kasvatus	OD ( <i>abs 600nm</i> )	Aika
1	2,5	8:30
2	3,5	9:30
3	4,5	11:30
4	1,5	8:30
5	1,5	8:30

Ennen varsinaista pitoisuusmäärittystä (Fab-assay), solunäytteisiin lisättiin 1 mL määrittäksessä käytettävää puskuria. Näytteet sonikoitiin puskurissa ja supernatanti eroteltiin sentrifugoimalla 10000 rpm 10 minuutin ajan. Kasvatuksen supernatantinäytteistä tehtiin 1:2 laimennokset samaan puskuriin. Solunäytteiden supernatantista tehtiin  $10^{-1}$  -  $10^{-3}$  laimennokset. Kasvatusnäytteistä määritettiin vasta-ainepitoisuudet Fab assay -protokollan mukaan. 1,5 OD:n näytteitä tehtiin kaksi kappaletta, koska yhtä varalla ollutta kasvatusta ei tarvittu.

### 5.5.2 Glukoosipitoisuuden testaus (alustava kasvatus)

Aiemmin maljatuista pesäkkeistä (11B6) siirrettiin esikasvatukseen noin 50 ja 100 pesäkettä 30 mL tilavuuteen. Kasvatuksia inkuboitiin noin 7 tuntia +37 °C:ssa ja 0,5 % glukoosipitoisuudessa. Ilmapäivällä solutiheyden ollessa 2,0, tehtiin kasvatuksesta 1:50 ja 1:100 laimennokset neljään eri glukoosipitoisuuteen. Alustaviksi pitoisuuksiksi valittiin 0,25 %, 0,5 %, 1,0 % ja 1,5 %. Laimennoksia inkuboitiin +26 °C:ssa yön yli.

Aamulla 1:100 laimennokset indusointiin solutiheyden ollessa noin 1,5. Indusointiin käytettiin 0,1mM IPTG. Indusoiduista kasvatuksista otettiin näytteet neljän ja kuuden tunnin jälkeen (kasvatus +26 °C).

Näytteiden pitoisuudet määritettiin käyttämällä samoja laimennoksia ja protokollaa kuin indusointinäytteillä.

### 5.5.3 Varsinainen pienen mittakaavan kasvatus (glukoosipitoisuus)

Tuloksista havaittiin, että pienen mittakaavan indusoinnin optimialue on alhaisessa glukoosipitoisuudessa ja noin 2,0 OD:n solutiheydessä. Näiden tulosten perusteella valittiin jatkotutkimukseen 0,1-0,6 %:n glukoosipitoisuus, sekä 1,0-2,0 OD:n indusointitiheydet. Myös näytteenottoväliä muutettiin, niin että näytteitä otettiin 1 tunnin välein neljän tunnin ajalta.

Maljoilta otettiin 30 mL tilavuuteen 50:n ja 100:n pesäkkeen erät. Esikasvatus tapahtui 0,2 % glukoosipitoisuudessa ja +37 °C:n lämpötilassa. Neljän tunnin kasvatuksen jälkeen solutiheyden ollessa OD 2,0, jaettiin kasvatus 1:200 neljään eri glukoosipitoisuuteen. Jokaisesta pitoisuudesta tehtiin kaksi rinnakkaista kasvatusta. Pitoisuudet olivat; 0,1 %, 0,2 %, 0,4 % ja 0,6 %. Kasvatuksia inkuboitiin yön yli +26 °C:ssa. Aamulla (klo 8:30) solutiheyksien ollessa noin OD 2,0 kaikki kasvatukset indusointiin. Tästä hetkestä eteenpäin kasvatuksista otettiin 1 mL näytteitä tunnin välein neljän tunnin ajan. Ennen pakastusta solut sentrifugoitiin solumassan erottamiseksi.

### 5.5.4 Varsinainen pienen mittakaavan kasvatus (indusoitava solutiheys)

Indusointitiheyden testaamiseen otettiin toiset 50:n ja 100:n pesäkkeen erät 30 mL tilavuuteen. Viiden tunnin kasvatuksen jälkeen +37 °C:ssa, 100:n pesäkkeen kasvatus jaettiin 1:200, 1:300 ja 1:400 laimennoksien eriin, 2 rinnakkaista per laimennos (poikkeuksena 1:200, joita tehtiin yhteensä 4 pulloa). Kasvatuksia inkuboitiin +26 °C:ssa yön yli.

Taulukko 3. Laimennosten indusoinnit

Laimennos	OD	OD (indusoitu)
1:200	1,60	2,0
1:200	1,70	2,0
1:200	1,55	2,0
1:200	1,80	2,0
1:300	1,35	1,5
1:300	1,45	1,5
1:400	1,00	1,0
1:400	1,00	1,0

Taulukossa 3 on kuvattuna kasvatusten solutiheydet seuraavana aamuna, sekä näiden kasvatusten indusointitiheydet. Indusoinnin jälkeen kasvatuksista otettiin näytteet tunnin välein neljän tunnin ajalta. Ennen pakastusta solut sentrifugoitiin solumassan erottamiseksi.

Solunäytteet sonikoitiin ja niistä sekä supernatantinäytteistä määritettiin vasta-ainepitoisuudet käyttämällä Fab-assay -protokollaa.

#### 5.5.5 Suuren mittakaavan (4l) kasvatus (varsinainen kasvatus)

Suuren tilavuuden fermentointiin valittiin aiempien tulosten perusteella 0,2 % glukoosipitoisuus, mutta testataksemme erityisesti tämän tekijän vaikutusta tulokseen, indusointi OD pidettiin tavallisena 4,0:na.

Ennen fermentointia 11B6 -glyseroliprepistä valettiin malja, josta seuraavana aamuna siirrettiin esikasvatukseen 50 ja 100 pesäkettä. Esikasvatus tehtiin 50 mL tilavuudessa, +37 °C:ssa ja 0,2 % glukoosipitoisuudessa. 100 pesäkkeen kasvatuksesta otettiin näytteitä tunnin välein, noin 4h kasvatuksen jälkeen.

Taulukko 4. Esikasvatuksen seuranta

<b>klo</b>	<b>OD</b>
12:00	0,11
13:00	0,30
14:00	0,70
15:00	1,20

Iltapäivällä OD:n ollessa 1,2, siirrettiin koko 100 pmy –kasvatus (pesäkettä muodostava muodostavaa yksikköä) 4 L fermentoriin (BioFLo III, New Brunswick scientific). Kasvatus tehtiin 4,0 L tilavuudessa +26 °C:ssa. Aamulla (9:15) OD:n ollessa noin 4,0 kasvatus indusoitiin 400µl 1M IPTG:llä.

Taulukko 5. Varsinaisen kasvatuksen kasvun seuranta

<b>klo</b>	<b>OD</b>
09:15	4,0
10:15	4,0
11:15	5,2
12:15	5,5
13:15	6,8
14:15	6,5

Kasvatus lopetettiin klo 14:15 jälkeen. Kasvatusliuos jaettiin pulloihin ja sentrifugoitiin. Saatu solumassa pakastettiin -70 °C:een.

Kasvatuksesta otetuista 1 mL näytteistä määritettiin vasta-ainepitoisuus Fab-assay -protokollaa käyttäen.

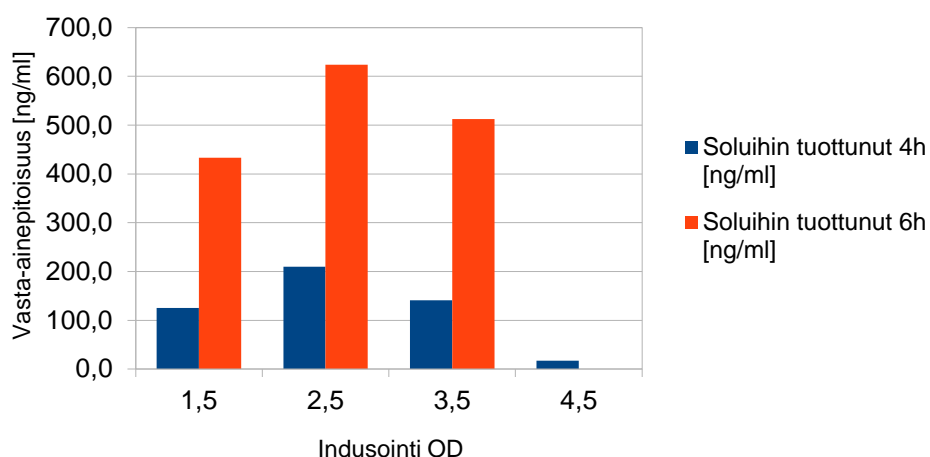
## 6 TULOKSET

### 6.1 Indusointi OD:n testaus (alustava kasvatus)

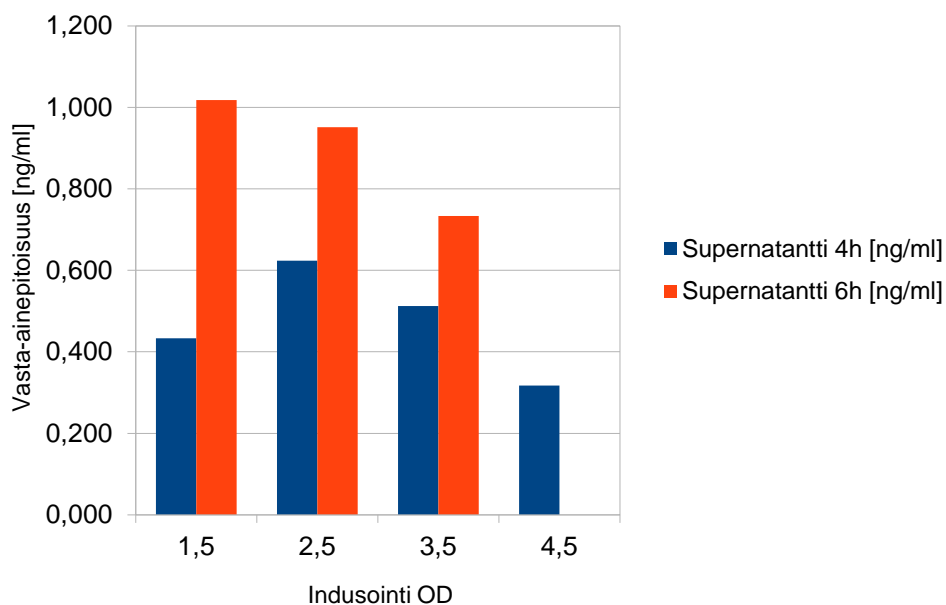
Kuvaajista 3 ja 4 voidaan havaita, että tuottumisen kannalta optimi indusointitiheys olisi lähellä 2,0:n solutiheyttä. Liian alhaisen solutiheyden indusointi johtaa alhaisempaan tuottotasoon, mutta liian myöhäinen indusointi johtaa solujen kuolemaan jo ennen tuottumista. 1,5 OD:n näytteistä on esitetty kahden rinnakkaisen keskiarvo.

Taulukko 6. Alustavan indusointitiheystestauksen vasta-ainepitoisuudet

Indusointi OD	Supernatantti 4h [ng/ml]	Soluihin tuottunut 4h [ng/ml]	Supernatantti 6h [ng/ml]	Soluihin tuottunut 6h [ng/ml]
1,5	0,467	100,0	1,018	467,0
1,5	0,400	150,0	1,018	399,5
2,5	0,624	210,0	0,952	624,0
3,5	0,513	141,0	0,734	512,5
4,5	0,318	17,0	-	-



Kuva 3. Alustavan indusointitestauksen solunäytteiden vasta-ainepitoisuudet

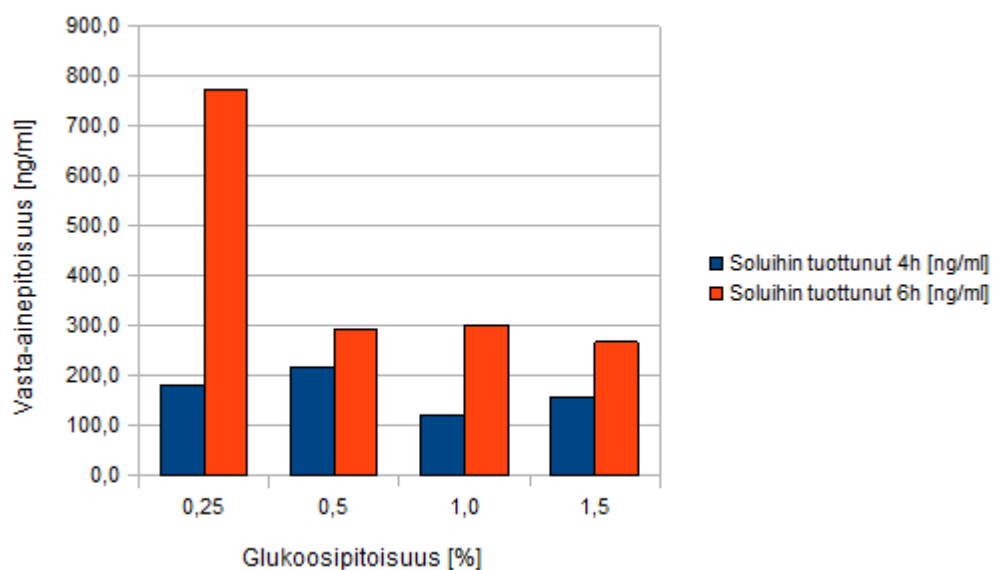


Kuva 4. Vasta-ainepitoisuudet indusointitestauksen kasvatusliuoksesta

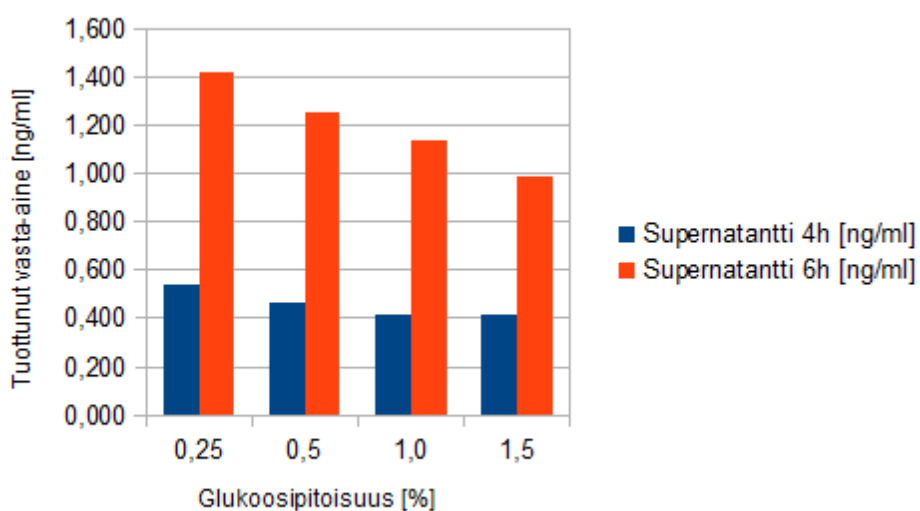
## 6.2 Glukoosipitoisuuden testaus (alustava kasvatus)

Taulukko 7. Alustavan glukoosipitoisuuden testauksen solunäytteiden vasta-ainepitoisuudet

Glukoosipitoisuus	Supernatantti 4h [ng/ml]	Soluihin tuottunut 4h [ng/ml]	Supernatantti 6h [ng/ml]	Soluihin tuottunut 6h [ng/ml]
0,25	0,542	179,0	1,422	775,0
0,5	0,466	218,0	1,251	293,0
1,0	0,420	121,0	1,134	302,0
1,5	0,419	158,0	0,985	267,0



Kuva 5. Solunäytteiden vasta-ainepitoisuudet eri glukoosipitoisuuksilla



Kuva 6. Kasvatusliuokseen tuottuneet vasta-ainepitoisuudet eri glukoosipitoisuuksilla

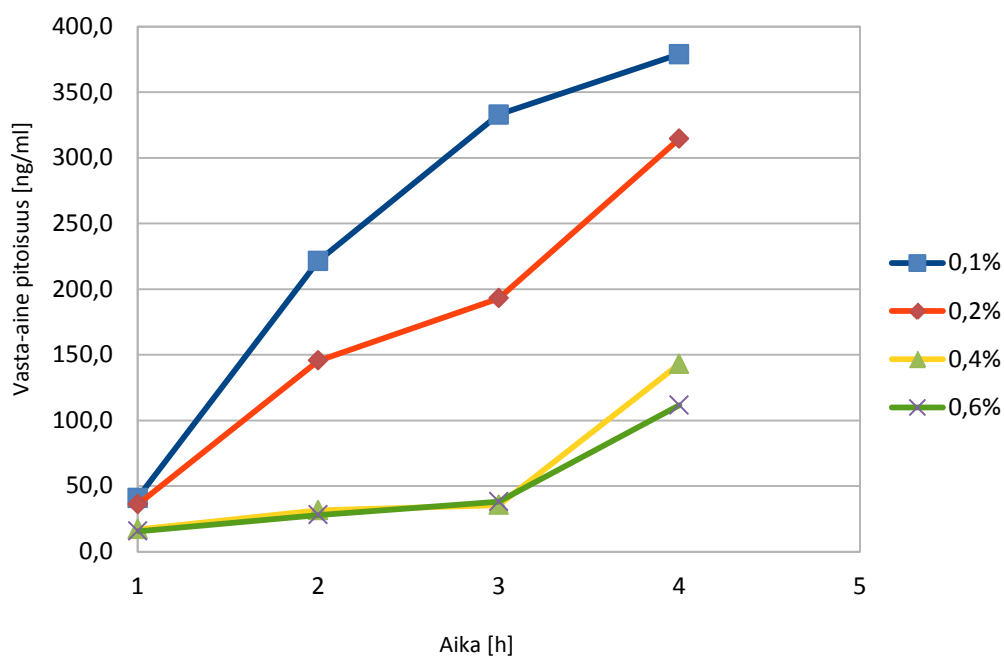


Kaavioita tulkittaessa voidaan havaita alhaisen glukoosipitoisuuden olevan parempi solujen kasvun ja tuottumisen kannalta. Tuottumista saattaa edistää glukoosiefektin vähäisyys.

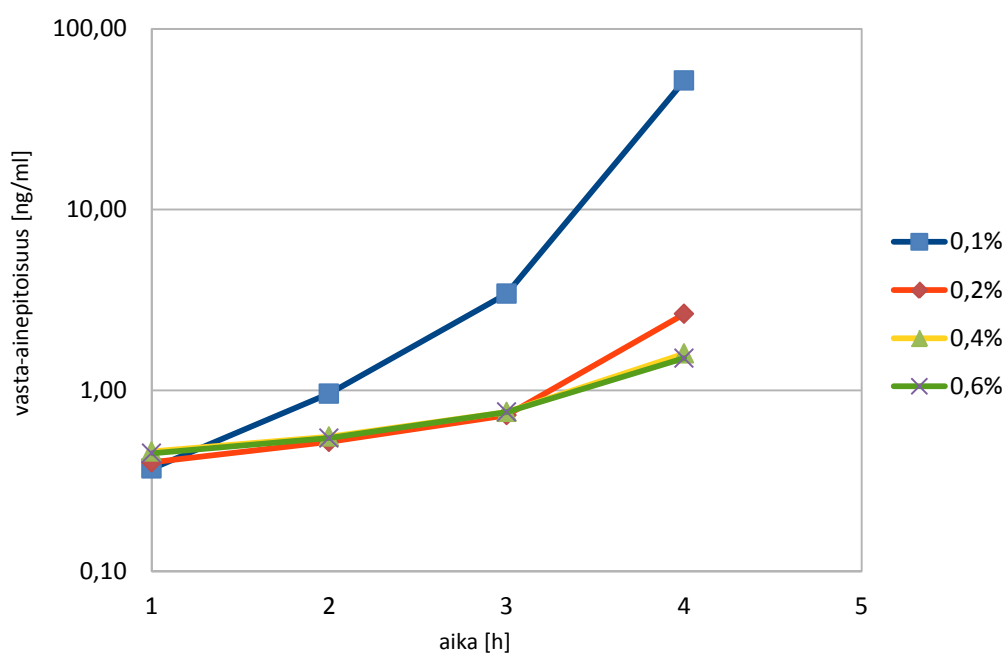
### 6.3 Varsinainen pienen mittakaavan kasvatus (glukoosipitoisuus)

Taulukko 8. Glukoosipitoisuuksien testausten numeeriset arvot

Soluihin tuottuneet vasta-ainepitoisuudet				
Glukoosipitoisuus	1h [ng/ml]	2h [ng/ml]	3h [ng/ml]	4h [ng/ml]
0,1%	27,0	186,0	325,0	355,0
0,1%	55,0	257,0	341,0	403,0
0,2%	17,0	34,0	45,0	226,0
0,2%	17,0	29,0	26,0	60,0
0,4%	14,0	27,0	50,0	163,0
0,4%	11,0	21,0	30,0	70,0
0,6%	13,0	47,0	45,0	145,0
0,6%	12,0	30,0	27,0	68,0
Keskiarvot				
Glukoosipitoisuus	1h [ng/ml]	2h [ng/ml]	3h [ng/ml]	4h [ng/ml]
0,1%	41,0	221,5	333,0	379,0
0,2%	36,0	145,5	193,0	314,5
0,4%	17,0	31,5	35,5	143,0
0,6%	15,5	28,0	38,0	111,5
Suhteellinen keskihajonta				
Glukoosipitoisuus	1h	2h	3h	4h
0,1%	48,29%	22,67%	3,40%	8,96%
0,2%	0,00%	2,43%	6,96%	37,32%
0,4%	12,48%	13,47%	39,84%	45,99%
0,6%	4,56%	42,93%	33,49%	48,83%



Kuva 7. Solunäytteiden vasta-ainepitoisuudet eri glukoosipitoisuuksilla



Kuva 8. Kasvatusliukseen tuottuneet vast-ainepitoisuudet eri glukoosipitoisuuksilla

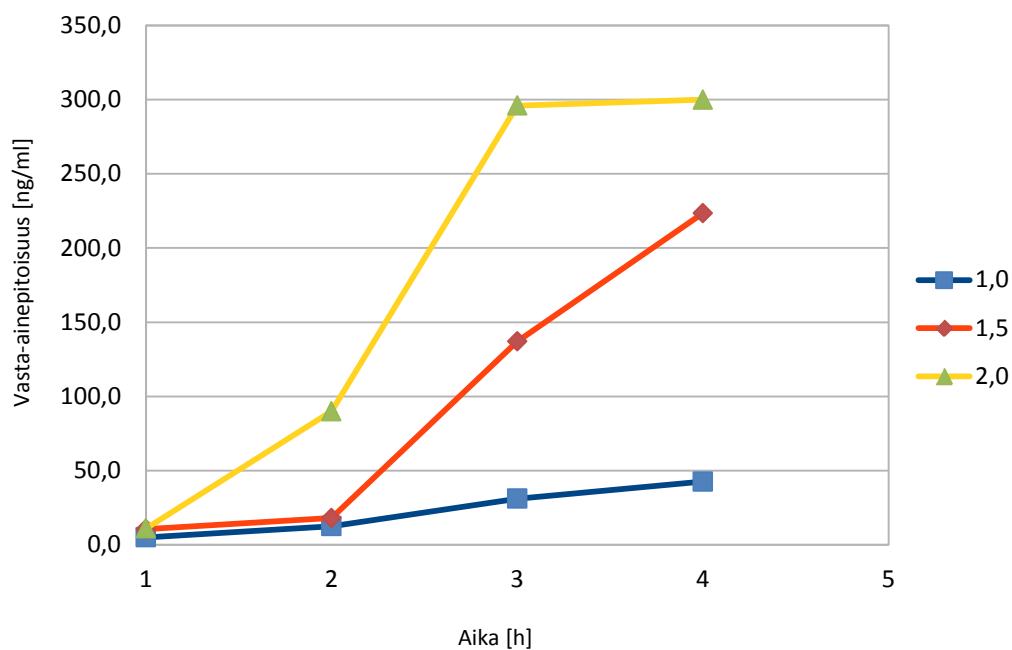
Kuvaajasta selkeästi nähdään, kuinka alhainen ravinnepitoisuus mahdollistaa korkean proteiinin tuottumisen soluihin, mutta tarkastellessa myös solujen ulkoista pitoisuutta, huomataan kuinka se kohoaa huomattavasti suhteessa muihin. Taulukossa on esitettyinä kasvatusliuokseen päässeeseen vasta-aineen pitoisuus suhteessa soluihin tuottuneeseen pitoisuuteen.

Solujen ulkoisen pitoisuuden tulosten selkeyttämiseksi tulokset ovat esitettyinä logaritmisella asteikolla.

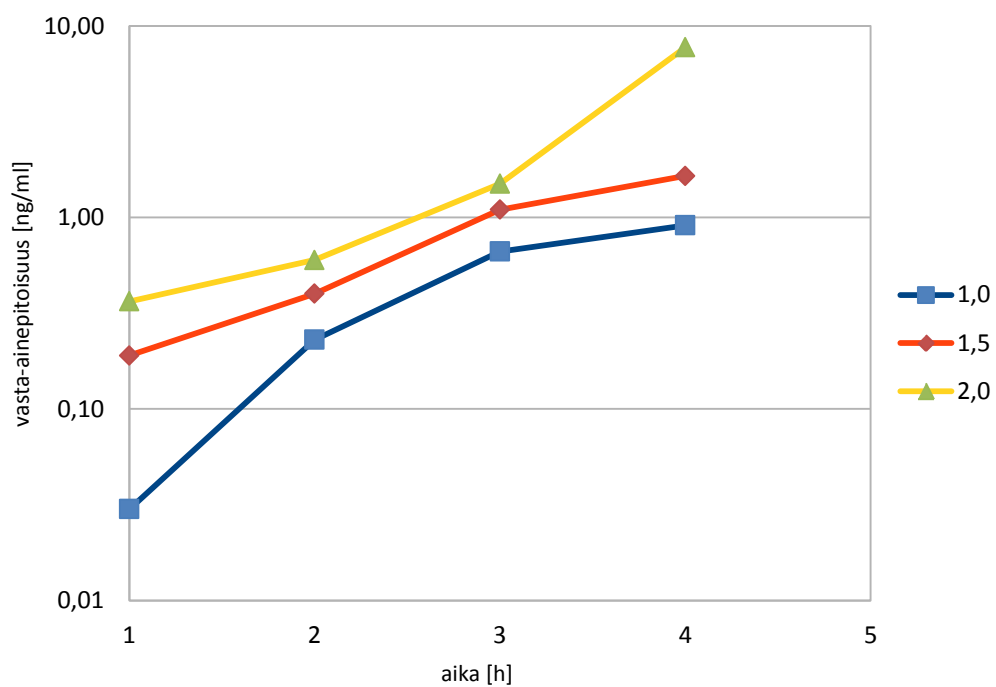
#### 6.4 Varsinainen pienen mittakaavan kasvatus (indusoitava solutiheys)

Taulukko 9, Testattujen solutiheyksien numeeriset arvot

Soluihin tuottuneet vasta-ainepitoisuudet				
Indusointi OD	1h [ng/ml]	2h [ng/ml]	3h [ng/ml]	4h [ng/ml]
1,0	6,0	10,0	28,0	33,0
1,0	4,0	15,0	34,0	52,0
1,5	9,0	17,0	150,0	224,0
1,5	12,0	19,0	124,0	223,0
2,0	10,0	90,0	310,0	298,0
2,0	12,0	90,0	282,0	302,0
Keskiarvot				
Indusointi OD	1h [ng/ml]	2h [ng/ml]	3h [ng/ml]	4h [ng/ml]
1,0	5,0	12,5	31,0	42,5
1,5	10,5	18,0	137,0	223,5
2,0	11,0	90,0	296,0	300,0
Suhteellinen keskihajonta				
Indusointi OD	1h	2h	3h	4h
1,0	28,28%	28,28%	13,69%	31,61%
1,5	20,20%	7,86%	13,42%	0,32%
2,0	12,86%	0,00%	6,69%	0,94%



Kuva 9. Testattujen indusointitiheyksien solunäytteiden vasta-ainepitoisuudet



Kuva 10. Indusointitiheyden testauksen kasvatusliuokseen tuottuneet vasta-ainepitoisuudet

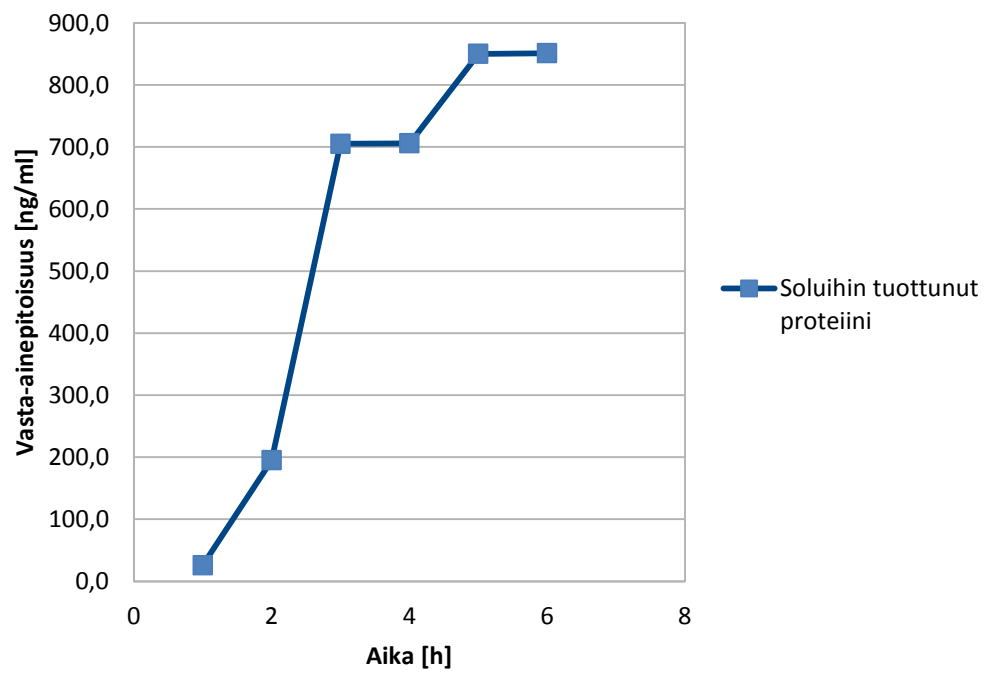
Kaavion mukaan 2,0 indusointitiheydellä saavutetaan suurin tuottoaste. Solujen indusointitiheyksiä vertaileissa solujen ulkoisten ja sisäisten pitoisuuksien suhteissa ei ole huomattavia eroja. Suurempi indusointi tiheys näyttäisi vastaavan suurempaa tuottomäärää ainakin tiettyyn pisteeseen asti.

#### 6.5 Suuren mittakaavan (4l) kasvatus (varsinainen kasvatus)

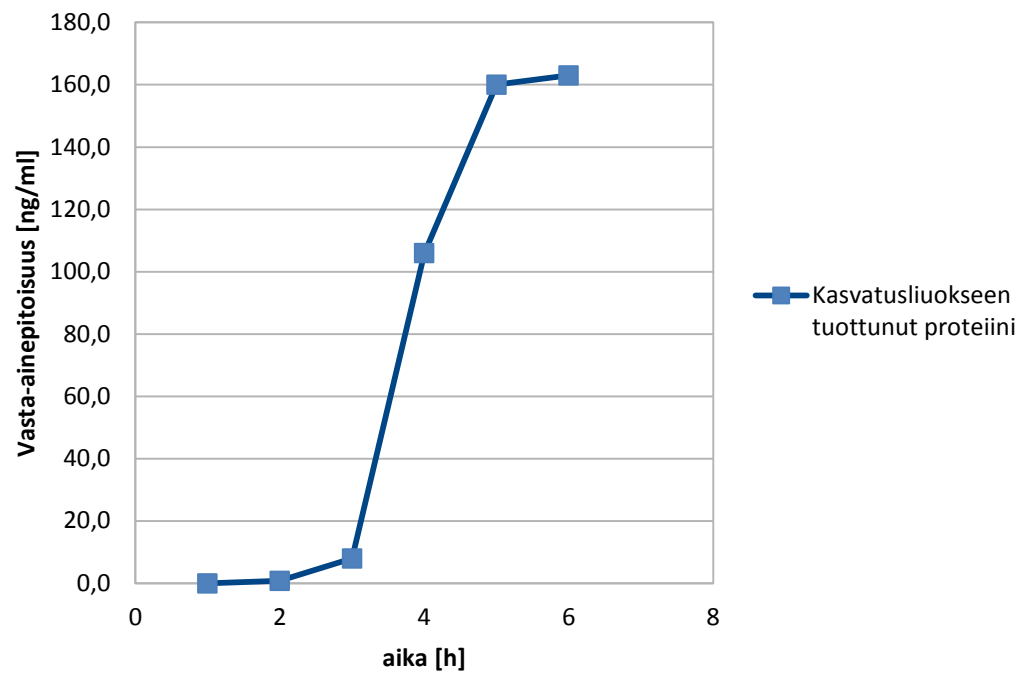
Taulukko 10, 4L kasvatuksen numeeriset arvot

Soluihin tuottunut proteiini	
Näyte	pitoisuus [ng/ml]
0h	26,0
1h	195,0
2h	705,0
3h	706,0
4h	850,0
5h	851,0

Kasvatusliuokseen tuottunut proteiini	
Näyte	pitoisuus [ng/ml]
0h	0,0
1h	0,8
2h	8,0
3h	106,0
4h	160,0
5h	163,0

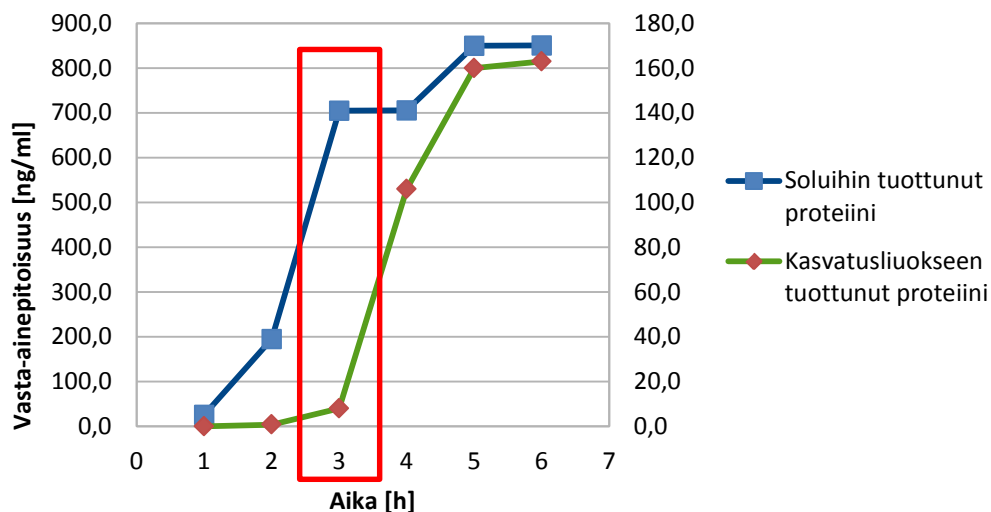


Kuva 11. Varsinaisen kasvatuksen soluihin tuottunut vasta-ainepitoisuus



Kuva 12. Varsinaisen kasvatuksen kasvatusliuokseen tuottunut vasta-ainepitoisuus

## 6.6 Päätelmät



Kuva 13. Varsinaisen kasvatuksen intrasellulaarisen ja ekstrasellulaarisen vasta-ainepitoisuuden vertailu

Kaavioista nähdään, että solut alkavat hajoamaan 3 h kohdalla, johtuen mahdollisesta ravinteiden puutteesta. Hajoaminen voi myös johtua suuresta solutiheydestä. Solutiheyden lisääntyessä myös kasvualustan viskositeetti ja tästä johtuvat leikkausvoimat kasvavat. Myös aineensiirtoon liittyvät seikat, kuten hapen ja ravinteiden saanti heikkenee sekoituksen heikentyessä ja viskoottisuuden noustessa.

Hajoamisen tuloksena glukoosin kulutus vähenee hetkellisesti, jolloin vasta-aineen tuotto pääsee kohoamaan jäljelle jäävissä soluissa.

Erot pieneen mittakaavaan saattavat johtua eroista lopullisissa solutiheyksissä.

Lopullisen pitoisuuden ollessa 850 ng/mL, on fermentoinnin 4L tilavuuteen tuotunut yhteensä ( $4000 \text{ mL} \cdot 850 \text{ ng/mL}$ ) 3,4 mg vasta-ainetta, kun taas vastaavalla vektorilla luotu 5A10-fab -linja kykenee tuottamaan jopa 60 mg per 4L (Pietilä 2012).



Alhaisesta tuottotasosta huolimatta, pienen mittakaavan kokeisiin perustuen, näyttäisi että normaali fermentoinnissa aiemmin käytetty 0,2 % glukoosipitoisuus olisi optimaalisin parametri.

Nopeaan solutiheyden nousuun voidaan mahdollisesti vaikuttaa pienemmällä indusointitiheydellä, jolloin lopullisen 6,5- 7,0 OD:n solutiheyden saavuttamiseen kuluisi pidempään. Ideaalisessa tilanteessa 4 tunnin kasvatuksessa solut saavuttavat maksimitiheyden vasta kasvatuksen loppuvaiheessa, jolloin hajoaminen olisi vähäisempää.

## LÄHTEET

Aittomäki E., Eerikäinen T., Leisola M., Ojamo H., Suominen I., Weymarn N. (2002) Bioprosessitekniikka. 1. painos, ss. 38-39, 57, 96, 125, 160-161. WSOY, Porvoo, Suomi

Baneyx, F. (1999) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. Current Opinion in Biotechnology 10:411-421

Farlex inc. Free dictionary, 2012, Batch reactor, [viitattu 15.11.12], saatavilla <http://encyclopedia2.thefreedictionary.com/batch+reactor>

Hannig G, Makrides S. C. (1998). Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*, Tibtech 16:54-60

Lee S.Y. (1996) High cell-density culture of *Escherichia coli*, Tibtech 14:98-105

Peltola M., (2012) Free prostate-specific antigen forms and kallikrein-related peptidase 2: tools for prostate cancer diagnosis. Väitöskirja. Annales Universitatis Turkuensis -sarja A1, osa 440. Turun Yliopisto, Turku.

Pietilä, P., (2012) Työkirja, Vasta-ainetuotot 2012, Turun Yliopisto, Turku.

Syöpäjärjestöt, 2009, Tietoa syövästä - Eturauhasen syöpä, [viitattu 19.11.12]. saatavilla <http://www.cancer.fi/tietoasyovasta/syopataudit/eturauhanen/>

Väisänen V., Eriksson S., Ivaska K., Lilja H., Nurmi M., Pettersson K. (2004) Development of sensitive immunoassays for free and total human glandular kallikrein 2, Clinical Chemistry 50:9 1607-1617

Väisänen V., Pettersson K., Alanen K., Viitanen T., Nurmi M. (2006) Free and total human glandular kallikrein 2 in patients with prostate cancer, Urology 68: 219-225 (2006)