



SOLUVILJELY HYDROGEELIALUSTOILLA

Maija Koskio

Anna Pirttiniemi

Opinnäytetyö
Lokakuu 2013
Bioanalytiikan
koulutusohjelma

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Bioanalytiikan koulutusohjelma

MAIJA KOSKIO & ANNA PIRTTINIEMI:
Soluviljely hydrogeelialustoilla

Opinnäytetyö 56 sivua, joista liitteitä 3 sivua
Lokakuu 2013

Tämän opinnäytetyön aihe saatiin Tampereen yliopiston biolääketieteellisen teknologian yksiköstä proteiinidynamiikan tutkimusryhmältä. Proteiinidynamiikan tutkimusryhmä selvittää proteiinien rakenteen merkitystä niiden toiminnassa ja vuorovaikutuksessa. Tutkimusta tehdään kokeellisilla ja laskennallisilla menetelmillä rekombinantti-DNA-tekniikkaa hyödyntäen.

Tämän kokeellisen tutkimuksen tarkoituksena oli kasvattaa elastisilla hydrogeelialustoilla soluja, joihin oli transfektoitu mutatoitu taliinigeeni. Hydrogeelialustat jäljittelevät ominaisuuksiltaan solujen luonnollisia kasvuolosuhteita elimistössä. Tutkimuksen tavoitteena oli tuottaa tutkimusryhmälle tietoa mutatoitun geenin vaikutuksesta solujen kasvuun, sekä kasvualustan fibronektiinipitoisuuden vaikutuksista solun kasvuominaisuuksiin. Tutkimuksessa pyrittiin vastaamaan kysymyksiin: Miten siirtogeeni vaikuttaa solujen kasvuun ja kiinnittymiseen verrattuna villityypin geeniin? Miten kasvualustan jäykkyys vaikuttaa solun kasvuun ja kiinnittymiseen? Vaikuttaako fibronektiinin pitoisuus solujen kasvuominaisuuksiin?

Fibronektiinin pitoisuuden vähentämisen mahdollisuutta selvitettiin valmistamalla hydrogeelialustat, joille kiinnitettiin kovalenttisesti fibronektiinia. Geelit värjättiin, mikroskopoitin ja valokuvattiin. Mikroskopoinnilla ja valokuvauksella nähtiin, että varsinkin suurilla fibronektiinin pitoisuuksilla proteiini paakkuuntuu hydrogeelialustalla. Tästä pääteltiin, että käytettävää fibronektiinipitoisuutta voidaan ja kannattaa pienentää.

Tutkimuksen toisessa vaiheessa villityypin soluja ja soluja, jotka tuottivat mutatoitua proteiinia, kasvatettiin kolmella jäykkyydeltään erilaisella alustalla. Fibronektiinipitoisuus valittiin alustoille vakioksi tutkimuksen ensimmäisen osan perusteella. Solut värjättiin fluoresoivalla värillä ja mikroskopoitin. Solut valokuvattiin mikroskoopilla, ja niiden pinta-ala mitattiin kuvankäsittelyohjelmalla. Mittauksen tulokset koottiin Excel-taulukoon. Tuloksien perusteella havaittiin, että mutatoitunut solut levittäytyvät kasvualustallaan keskimäärin villityyppiä nopeammin. Mutatoitunut Minital 4 -solut kasvoivat Tal+ -soluja suuremmiksi. Toisaalta solut levittäytyivät suuremmiksi kovemmalla kasvualustalla. Suurimmiksi kasvoivat lasilla kasvaneet Minital 4 -solut. Pienimmiksi jäivät 8/0.03 -hydrogeelillä kasvaneet Tal+ -solut.

Asiasanat: fibronektiini, hydrogeeli, taliini, soluviljely

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu
Tampere University of Applied Sciences
Degree Programme in Biomedical Laboratory Science

MAIJA KOSKIO & ANNA PIRTINIEMI:
Cell Culture on Hydrogel Surfaces

Bachelor's thesis 56 pages, appendices 3 pages
October 2013

The purpose of this study was to culture cells on fibronectin covered hydrogel substrate and to observe the behaviour of the cells. Cells were transfected with a plasmid encoding modified talin gene in order to evaluate its contribution on cellular adhesion on hydrogels. Another objective was to find out if changing the concentration of fibronectin used for hydrogel functionalisation and stiffness of hydrogel had an impact on cellular behaviour.

The experimental study was carried out at the Institute of Biomedical Technology at the University of Tampere. The first part of the study comprised of making three different hydrogels with varying concentrations of fibronectin. The optimal concentration was chosen to be used in the next part of the study. In the further study, mouse embryonic fibroblasts were transfected with mutant talin genes Tal+ and Minital 4. Cells were cultured on hydrogels with different stiffnesses and standard concentration of fibronectin. Glass surface served as a control. Finally the cells were immunostained and photographed using fluorescent microscope.

The results showed that the concentration of fibronectin could be reduced. The largest amount of fibronectin created clumps on the hydrogel. The lower the concentration, the smoother the hydrogel surface was. After culturing the cells their areas were measured with graphics software. These results point out that the cells prefer stiffer surfaces and the areas of the cells were larger on these surfaces. On the other hand, cells transfected with Minital 4 spread on larger areas than the cells transfected with Tal+.

Key words: fibronectin, hydrogel, talin, cell culture

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	6
2	SOLUADHEESIO.....	8
2.1	Ekstrasellulaarinen matriksi.....	8
2.2	Fibronektiini.....	9
2.3	Integriinit	10
2.4	Taliini.....	11
3	HYDROGEELIT	13
3.1	Hydrogeelien rakenne	13
3.2	Hydrogeelien bioteknologiset sovellukset	13
4	SOLUVILJELY.....	15
4.1	Adherentit solut ja niiden kasvualustat	15
4.2	Kasvatusmedium.....	15
4.3	Hiiren alkion fibroblastit.....	18
4.4	Transformaatio	18
4.5	Plasmidivektorin valmistus	19
4.6	Transfektio	20
5	OPINNÄYTETYÖN TAVOITE, TARKOITUS JA TUTKIMUSTEHTÄVÄT.....	21
6	MENETELMÄLLISET LÄHTÖKOHDAT	22
7	TUTKIMUKSEN SUORITUS.....	24
7.1	Hydrogeelien valmistus	24
7.2	Fibronektiinipitoisuuksien vertailu	26
7.3	Solujen kasvatus	27
7.3.1	MEF-solujen transfektio.....	28
7.3.2	Solujen siirrostus geeleille ja fiksaatio.....	29
7.3.3	Värjäys	30
7.3.4	Mikroskopointi.....	30
8	TULOKSET	32
8.1	Fibronektiinitestaus.....	32
8.2	Soluviljelyn tulokset	37
8.3	Solujen pinta-alat	46
9	POHDINTA.....	48
10	JOHTOPÄÄTÖKSET	50
	LÄHTEET.....	51
	LIITTEET	54
	Liite 1. Wangin protokolla	54
	Liite 2. Solujen pinta-alataulukko	56

LYHENTEET JA TERMIT

APS	Ammoniumpersulfaatti
APTES	(3-aminopropyli)trietoksysilaani
BSA	Bovine serum albumin (naudan seerumin albumiini)
DAPI	4',6-diamidino-2-fenyyli-indoli
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
ECM	Extracellular matrix (ekstrasellulaarinen matriksi)
FA	Fokaaliadheesio
FBS	Fetal bovine serum (naudan sikiön seerumi)
HEPES	4-(2-hydroksyylietyyli)-1-piperatsiinietaanirikkihappo
MEF	Mouse Embryonic Fibroblasts (hiiren alkion fibroblastit)
Minital 4	Taliinimutantti, josta puuttuu rod-domeeni
Opti-MEM	Reduced Serum Media (vähän seerumia sisältävä medium)
PBS	Phosphate buffered saline (fosfaattipuskuroitu saliini)
Sulfo-SANPAH	Sulfosuccinimidyyli 6-(4'-atsido-2'-nitrofenyyliamino) heksanoaatti
Tal+	Taliinimutantti
TEMED	N,N,N',N'-tetrametyylietyleenidiamiini

1 JOHDANTO

Hydrogeelit ovat polymeerejä, joita käytetään monissa farmakologisissa ja bioteknologisissa sovelluksissa. Hydrogeelit muistuttavat pehmeiden ominaisuuksiensa ja fysikaalis-kemiallisen muokkautuvuutensa ansiosta paljolti ihmisen kudosta, mikä mahdollistaa niiden monipuolisen käytön. Hydrogeeleillä on lukuisia biosovelluksia. Geelejä voidaan käyttää esimerkiksi solujen kasvualustana, johon voidaan lisätä erilaisia proteiineja. Proteiineilla on mahdollista vaikuttaa solun kasvuun, erilaistumiseen ja kiinnittymiseen alustalla.

Saimme opinnäytetyömme aiheen Tampereen yliopiston biolääketieteellisen teknologian yksikön (IBT) proteiinidynamiikan tutkimusryhmältä. Ryhmä tutkii proteiinien rakenteen merkitystä niiden toiminnassa ja vuorovaikutuksessa. Tutkimusta tehdään kokeellisilla ja laskennallisilla menetelmillä rekombinantti-DNA:lla tuotettuja proteiineja käyttäen.

Opinnäytetyömme on kokeellinen tutkimus, jossa selvitämme mutatoituneen taliinigeenin vaikutusta solujen kiinnittymiseen ja kasvamiseen. Vertaamme kasvua elastisilla hydrogeelialustoilla ja lasilla. Solut kiinnittyvät näihin pintoihin muodostamalla sidoksia kasvualustansa kanssa muun muassa integriinien välityksellä. Kiinnittyneissä soluissa integriinien havaitaan muodostavan useiden muiden proteiinien, kuten taliinin ja vinkuliinin, kanssa rakenteita, joita kutsutaan fokaaliadheesioiksi. Tutkimuksessamme otamme selvää taliinin geenin mutaation vaikutuksesta fokaaliadheesioiden muodotumiseen. Keskitymme erityisesti solujen kiinnittymisen alkuvaiheeseen, jossa fokaaliadheesioita aletaan vasta muodostaa. Selvitämme opinnäytetyössämme myös hydrogeelin pinnointukseen käytettävän fibronectiinin optimaalista pitoisuutta. Hydrogeelit käsitellään fibronectiinilla, joka tässä tutkimusasetelmassa tarjoaa soluille sidekudosta muistuttavan ympäristön.

Käytämme tutkimuksessamme hiiren alkion fibroblastisoluja (MEF), jotka on saatu Wolfgang Zieglerin tutkimusryhmältä Saksasta. MEF-solut ovat käyttöominaisuuksiltaan monipuolisia ja ne on mahdollista saada erilaistumaan kasvutekijöitä säätelemällä.

Opinnäytetyöllämme tuotamme tutkimusryhmän käyttöön tietoa fibronektiinin ominaisuuksista, optimaalisesta pitoisuudesta ja taliinigeenin mutantin ominaisuuksista sekä solujen alustaan kiinnittymisen alkuhetkistä.

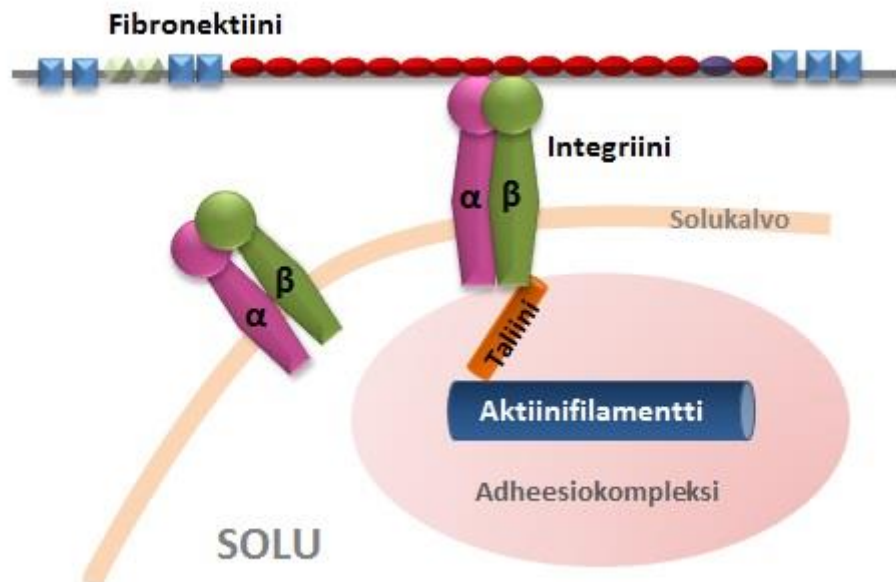
2 SOLUADHEESIO

2.1 Ekstrasellulaarinen matriksi

Ekstrasellulaarinen matriksi (ECM) eli solun ulkoinen väliaine muodostaa tukiverkoston, jonka avulla solujen uskotaan viestivän toistensa kanssa. Lisäksi monet solujen väliset tapahtumat tapahtuvat ekstrasellulaarisessa matriksissa. ECM liittyy solut toisiinsa kudoksissa ja myös ohjaa solujen liikkumista haavojen parantumisessa ja sikiön kehityksen aikana. (Gao 2006.)

ECM muodostuu kaikesta solujen membraanin ulkopuolelle jäävästä materiaalista. Siinä on solujen tarvitsemia rakenteita ja ravinteita. Eläimillä ekstrasellulaarisessa matriksissa kulkevat verisuonet, jotka kuljettavat muun muassa ravinteita ja happea. Ravinteet ja happi siirtyvät verisuonten seinämien läpi ekstrasellulaariseen matriksiin, josta solut saavat sen käyttöönsä. Ekstrasellulaarisessa matriksissa on runsaasti kuitumaisia proteiineja, joita ympäröivät polysakkaridit. Omilla tukirakenteillaan solut liittyvät näihin proteiineihin ja saavat tätä kautta tarttumispinnan. (Cooper & Hausman 2004, 522.)

Solut kiinnittyvät ekstrasellulaariseen matriksiin kahdella eri mekanismilla: hemidesmosomien ja fokaaliadheesioiden (FA) avulla. Fokaaliadheesioita muodostuu erityisesti fibroblastisoluissa. Fokaaliadheesiossa liitos solun ja ympäristön kanssa tapahtuu tiettyjen proteiinien avulla. Transmembraaninen integriini liittyy ekstrasellulaarisen matriksin fibronektiiniin ja solutukirangan aktiinifilamentit, taliini, vinkuliini ja aktiini liittyvät integriiniin. (Cooper & Hausman 2004, 444, 526, 528.) Fokaaliadheesioita kaavakuva on esitetty kuvassa 1.

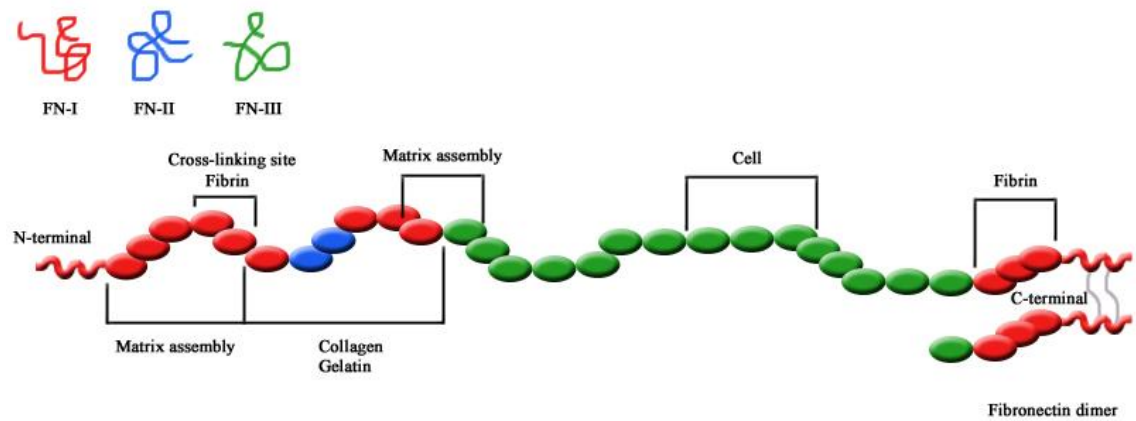


KUVA 1. Fokaaliadheesio (Gao 2006, muokattu)

2.2 Fibronectiini

Fibronectiini on ekstrasellulaarisen matriksin proteiini, joka auttaa soluja kiinnittymään soluväliaineeseen. Fibronectiinia koodittaa yksi geeni, mutta vaihtoehtoisen silmukoinnin ansiosta proteiinista on olemassa noin 20 eri muotoa. (Lodish ym. 2008, 830.) Fibronectiini voi esiintyä plasmassa liukoisena, mutta suurin osa fibronectiinin muodoista on säiemäisiä ja liukenemattomia (Alberts ym. 2002, 1104).

Rakenteeltaan fibronectiini on dimeeri glykoproteiini, joka koostuu kahdesta suuresta disulfididisidoksin liittyneestä alayksiköstä. Alayksiköt ovat laskostuneet erillisiksi polypeptidiketjujen erottamiksi domeeneiksi, jotka ovat toiminnallisesti riippumattomia alueita. Polypeptidiketjut muodostuvat 2500 aminohaposta. (Alberts ym. 2002, 1103; Cooper & Hausman 2004, 526.) Fibronectiinissä on kolme erilaista domeenia: FN-I, FN-II ja FN-III. FN-I ja FN-II koostuvat 45 osasta ja FN-III 90 osasta (Pollard & Earnshaw 2004, 500). Solun sisäiset proteiinit tunnistavat fibronectiinista erillisen rakenteen, mikä avulla kiinnittyminen tapahtuu (Cooper & Hausman 2003, 526). FN-III domeenissa on niin kutsuttu RGD-sekvenssi, jolla fibronectiini sitoutuu integriiniin (Pollard & Earnshaw 2004, 500). Fibronectiinin rakennetta ja kiinnittymisalueita on esitetty kuvassa 2.



KUVA 2. Fibronektiinin rakenne Pollard ja Earnshaw (2004) mukaan

Fibronektiini auttaa soluja kiinnittymään ekstrasellulaariseen matriksiin sitoutumalla solun ja ECM:n proteiinien välille. Fibronektiinilla on keskeinen vaikutus solujen muotoon, liikkumiseen sekä tukirangan muodostumiseen. Säännöstelemällä sitoutumista fibronektiiniin solut voivat toisaalta rakentaa ympäristönsä tarpeitaan vastaaviksi. (Lodish ym. 2008, 831.) Jos fibronektiinia ei syntetisoidu alkionkehityksen aikana, alkio kuolee varhaisessa vaiheessa, sillä endoteelisolut eivät kykene muodostamaan verisuonia (Alberts ym. 2002, 1105).

2.3 Integriinit

Integriinejä esiintyy jokaisen tumallisen solun pinnalla. Ne ovat transmembraanisia proteiineja eli ne ovat kosketuksissa sekä ECM:n että sytoplasman kanssa. (Calderwood, Shattil & Ginsberg 2000.) Integriinit ovat välttämätön osa solujen välistä viestintää ja solujen kiinnittymistä ekstrasellulaariseen matriksiin (Pollard & Earnshaw 2004, 515; Barczyk, Carracedo & Gullberg 2010). Integriinit osallistuvat kaikkeen solujen kiinnittymiseen, kuten esimerkiksi siittion kiinnittymiseen munasolun pinnalle (Pollard & Earnshaw 2004, 515). Integriinit osallistuvat myös viestintään, jota käydään solusta ulos ja sisälle soluun. Konformaation muutokset saavat ulkoa sisälle tapahtuvat viestintäketjut aktivoitumaan. Näin tapahtuu esimerkiksi, kun integriini muodostaa sidoksen toisen proteiinin kanssa. Millaisia viestejä integriini kuljettaa, riippuu solusta ja muista solussa olevista viestintäkanavista. (Barczyk, Carracedo & Gullberg 2010.)

Integriinien toiminnallinen osa on rakentunut heteromeerisesti kahdesta erilaisesta alayksiköstä α ja β . Integriineja tutkittaessa on havaittu, että erilaisia α -alayksiköitä on 18 ja β -alayksiköitä 8. Nämä voivat järjestäytyä 24 erilaiseksi heterodimeeriksi. Koska vaihtoehtoinen silmukointi lisää isoformisten integriinien monimuotoisuutta, on mahdollista, että erilaisia integriineja on jopa 128. Tämän ansiosta hyvin monet erilaiset ligandit kykenevät tarttumaan integriiniin. (Pollard & Earnshaw 2004, 515.) Integriinin α -yksikössä on niin kutsuttu MIDAS-alue (metal ion dependent adhesion site), joka muodostaa sidoksen ligandin kanssa. β -alayksikössä puolestaan on ADMIDAS-alue, joka on lähellä MIDAS-aluetta. Tripeptidisidoksen muodostukseen tarvittava kationi tarttuu ADMIDAS-alueelle. (Barczyk, Carracedo & Gullberg 2010.)

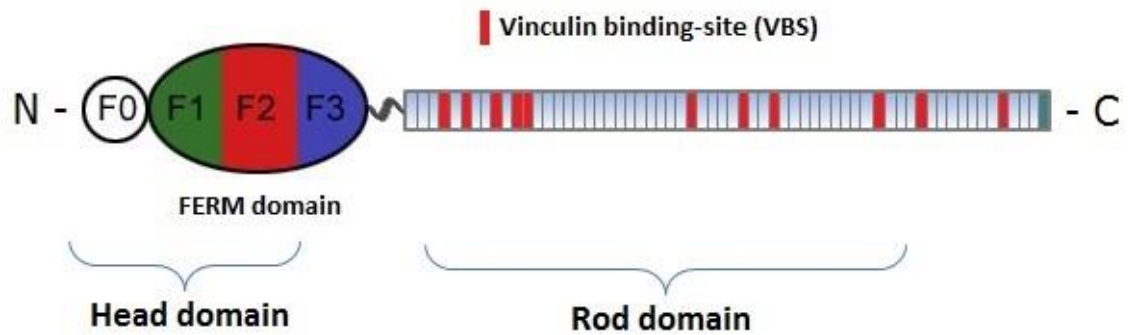
Integriinit sitoutuvat ECM:n proteiinien lyhyisiin aminohappoketjuihin, joita on esimerkiksi kollageenissa, laminiinissa ja fibronektiinissa (Cooper & Hausman 2004, 527). Fibronektiinin ja integriinin välille muodostuu tripeptidisidos. Tripeptidisidos on vahva sidos, jonka muodostumiseksi integriinit tarvitsevat kahdenarvoisia kationeja. (Gao 2006.) Integriinin ominaisuuksiin kuuluu, että se voi muodostaa sidoksia useiden ekstrasellulaarisen matriksin proteiinien kanssa ja sama proteiini voi sitoutua integriiniin useisiin kohtiin. Fibronektiini esimerkiksi sitoutuu ainakin yhdeksään eri kohtaan integriinissä. On havaittu, että ainakin integriinin $\alpha 5 \beta 1$ -isoformi liittyy fibronektiiniin. Integriinien affiniteetti ligandeihin ei ole kovin voimakas, vaan dynaaminen. Nopea sidoksen muodostus ja katkaiseminen mahdollistaa solujen liikkumisen ECM:ssä. (Pollard & Earnshaw 2004, 515.)

Integriinit eivät ole jatkuvasti aktiivisia, vaan siirtyvät matalalta sidoksen muodostustasolta korkealle tasolle (low/high ligand-binding affinity state) ulkoisen tekijän aiheuttaman konformaatiomuutoksen ansiosta. Muutoksen voi saada aikaan joko sytoplasmisen tai ekstrasellulaarisen vuorovaikutus. (Gao 2006.) Solun ja ECM:n proteiinit, kuten taliini, kindliini, filamiini, migfiliini, FAK ja ILK saavat integriinin muuttamaan konformaatiotaan (Barczyk, Carracedo & Gullberg 2010).

2.4 Taliini

Integriinit liittyvät solutukirangan aktiinifilamentteihin spesifisillä proteiineilla. Yksi näistä proteiineista on taliini. Taliini on vinkuliinin ja aktiinin lisäksi osa solun fokaa-liadheesiota eli solujen tukirankaa ja kiinnittymismekanismeja. Taliini koostuu pie-

nemmästä N-terminaalisesta head-domeenista ja suuremmasta C-terminaalisesta rod-domeenista. (Critchley & Gingras 2008, 1345–1347.) Calderwood, Shattil ja Ginsberg (2000) esittävät, että taliinin rod-domeenissa sijaitisivat sen aktiiniin sitoutuvat kohdat. Integriinissä taliini sitoutuu sytoplasmassa sijaitseviin $\beta 1$, $\beta 2$ ja $\beta 3$ alayksiköihin ja heikommin alayksikköön $\beta 7$. Taliinin rakenne on esitetty kuvassa 3.



KUVA 3. Taliinin rakenne (Critchley & Gingras 2008, muokattu)

3 HYDROGEELIT

3.1 Hydrogeelien rakenne

Geelit muodostuvat polymeerien verkosta, joka pitää sisällään suurta määrää väliainetta. Hydrogeeleissä tämä väliaine on vesi. Polymeerin rakenteesta riippuu, kuinka suuren määrän väliainetta se kykenee sitomaan itseensä. Veden sitoutumisen mahdollistaa polymeerin ionivaraus. (Rodriguez, Cohen, Ober & Archer 2003, 89–90.)

Tavallinen bioteknisissä sovelluksissa käytettävä geeli on polyakryyliamidi (PAA), jonka väliaine on aina vesi (Rodriguez ym. 2003, 252). Polyakryyliamidi valmistetaan polymeroimalla akryyliamidia ($C_3H_3ONH_2$) bisakryyliamidin kanssa. Polymerisaatio käynnistetään ammoniumpersulfaatilla (APS), ja reaktiota kiihdytetään N,N,N',N'-tetrametyylietyleenidiamiinilla (TEMED). (Yang 2007, 29.) Akryyliamidi on karsinogeeni, jota syntyy muun muassa ruoan kypsennyksen sivutuotteena. Teollisesti sitä valmistetaan polyakryyliamidin valmistusta varten. Polyakryyliamidi on kuitenkin vaaraton. (WHO: Acrylamide 2012.) Akryyliamidi polymeroituu spontaanisti kuumassa vesiliuoksessa vapauttaen runsaasti lämpöä. Polymeroituminen tapahtuu hitaasti UV-valossa. Akryyliamidi on erittäin myrkyllistä ja saattaa aiheuttaa syöpää ja perimävaurioita, minkä takia sen käsittelyssä on noudatettava erityistä varovaisuutta. (Työterveyslaitos: Onnettomuuden vaaraa aiheuttavat aineet: Akryyliamidi 2011.)

Geelin valmistaminen on helppoa, ja valmistukseen voidaan käyttää laajaa valikoimaa erilaisia luonnollisia ja synteettisiä materiaaleja. Materiaalien runsaus tarjoaa paljon mahdollisuuksia geelin rakenteen kemialliseen muokkaamiseen. Geelin viskositeettia ja jäykkyyttä on helppo säädellä, ja tarvittaessa geelistä saadaan biohajoava. Soluviljelyssä solujen kiinnittymisen kannalta on tärkeää, että hydrogeeliä voidaan myös muokata siten, että se sisältää soluadheesiassa tarvittavia proteiineja. (Tibbitt & Anseth 2009.)

3.2 Hydrogeelien bioteknologiset sovellukset

Elastisia hydrogeelejä käytetään runsaasti lääketieteellisissä sovelluksissa. Hydrogeeli jäljittelee pehmeiden ominaisuuksiensa ja fysikaalis-kemiallisen muokkautuvuutensa

ansioista paljolti ihmisen kudosta. Geeli reagoi pH:n ja lämpötilan muutoksiin sekä elektrolyyttien läsnäoloon (Gulrez, Al-Assaf & Phillips 2011, 119). Suuri vesipitoisuus geelissä mahdollistaa esimerkiksi ravinto- ja kuona-aineiden kuljetuksen sekä solujen kasvun kolmiulotteisesti (Fisher 2009). Myös hapen ja liukoisten aineiden kuljetus hydrogeelissä on sujuvaa (Tibbitt & Anseth 2009).

Lääketeollisuudessa hydrogeeliä on käytetty hyväksi esimerkiksi lääkkeenkuljetuksessa ja haavanhoidossa. Ympäristöönsä mukautumisen ansiosta hydrogeeliä voidaan käyttää kuljettamaan lääkeaine esimerkiksi tiettyyn kohde-elimeen, ja saada aine vapautumaan diffuusion avulla. (Pal, Banthia & Majumdar 2009, 213.) Haavanhoidossa hydrogeelillä luodaan suojapinta haavan päälle, jolloin alla olevan kudoksen paraneminen nopeutuu, eikä tapahdu arpeutumista. Vaikeiden palovammapotilaiden hoidossa on hyödytty suuresti hydrogeelien käytöstä. Geeli on immunologisesti reagoimatonta materiaalia ja säännöstelee haavan pinnalta tapahtuvaa nesteiden vaihtoa. Hydrogeeli voi toimia pääasiallisena siteenä pinnallisessa ja tasaisessa haavassa. Tällöin hydrogeelisivettä pidetään haavan päällä 4–7 päivää. Syvien haavojen hoidossa hydrogeeli voi toimia tukirakenteena ja täyteenä haavassa. (Murphy, Skardal & Atala 2012.)

Kudosteknologiassa hydrogeelistä on mallinnettu implantteja palauttamaan elimen toimintakyky. Uuden kudoksen luomisessa huokoista hydrogeeliä käytetään tukialustana, johon laitetaan potilaan soluja. (Pal, Banthia & Majumdar 2009.) Hydrogeeliä on kyetty hyödyntämään myös nopeasti yleistyvässä 3D-tulostuksessa, jossa polymeeristä voidaan suunnitella esimerkiksi keinosuonia ja -ihoja (Aalto-yliopisto 2013). 3D-tulostuksessa solut ja biomateriaali tulostetaan haluttuun järjestykseen kerros kerrokselta pyrkien anatomisesti oikeanlaisiin rakenteisiin. Tavoitteena on tulevaisuudessa luoda kokonaisia elimiä 3D-mallinnusta hyväksikäyttäen, ja näin tuoda myös helpotusta elinluovuttajapuolaan (Murphy, Skardal & Atala 2012). Tulevaisuudessa keinoihon käytöllä pyritään korvaamaan myös farmasia- ja kosmetiikkateollisuudessa käytettävät eläinkokeet. (Aalto-yliopisto 2013.)

4 SOLUVILJELY

4.1 Adherentit solut ja niiden kasvualustat

Suurin osa soluista tarvitsee jonkinlaisen alustan kasvaakseen. Tällaiset solut eivät kykene jakautumaan tai elämään, jos niillä ei ole alustaa, jolle kiinnittyä. On todettu, että solut tarttuvat normaalin elinympäristönsä ulkopuolella lasialustaan tai tiettyihin muovimateriaaleihin, joissa on heikko negatiivinen varaus. Tästä syystä soluviljelyssä käytettävät alustat on käsitelty elektronipurkauksella tai korkeaenergisellä ionisoivalla säteilyllä. (Freshney 2005, 31.)

Solutyypistä riippuu, kuinka tarkka se on kasvualustansa suhteen. Fibroblastisolut ja fibroblastin kaltaiset solut kiinnittyvät hyvin käsitellylle lasi- tai muovialustalle. Lymfosyytin kaltaiset solut eivät tarvitse lainkaan kiinnittymispintaa. On kuitenkin soluja, jotka edelleen tarvitsevat spesifisempiä tukirakenteita. Esimerkiksi epiteelisolut tarvitsevat elääkseen liitoksia solujen välillä. Tästä syystä ne kasvavat mielellään toisten solujen päällä. (Freshney 2005, 31.)

Geelimäiset kasvualustat tarjoavat usein soluille hyvän kasvualustan, koska pehmeä pinta muistuttaa hyvin paljon niiden todellista kasvualustaa ja jäljittelee ominaisuuksiltaan ekstrasellulaarista matriksia. Solun kiinnittymiseen alustaansa vaikuttavat ECM:n proteiinit, eli soluviljely-ympäristössä tärkeimmät tekijät ovat kasvatusmediumiin laitetut proteiinit. (Freshney 2005, 31.)

4.2 Kasvatusmedium

Kaupallisesti on saatavilla lukuisia erilaisia kasvatusmediumeita, joissa jokaisessa on omat erityispiirteensä. Tietyille soluille sopivat vain tietynlaiset kasvuolosuhteet, joten oikean mediumin ja muiden kasvuolosuhteiden valinta on tärkeää. Usein kasvatettavat solulinjat ostetaan. Tällöin myyjällä on yleensä suositella soluille tiettyjä olosuhteita ja kasvatusmediumia.

Suurin osa soluista kasvaa hyvin, kun pH on 7,4. Fibroblastit kasvavat parhaiten, kun pH on 7,4–7,7. Useimmiten mediumiin on lisätty pH-indikaattori, joka värimuutoksella ilmoittaa, mikäli pH muuttuu. Yleisin indikaattori on fenolipuna, koska se on keltainen pH 6,5:ssä, oranssi pH 7,0:ssa ja punainen pH 7,4:ssä. Kun pH nousee yli 7,6, väri muuttuu vaaleanpunaiseksi ja pH 7,8:ssa purppuraiseksi. Jotta pH:n muutoksia kuitenkin tapahtuisi mediumissa mahdollisimman vähän, on usein tarpeen käyttää jonkinlaista puskuriliuosta. Yleinen puskuri on esimerkiksi HEPES tai bikarbonaattipuskuri. (Freshney 2005, 115.)

Hiilidioksidin ja hapen suhde vaihtelee solulinjasta riippuen. Usein solut kuitenkin suosivat olosuhteita, joissa hiilidioksidipitoisuus on noin 5 %. Hiilidioksidia ja happea liukenee kasvatusmediumiin, ja mediumin kemikaalit vaikuttavat tähän liukenemiseen. Lämpökaapin hiilidioksidipitoisuuden säätelyllä voidaan pitää olosuhteita vakioituina. (Freshney 2005, 116.)

Mediumiin lisätään sellaisia komponentteja, joita solut eivät kykene tuottamaan itse aineenvaihdunnallaan. Mediumiin lisätään vaihteleva määrä vitamiineja, kuten A-, D-, E- ja K-vitamiineja. Solut eivät myöskään kykene tuottamaan kaikkia aminohappoja itse. Tällaisia ovat erityisesti arginiini, glutamiini, tyrosiini ja kysteiini. Myös elektrolyyttien pitoisuus vaihtelee mediuumeissa. Elektrolyyteillä on mahdollista hallita mediumin pH:ta ja hiilidioksidipitoisuutta, ja ne ovat osa solun viestintää ja kiinnittymistä alustaansa. (Freshney 2005, 122–123.)

Solut käyttävät aineenvaihduntansa energialähteenä hiilihydraatteja, joten ne ovat välttämätön osa mediumia. Mediumista riippuen käytetyt hiilihydraatit vaihtelevat, glukoosi on kuitenkin yleisin. Erilaiset orgaaniset yhdisteet ovat myös tarpeellisia aineenvaihdunnalle. Mediumiin voidaan lisätä vaihteleva määrä pyruvaatteja, lipideitä ja proteiineja sekä hormoneita. (Freshney 2005, 123.)

Antibiootteja lisätään kasvatusmediumiin estämään bakteereiden kasvu. Bakteerit kasvavat eukaryoottisoluja nopeammin ja olosuhteet ovat myös niiden kasvulle edulliset. Jos bakteerit pääsevät kasvamaan vapaasti, ne täyttävät kasvatusmaljan ja käyttävät mediumin ravintoaineet. Bakteerit saattavat myös infektoida kasvatettavat solut ja muuttaa niiden ominaisuuksia. Kaikki eivät suosi antibiootteja soluviljelyssä, koska niiden on

omalta osaltaan epäilty vaikuttavan solujen ominaisuuksiin. Kuitenkin tällöin on huolehdittava erityisesti työskentelyn aseptiikasta. (Freshney 2005, 123.)

Kasvatusmediumin viskositeettia säädellään pitkälti siihen lisättävän seerumin avulla. Erityisen merkittävää viskositeetti on, kun solut irrotetaan kasvualustastaan trypsiinikäsittelyllä. Irronneet solut ovat herkkiä, jolloin viskoosimpi medium suojelee soluja paremmin kuin liuos, jossa ei ole seerumia ollenkaan. (Freshney 2005, 119.)

Seerumi sisältää valmiiksi monia tarpeellisia proteiineja, kasvutekijöitä ja solujen jakautumista edistäviä tekijöitä, lipideitä, mineraaleja ja hormoneita. Kun kasvatusmediumissa on seerumia, useita tarvittavia kasvutekijöitä ei tarvitse erikseen lisätä. Tavallisimmin käytetyt seerumit ovat vasikan, naudan sikiön, aikuisen hevosen ja ihmisen seerumit. Vasikan seerumi (CS) ja naudan sikiön seerumi (FBS) ovat parhaimmat, koska ne sopivat myös useimmille vaativimmille solulinjoille. Ihmisen soluja kasvatettaessa ihmisen seerumi on paras. Ihmisen seerumi täytyy kuitenkin tutkia HI-viruksen ja hepatiittivirusten varalta ennen sen käyttöä. (Freshney 2005, 123.)

Vaikka seerumi on usein hyödyllinen kasvatusmediumissa, sillä on myös monia huonoja puolia. Seerumien koostumus vaihtelee, koska yhdestä luovuttajasta ei saada seerumia kuin vain tietty määrä. Jokaisen luovuttajan seerumi on aina erilaista. Vaikka seerumin ominaisuudet tunnetaan varsin hyvin, se voi kuitenkin sisältää aineita, joilla voi olla vaikutusta solujen kasvuun. Näistä syistä jokaisen laboratorion on seerumierän vaihtuessa testattava uutta seerumia ja sen ominaisuuksia ennen varsinaista käyttöönottoa. Eri solulinjat saattavat myös vaatia eri seerumierät. Vaikka seerumit kerätään terveiltä luovuttajilta ja niitä tutkitaan valmistusvaiheessa, voi seerumi silti aiheuttaa soluviljelmään kontaminaation. Nimenomaan seerumi mahdollistaa myös ulkopuolisten mikrobien kasvun viljelmässä. (Freshney 2005, 125–134.)

Seerumiton medium on seerumillista parempi vaihtoehto silloin, kun halutaan käyttää selektiivisiä kasvuominaisuuksia. Kun seerumia ei ole, solut lopettavat jossain vaiheessa jakautumisen, eikä viljelmä voi ylikasvaa. Seerumitonta mediumia käytettäessä on kuitenkin muistettava huolehtia solujen riittävästä proteiinien ja ravinteiden saannista muilla keinoilla. (Freshney 2005, 134.)

4.3 Hiiren alkion fibroblastit

Hiiren alkion fibroblastit (mouse embryo fibroblast, MEF) ovat yksi tavallisimmista tutkimuskäytössä olevista soluista. Niiden käyttökelpoisuus johtuu siitä, että MEF-solut on mahdollista saada erilaistumaan kasvuolosuhteita muuttamalla esimerkiksi luo-, lihas- tai hermosoluiksi. Haluttaessa on myös mahdollista tiettyjä kasvutekijöitä muuttamalla estää solujen erilaistuminen fibroblastiasteelta. (Freshney 2005, 419.)

4.4 Transformaatio

DNA:n saattamista bakteerisolun sisään kutsutaan transformaatioksi. Tällöin bakteerisolu ottaa sisäänsä vierasta DNA:ta ja sen geenit alkavat periytyä seuraaville bakteerisukupolville. Tätä tapahtumaa ei saa sekoittaa eläinsolujen transformaatioon, joka viittaa solun kasvuominaisuuksien muuttumiseen. Kun eläinsolun sisään laitetaan ulkopuolista DNA:ta, kutsutaan sitä transfektioksi. (Glick & Pasternak 2003, 165.)

Kun bakteerisolu kykenee ottamaan sisäänsä ulkopuolista DNA:ta, bakteeria sanotaan kompetentiksi. Monet bakteerit ovat luonnostaan kompetentteja tai muuttuvat kompetenteiksi, kun ravintoa on niukasti. Kompetenssi voidaan saada aikaan myös käsittelemällä soluja kemiallisesti tai sähköisesti. Kemiallisessa käsittelyssä bakteerit upotetaan kylmään CaCl_2 -liuokseen. Tämän jälkeen solut säilytetään jäisinä ennen käyttöä. Kun DNA halutaan laittaa solun sisään, soluille annetaan lämpöshokki siirtämällä ne jäistä $42\text{ }^\circ\text{C}$:een 2 minuutiksi. Tämä käsittely tekee soluseinään aukkoja, joiden kautta DNA pääsee solun sisään. (Glick & Pasternak 2003, 60.)

Transformaatio on herkille soluille koettelemus eikä suurin osa niistä selviä hengissä käsittelystä. Hengissä selvinneistä soluistakin vain osa on ottanut DNA:ta sisäänsä. Transformaation onnistumista kuvaavat transformaatiofrekvenssi ja transformaatiotehokkuus. Transformaatiofrekvenssi kertoo, kuinka suuri osa käsitellyistä bakteerisoluisista on transformoitunut. Transformaatiotehokkuus puolestaan kuvaa syntyneiden transformanttien määrää suhteessa käytetyn DNA:n määrään. Tavallisesti noin 1 % soluista on ottanut sisäänsä halutun DNA-pätkän ja selvinnyt hengissä. (Glick & Pasternak 2003, 60.)

Tavallisesti transformantit halutaan erottaa soluista, jotka eivät ottaneet sisään­sä toivot­tua DNA:ta. Tämä voidaan toteuttaa esimerkiksi antibioottiresistenssillä. Transformoi­tuun DNA-ketjuun on laitettu mukaan antibioottiresistenssin geeni. Kun bakteereita viljellään maljalla, jossa on antibioottia, vain transformantit jäävät eloon. (Glick & Pas­ternak 2003, 61.)

4.5 Plasmidivektorin valmistus

Plasmidit ovat lyhyitä renkaanmallisia kaksijuosteisia DNA-ketjuja, joita esiintyy nor­maalisti bakteerisolulla, hiivoilla ja muutamilla eukaryootisolulla. Plasmidit eivät ole liitoksissa kromosomaalisen DNA:n kanssa, vaan sijaitsevat itsenäisinä sytoplasmassa. Plasmidien koko voi vaihdella muutamasta kiloemäsparista (kb) jopa sataan kiloemäs­pariin. Plasmidi-DNA kahdentuu kromosomaalisen DNA:n tavoin aina ennen soluja­kautumista. (Lodish ym. 2000.)

Kaupallisesti on saatavilla *E.coli*-bakteereita, joiden plasmideita on muokattu vektori­valmistukseen sopiviksi. Tällaiset plasmidit ovat vain noin 3 kb pituisia. Tämä mahdol­listaa pitkienkin rekombinantti-DNA-jaksojen lisäämisen vektoriin. Näihin plasmideihin on jätetty vain tärkeimmät alueet: niin kutsuttu ori-alue, antibioottiresistenssin geeni sekä restriktioentsyymien tunnistusalue. Ori-alueelta alkaa DNA:n replikaatio soluja­kautumisessa. Antibioottiresistenssin geeniä hyödynnetään transformaation toteamises­sa. Transformoituja bakteereita kasvatetaan elatusaineessa, jossa on antibioottia. Antibi­oottina voidaan käyttää esimerkiksi ampisilliinia tai kanamysiinia. Solut, joihin antibi­oottiresistenssin geeni on transformoitu, selviävät antibiootin läsnä ollessa, kun taas bakteerit, joissa resistenssin geeniä ei ole, menehtyvät. (Lodish ym. 2000.)

Restriktioentsyymien tunnistusalueelle liitetään halutut rekombinantti-DNA-jaksot. Ha­luttu rekombinantti-DNA katkaistaan restriktioentsyymillä, joka tunnistaa tietyn alueen DNA:sta. Samalla entsyymillä katkaistaan myös plasmidi. Koska plasmidi ja rekombi­nantti on katkaistu samalla entsyymillä, niiden katkaisupäät ovat samanlaiset. Rekombi­nantti-DNA:n ja plasmidin yhteenliittäminen tapahtuu ligaasientsyymien avulla. Li­gaasientsyymien tehtävä on normaalisti korjata solussa tapahtuvia DNA:n katkeamisia. DNA-tekniikassa tämä ominaisuus on otettu hyötykäyttöön. Kun rekombinantti-DNA:ta

ja katkaistua plasmidia inkuboidaan ligaasientsyymien läsnä ollessa, rekombinantti saadaan liitettyä plasmidiin. (Lodish ym. 2000.)

4.6 Transfektio

Kun laitetaan vierasta DNA:ta eläinsolun sisään, puhutaan transfektioista (Glick & Pasternak 2003, 165). Transfektiossa soluja on käsiteltävä ensin niin, että vieraan DNA:n saattaminen solun sisään helpottuu. Solukalvo saadaan läpäiseväksi permeabilisoinnilla, jossa solut altistetaan solukalvoa läpäiseville lipideille. Vaihtoehtoinen tapa on antaa soluille lyhyt sähköshokki, joka tilapäisesti tehostaa solun kykyä ottaa sisäänsä vierasta DNA:ta. Tekniikkaa kutsutaan elektroporaatioksi. Myös viruksia käytetään DNA:n siirtämisessä; viruksiin voidaan laittaa haluttua DNA:ta ja tämän jälkeen käyttää niitä infektoimaan halutut solut rekombinantti-DNA:lla. (Lodish ym. 2008, 196.) Solujen transfektioinnissa on myös mahdollista hyödyntää solun ominaisuuksia, kuten esimerkiksi fagosytointia. Tätä keinoa hyödynnetään tutkimuksessa käytetyssä Thermo Scientificin -transfektio-reagenssissa. (Thermo Scientific 2013.)

Transfektio on joko väliaikainen tai pysyvä. Transientissa transfektiossa solun sisäänsä ottama vieras DNA ei periydy tytärsoluille. Mikäli vieras DNA liittyy isäntäsolun genomiin ja näin ollen siirtyy tytärsoluille, on kyseessä stabiili transfektio. (Lodish ym. 2008, 196.)

5 OPINNÄYTETYÖN TAVOITE, TARKOITUS JA TUTKIMUSTEHTÄVÄT

Opinnäytetyön tarkoituksena on kasvattaa soluja elastisella kasvualustalla ja seurata niiden käyttäytymistä. Soluihin on transfektoitu mutatoitu taliinin geeni, joka mahdollisesti vaikuttaa niiden käyttäytymiseen erilaisilla hydrogeelialustoilla. Tavoitteena on tuottaa tutkimusryhmälle tietoa mutatoituneen geenin vaikutuksesta solun kasvuun sekä fibronectiinin ja hydrogeelialustan osuudesta solun kiinnittymisessä. Tuottamaamme tietoa tutkimusryhmä voi jatkossa hyödyntää tutkimuksissaan. Tutkimusryhmä saa työmme tuloksista myös taloudellista hyötyä, mikäli fibronectiinipitoisuutta on mahdollista vähentää.

Tutkimustehtävät:

1. Vaikuttaako fibronectiinin pitoisuus solujen kasvuominaisuuksiin?
2. Miten siirtogeneeni vaikuttaa solujen kasvuun ja kiinnittymiseen verrattuna villityypin geeniin?
3. Miten kasvualustan jäykkyys vaikuttaa solun kasvuun ja kiinnittymiseen?

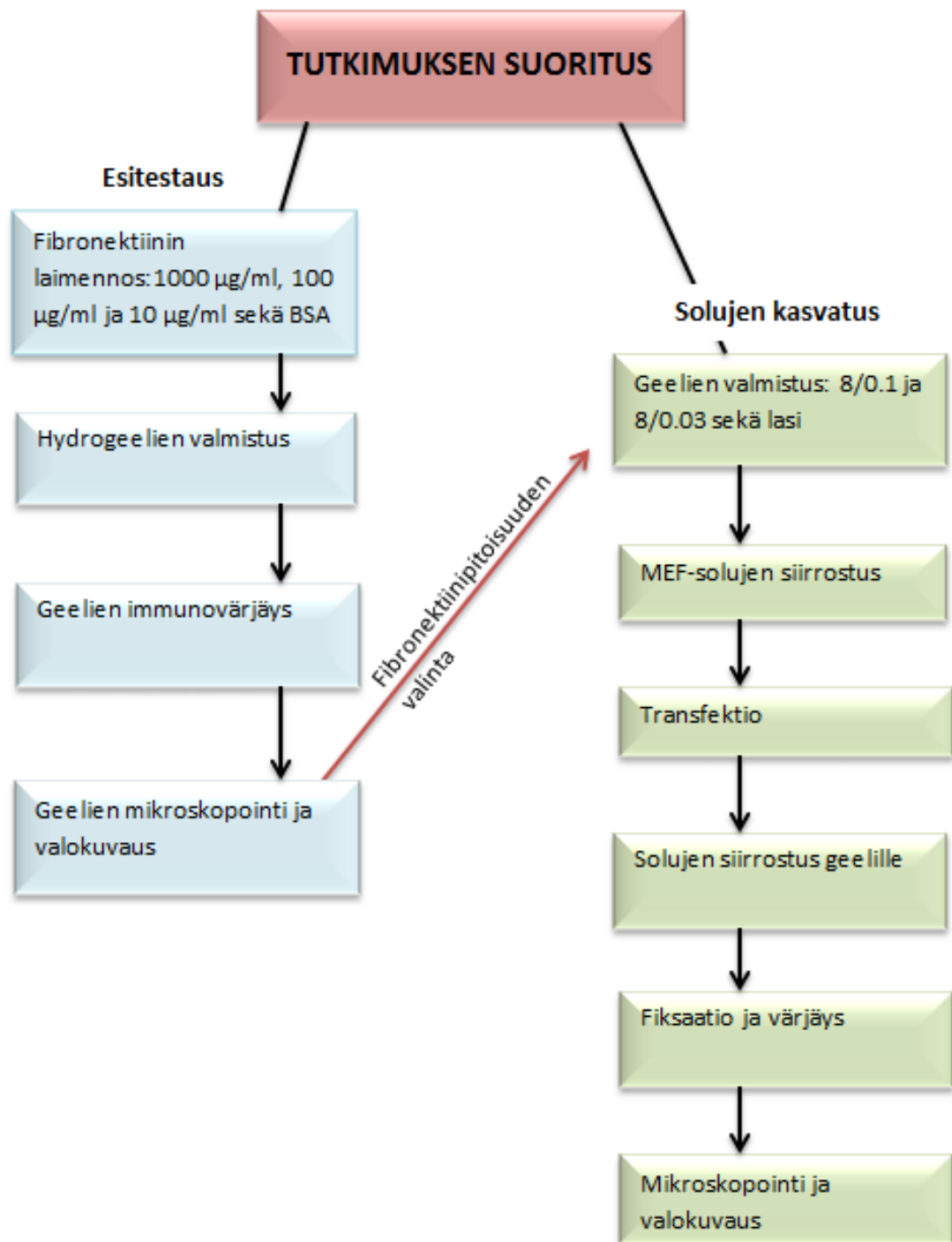
6 MENETELMÄLLISET LÄHTÖKOHDAT

Tämä opinnäytetyö on kokeellinen tutkimus. Kokeellisessa eli eksperimentaalisessa tutkimuksessa mitataan yhden käsiteltävän muuttujan vaikutusta toiseen muuttujaan. Tyypillisiä piirteitä tutkimukselle ovat näytteen analysointi erilaisissa koejärjestelyissä, harkitusti ja systemaattisesti olosuhteita muunnellen. Ennen tutkimusta suunnitellaan, miten saadaan aikaan muutos yhdessä tai useammassa muuttujassa. Tämä muutos mitataan numeerisesti. Tutkimukseen sisältyy myös muuttujien kontrollointi. (Hirsjärvi, Remes & Sajavaara 2007, 130.) Opinnäytetyömme etenemistä havainnollistetaan kuviossa 1.

Tutkimuksessamme muuttujia ovat hydrogeelialustan fibronektiinipitoisuus, kasvualustan jäykkyys ja taliinigeenin mutantit. Kasvatusalustojen fibronektiinipitoisuudet ovat tutkimuksen ensimmäisessä vaiheessa 10 µg/ml, 100 µg/ml ja 1 mg/ml. Pitoisuudet valitaan harkinnanvaraisesti tutkimusryhmän aiemmin käyttämien pitoisuuksien perusteella. Fibronektiinalustojen kontrollina käytetään hydrogeelialustaa, joka ei sisällä lainkaan fibronektiinia. Näistä geeleistä valitaan tutkimuksen toiseen vaiheeseen optimaalisimmalta vaikuttava tulos.

Tutkimuksen toisessa vaiheessa kasvatamme soluja hydrogeelialustoilla, jotka on pinnoitettu fibronektiinilla. Geelien jäykkyys vaihtelee ja kontrollipintana käytetään lasia. Soluihin transfektoitu mutatoitu taliinigeeni on valittu, koska Minital 4 -geenin epäillään vaikuttavan solujen leviämisenopeuteen. Puolet soluista transfektoidaan villityypin taliinigeenillä ja toinen puoli taliinigeenillä, josta on poistettu rod-domeenia koodaava alue. Villityypin taliini toimii samalla kontrollina taliinimutantille.

Tulosten tulkinta perustuu kuva-analyysiin, joka suoritetaan fluoresenssimikroskoopilla. Analyysissa arvioidaan soluja niiden värjäytymisen ja muodon perusteella. Lisäksi arvioidaan solujen määrää ja tarttumista kasvualustaan. Tulosten arvioinnissa saamme apua tutkimusryhmän jäseniltä, sillä tutkimuksemme on osa heidän laajempaa tutkimustaan. Tutkimusryhmän aiempia tuloksia hyödynnetään saadun tiedon analysoinnissa.



KUVIO 1. Tutkimuksen prosessikaavio

7 TUTKIMUKSEN SUORITUS

7.1 Hydrogeelien valmistus

Aloitimme opinnäytetyömme kokeellisen osuuden joulukuussa 2012 fibronektiinipitoisuuksien testauksella bioanalyttikko Outi Väätäisen ohjauksessa. Geelien valmistuksessa käytettiin proteiinidynamiikan tutkimusryhmän työohjetta. Tutkimusryhmä käyttää Wangin protokollaa (Liite 1), joka on muokattu heidän tarpeisiinsa sopivaksi.

Geelien valmistusta varten liekitettiin haluttu määrä peitinlaseja bunsenpolttimella. Liekittämisellä poistettiin lasin pinnassa mahdollisesti olevat mikrobit. Tämän jälkeen lasit kastettiin natriumhydroksidiiniin (NaOH), huuhdeltiin nopeasti tislatulla vedellä ja annettiin kuivua. APTES:lla silanointia varten lasit laitettiin eksikaattoriin APTES-liuoksen kanssa. Eksikaattorin vakuumi-imu avattiin ja annettiin sen vaikuttaa noin 5 minuuttia. Tämän jälkeen imu suljettiin, ja lasien annettiin inkuboitua eksikaattorissa noin tunnin ajan. Silanoinnin tarkoituksena oli saada APTES sitoutumaan lasin pintaan.

Silanoinnin jälkeen lasille tehtiin glutaraldehydikäsittely inkuboimalla niitä 30 minuuttia 0,5 % glutaraldehydiliuoksessa. Glutaraldehydi sitoutuu APTES:iin ja mahdollistaa akryyliamidin sitoutumisen lasille. Glutaraldehydikäsittelyn jälkeen lasit pestiin huolellisesti tislatulla vedellä, jotta pinnasta saatiin poistettua sitoutumatonta glutaraldehydiä.

Geeli valmistettiin sekoittamalla akryyliamidia, bis-akryyliamidia ja HEPES:iä. Akryyliamidin ja bis-akryyliamidin suhdetta muuttamalla voidaan vaikuttaa geelien jäykkyyteen. Tätä suhdetta kuvataan merkinnöillä 8/0.1 ja 8/0.03. Liuokselle suoritettiin kaasujen poisto, sillä happi saattaa inhiboida myöhemmin tapahtuvaa polymerisaatiota. Polymerisaatiota varten Eppendorf-putkeen pipetoitiin APS- ja TEMED-liuoksia, jotka edesauttavat polymerisaatiota. Polymerisaatio alkaa heti, kun akryyliamidi-bis-akryyliamidi-HEPES-liuos lisätään APS:ia ja TEMED:ia sisältävään putkeen. Polymerisoituva liuos pipetoitiin silanoiduille peitinlaseille rivakasti, ja päälle asetettiin aiemmin etanolilla ja tislatulla vedellä käsitellyt peitinlasit. Tämän jälkeen odotettiin geelien polymerisoitumista.

7.2 Fibronektiinipitoisuuksien vertailu

Valmistimme neljä geeliä, joista kolmeen lisäsimme eri pitoisuudet fibronektiinia ja yhdessä korvasimme fibronektiinin naudan seerumin albumiinilla (BSA). BSA:n laitoimme vertailun vuoksi neljännelle lasille, sillä soluja kasvatettaessa kasvualustalla on hyvä olla jokin proteiini. BSA:ta käytetään yleisesti negatiivisena kontrollina kasvatettaessa soluja esimerkiksi fibronektiinalustalla.

Koska halusimme valmistaa geelit vaihtelevilla fibronektiinipitoisuuksilla, meidän piti valmistaa uudet laimennokset. Alkuperäinen liuos on pitoisuudeltaan 1 mg/ml ja se on liuotettu fosfaattipuskuroituun saliiniin (PBS). Teimme siis uudet laimennokset alkuperäisestä liuoksesta lisäämällä PBS:a. 10 µg/ml -liuokseen tuli fibronektiinia 10 µl ja PBS:a 990 µl, ja 100 µl/ml -liuokseen tuli 100 µl fibronektiinia ja 900 µl PBS:a. Kontrolligeeliin laitoimme BSA:a 1 mg/ml, mikä piti myös laimentaa 5 % liuoksesta. Tällöin tarvitsimme 20 µl BSA:a ja 980 µl steriiliä vettä.

Emme vielä kasvattaneet soluja hydrogeelialustoilla, sillä halusimme selvittää, miltä alustat näyttävät sellaisenaan. Värjäsimme geelit immunofluoresenssivärjäyksellä, joka tuo esiin fibronektiinin. Saadaksemme kuvaa fibronektiinin asettumisesta geelille mikroskoipoimme lasit fluoresenssimikroskoopilla. Tutkimusryhmän laitteistolla oli myös mahdollista kuvata mikroskoopin näkymä.

Immunofluoresenssivärjäyksessä käytettiin primäärivasta-aineena Sigma-Aldrichin valmistamaa jäniksessä tuotettua polyklonaalista fibronektiiniin spesifisesti sitoutuvaa vasta-ainetta. Sekundäärivasta-aineena käytettiin Jackson ImmunoResearch Laboratories, Incorporatedin valmistamaa vuohessa tuotettua jäniksen vasta-aineet tunnistavaa vasta-ainetta. Sekundäärivasta-aine oli leimattu fluoresoivalla FITC-leimalla, jonka eksikaatioaallonpituus on valmistajan mukaan 419 nm ja emissioaallonpituus 519 nm (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. 2013). Sekundäärivasta-aine kiinnittyy jäniksen vasta-aineeseen ja paljastaa mikroskopiinnissa primäärivasta-aineen sitoutumispaidat.

7.3 Solujen kasvatus

Huhtikuussa 2013 proteiinidynamiikan tutkimusryhmä oli pohtinut tutkimuksemme jatkoa ja päättänyt käytettävistä geenimutanteista. Koska aiemman mikroskopoinnin perusteella todettiin, että soluille optimaalinen fibronektiinin pitoisuus on jossain 100 µg/ml ja 10 µg/ml välillä, päädyttiin varsinaisessa tutkimuksessa käyttämään 50 µg/ml pitoisuutta. Näistä mikroskopointituloksista kerrotaan tarkemmin kohdassa 8.1.

Aloitimme tutkimuksemme uusien hydrogeelien valmistuksella. Geelit valmistettiin saman protokollan mukaan kuin joulukuussa. BSA-geelin sijaan lisäsimme kontrolliksi pelkän fibronektiinilla käsitellyn lasin. Tämän lasin valmistuksessa siirryttiin suoraan silanoinnista Sulfo-SANPAH -käsittelyyn.

Soluviljelymedium valmistettiin valmiiksi ennen soluviljelyn aloitusta. Mediumiin sekoitettiin kaupallista DMEM-kasvatusliuosta eli Dulbecco's Modified Eagle Mediumia, 10 % FBS:a, 1 % L-glutamaattia ja 1 % Lonza BioWhittaker PEN-STREP -antibioottiliuosta. Antibioottiliuoksen on tarkoitus estää tavallisimpien kontaminanttibakteerien kasvu soluviljelypullossa penisilliinillä ja streptomysiinillä. Muut ainesosat takaavat soluille riittävästi ravinteita hyvään kasvuun.

Villityypin hiiren fibroblasteja (mouse embryo fibroblast, MEF) oli kasvatettu valmiiksi siirrostusvaiheeseen. Siirrostusvaiheessa soluja oli soluviljelypullossa niin paljon, että ne peittivät mikroskopoitaessa koko pullon pohjan eli konfluenssi oli yli 90 %. Soluille tehtiin pullossa trypsiinikäsittely, jolla ne saatiin irti pullon pohjasta. Trypsiinikäsittelyssä solujen päälle pipetoitiin trypsiini-EDTA:ta, joka katkaisi solujen liitokset kasvu-alustan kanssa. Viljelypulloa inkuboitiin 37 °C:ssa vähintään 5 minuuttia. Kun solut oli saatu irrotettua, trypsiinin vaikutus saatiin pysäytettyä lisäämällä soluviljelymediumia. Mediumin seerumi inhiboi trypsiiniä ja pysäyttää reaktion.

Tarvitsemamme solumäärä viljelymaljoilla oli 300 000 solua millilitrassa. Määrä on helpointa selvittää automaattisella solulaskimella. 10 µl solususpensiota pipetoitiin 10 µl:aan trypaanisineen, joka värjää solut, ja näin saatu suspensio pipetoitiin kaupalliseen solulaskimen kyvetiin. Tutkimusryhmällä on käytössä Invitrogenin Countess TM Automated Cell Counter. Solulaskimen antamasta lukemasta saatiin laskennallisesti jatkoviljelyyn tarvittava solususpension tilavuus. Solulaskin ilmoittaa suspensiossa olevista

soluista kokonaismäärän, elävien ja kuolleiden solujen määrän ja elävyysasteen. Elävien solujen määräksi saatiin 900 000 solua/ml ja elävyysasteeksi 86 %. Tarvittava määrä solususpensiota pipetoitiin 6 cm:n kasvatusmaljoille. Kasvatusmaljoja viljeltiin 37 °C:ssa 24 tuntia.

7.3.1 MEF-solujen transfektio

Tutkimuksessa bakteereista eristetään plasmidi-DNA NucleoBond® Xtra plasmid purification -kitillä (Malcherey-Nagel 2013). Kun plasmidiin on lisätty halutut rekombinanttigeenit restriktioentsyymien avulla, kasvatettuihin MEF-soluihin on mahdollista transfektoida haluttu geeni. DNA-plasmidit sisältävät muun muassa mutantin taliinin geenin, fluoresoivan mCherry-proteiinin ja viruksen promoottorijakson. Viruksen promoottorijakson ansiosta MEF-solu tuottaa oman taliinituotantonsa lisäksi runsaasti mutanttigeenin taliinia.

Transfektiossa käytimme Thermo Scientific TurboFect Transfection Reagent -liuosta. Liuoksessa on kationisia polymeerejä liuotettuna veteen. Polymeerit muodostavat positiivisesti varautuneen kompleksin DNA:n kanssa. Nämä kompleksit suojaavat DNA:ta ja edistävät DNA:n fagosytointia eukaryoottisolun sisään. TurboFect-liuoksen on todettu toimivan myös sellaisilla soluilla, joihin transfektio on tavallisesti vaikeaa. (Thermo Scientific 2013.)

Transfektio-liuokset valmistettiin Opti-MEM-liuoksesta, TurboFect-liuoksesta ja kahdesta erilaisesta tutkimusryhmän valmistamasta DNA-plasmidista. Liuokseen lisättävän plasmidin määrä riippuu plasmidiliuoksen pitoisuudesta. Käytetyn DNA:n pitoisuus oli 500 µg/µl, joten sitä tarvittiin 12 µl. Tällöin DNA:n kokonaismäärä on 6 µg. Opti-MEM-liuosta pipetoitiin 600 µl ja TurboFect-liuosta 12 µl. Soluja kasvatettiin jälleen yön yli.

Tässä opinnäytetyössä käyttämistämme taliinimutanteista käytetään nimityksiä Tal+ ja Minital 4. Tal+ -mutantti on villityypin taliini-1:n geeni, johon on lisätty geeni, joka tuottaa fluoresoivan mCherry-proteiinin taliinin C-terminaaliseen päähän. Minital 4 -mutantista puuttuu kokonaan rod-domeeni, joten fluoresoiva mCherry-proteiini liittyy suoraan head-domeeniin. mCherry on proteiini, joka fluoresoi punaista valoa. Proteiini

on tuotettu ja eristetty *E.coli*-bakteereista. Proteiinia on mahdollista käyttää leimana esimerkiksi muille proteiineille tai transfektoitujen solujen analyysiin. (BioVision Inc. 2013.) Fluoresoivan mCherry-jakson ansiosta on mahdollista havaita fluoresenssimikroskoopilla jopa elävistä soluista transfektion onnistuminen.

Seuraavaksi soluilta poistettiin kasvatusmedium ja ne irrotettiin kasvatusmaljalta trypsiinikäsittelyllä. Käytimme trypsiinikäsittelyyn BioWhittakerin Trypsin EDTA -liuosta, jonka trypsiinipitoisuus on 200 mg/l. Trypsiinikäsittelyn jälkeen solujen määrä laskettiin Countess-solulaskimella. Jatkossa yhdelle geelille tarvittava solumäärä oli 100 000 solua. Huomasimme, että transfektoiduista soluista Minital 4 -solut olivat kasvaneet hiukan Tal+ -soluja paremmin ja niiden elävyysprosentti solulaskimella oli hieman parempi. Tal+ -solujen elävyysprosentti oli 86 % ja Minital 4 -solujen puolestaan 94 %. Tästä syystä Tal+ -soluja tarvittiin 250 µl ja Minital 4 -soluja 244 µl.

Trypsiinikäsittelyn ja solujen laskemisen jälkeen solut pestiin seerumittomalla DMEM-liuoksella ja jatkossa käytettiin ainoastaan seerumitonta kasvatusliuosta. Seerumi sisältää proteiineja, joiden toimintaa tutkimuksessa halutaan selvittää, kuten fibronectiinia ja kollageenia. Jotta nämä seerumin ainesosat eivät vääristäisi tuloksia, käytetään seerumitonta kasvatusliuosta.

7.3.2 Solujen siirrostus geeleille ja fiksaatio

Kun solut oli saatu pestyä, ne siirrettiin viimein geeleille ja kontrollina toimivalle lasille. Geelien pinnalla solut saivat kasvaa lämpökaapissa yhden tunnin. Tunnin aikana ne alkoivat hieman kiinnittyä geelin pintaan.

Värjäystä varten soluille tehtiin fiksaatio. Fiksaatiossa solut saadaan kiinnittymään paremmin alustaan, ja niiden liikkuminen ja lisääntyminen pysähtyy fiksaatiohetkeen. Fiksaatiossa kasvatusmedium poistettiin ja solujen päälle pipetoitiin 4 % fosfaattipuskuroidua paraformaldehydia. Käsiteltyjä soluja inkuboitiin 5 minuuttia 37 °C:ssa. Paraformaldehydi poistettiin pesemällä solut PBS:llä.

7.3.3 Värjäys

Fiksoiduille soluille tehtiin permeabilisointi käyttämällä detergenttinä 0,01 % Tween 20 -liuosta. Permeabilisoinnin tarkoituksena on saada solut vastaanottavaisiksi väriaineille tekemällä reikiä solukalvoon. Permeabilisoinnin jälkeen geelit laitettiin niin kutsuttuun blokkausliuokseen, joka sisälsi 1 % BSA:ta, 5 % FBS:a ja 0,01 % Triton-X 100 -liuosta. Liuos pestiin pois PBS:lla.

Käytimme värjäyksessä Invitrogenin Alexafluor-488-konjugoitua 6,6 μM falloidiinia. Falloidiini on toksinen polypeptidi, joka on alun perin eristetty sienistä (Phalloidine-Compound Summary 2013). Leimattu falloidiini sitoutuu geelillä solujen aktiinisäikeisiin, jolloin leima saa aikaan fluoresoivan värireaktion. Falloidiinin eksikaatioaallonpituus on 495 nm ja se emittoi 518 nm aallonpituudella.

Falloidiini laimennettiin suhteessa 1:40 blokkausliuokseen ja sitä pipetoitiin 25 μl . Laimennoksen jälkeen falloidiini täytyi säilyttää pimeässä, koska fluoresoivat ominaisuudet heikentyvät luonnon UV-valon vaikutuksesta (Ankeriasniemi & German-Kinnari 2012, 3). Värjäyksen inkubaatioaika oli tunti. Väri pestiin pois PBS:lla ja tislattulla vedellä.

Mikroskopointia varten nimettiin kuusi objektilasia. Objektilaseille pipetoitiin 15 μl Vectashield-peittausreagenssia, jossa on DAPI:a. DAPI on sinisenä fluoresoiva tumaväri (DAPI Nucleic Acid Stain 2013). Geelit asetettiin objektilaseille solupinta alaspäin.

7.3.4 Mikroskopointi

Mikroskopoinnissa lähdimme etsimään geeleiltä soluja, joissa olisi tapahtunut transfektio. Koska mCherry liitettiin osaksi plasmidivektoria, vektorin läsnäolo näkyy soluissa punaisena. Taliinin tuotanto solun tarttumakohdissa näkyy siis punaisena värinä. Tumat ovat värjäytyneet sinisellä ja aktiinisäikeet vihreällä. Kuvassimme solut Axio Apotome Zeiss -mikroskoopilla, joka oli liitettyä AxioCam MRm -kameraan. Käytimme 40x- tai 63x-öljyimmersio-objektiivia kuvaamiseen.

Kuvattuja soluja analysoitiin ImageJ:n Fiji-kuvankäsittelyohjelmalla. Fiji on kehitetty erityisesti tieteellisen tutkimuksen tueksi kuva-analyysiin. Mittasimme Fijin avulla ku-

vistamme solujen pinta-alat saadaksemme tarkempaa tietoa solujen levittäytymisestä ja kasvusta alustoilla.

8 TULOKSET

8.1 Fibronektiinitestaus

Fibronektiinin pitoisuuden testauksesta otettiin fluoresenssimikroskoopilla valokuvia. Kuvat otettiin fibronektiinin eri pitoisuuksista sekä BSA-geelistä. Kaikki kuvat on otettu vertailtavuuden vuoksi 40-kertaisella suurennoksella.

Kuvassa 5 on hydrogeeli, jossa fibronektiinin pitoisuus on 1000 µg/ml. Vaaleammat alueet ovat geelillä olevia roskia, jotka fluoresoivat erilailla kuin fibronektiini. Fibronektiinin paakkuuntuminen näkyy selvästi.



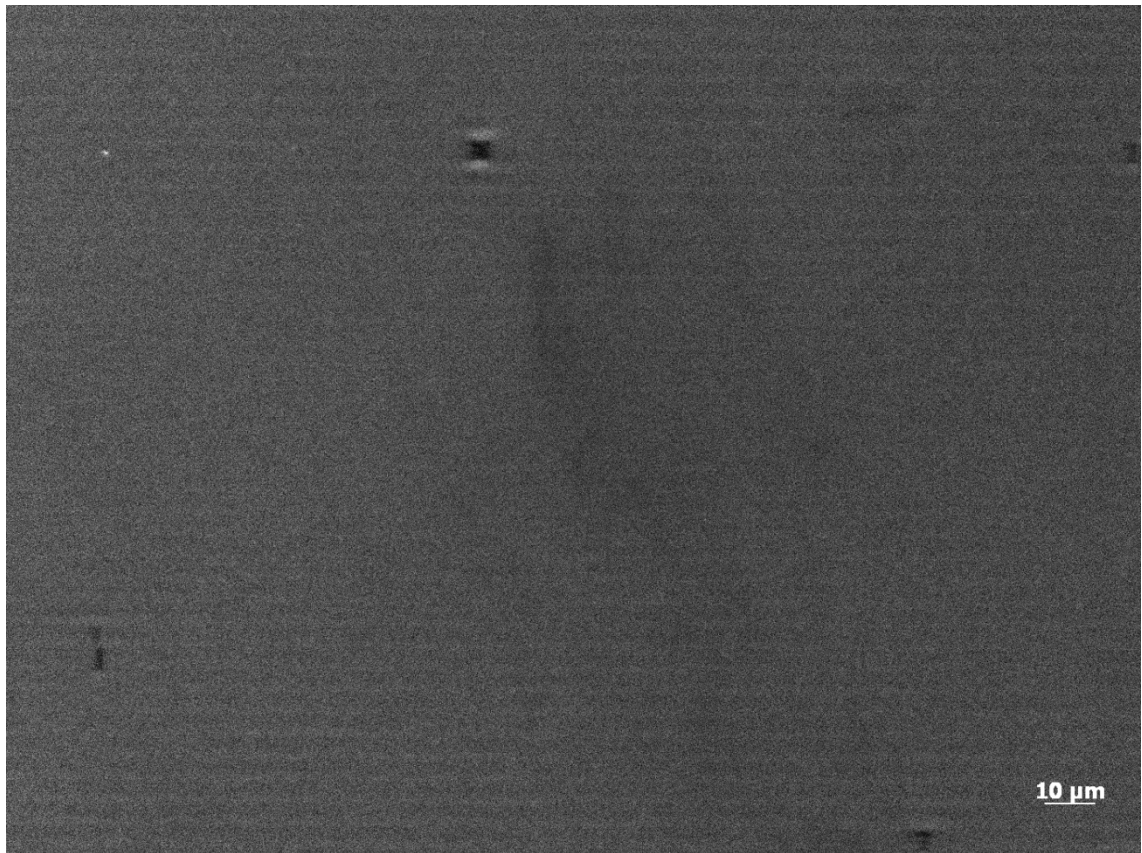
KUVA 5. Fibronektiini 1000 µg/ml.

Kuvassa 6 fibronektiinin pitoisuus on 100 µg/ml. Kuvaan 5 verrattuna fibronektiini on asettunut geelille selvästi tasaisemmin. Edelleen geelillä on kuitenkin havaittavissa mustia alueita, joilla ei fibronektiinia ole.



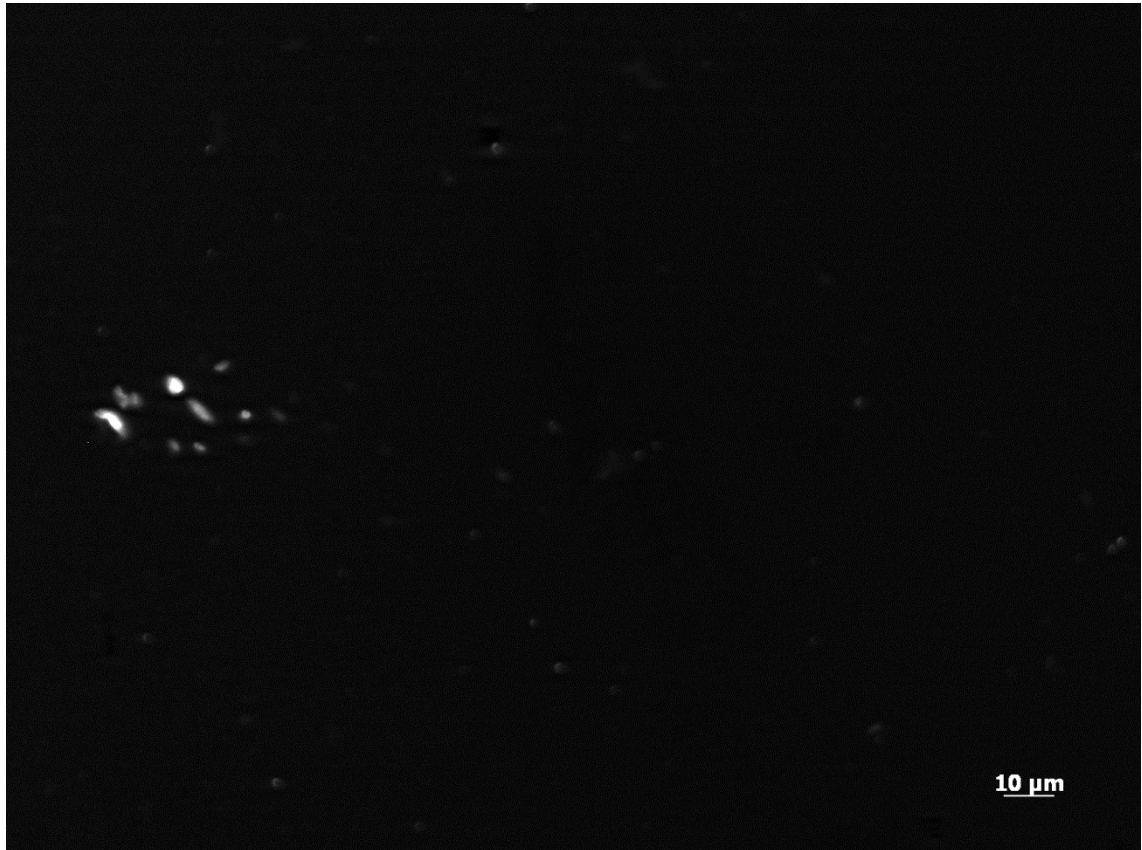
KUVA 6. Fibronektiini 100 µg/ml.

Kuvassa 7 fibronektiinipitoisuus on laskettu geelillä 10 µg/ml. Geeli näyttää siltä kuin fluoresenssia olisi erittäin runsaasti. Tämä ei kuitenkaan pidä paikkaansa, vaan mikroskooppi yrittää keinotekoisesti vahvistaa fluoresenssia.

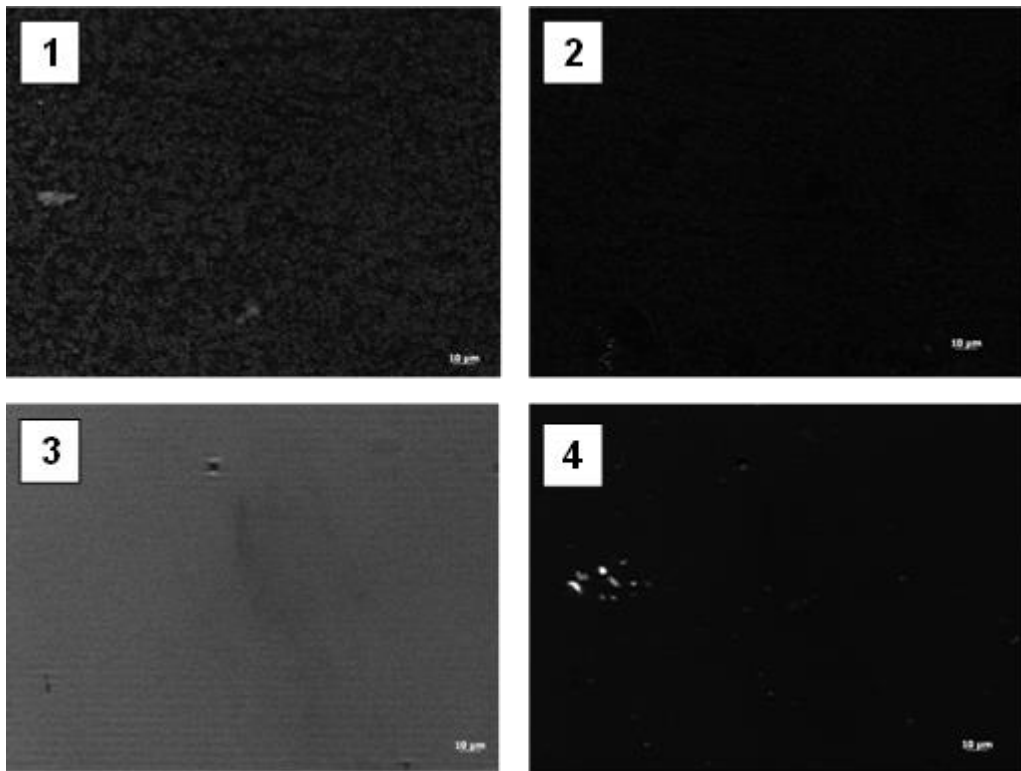


KUVA 7. Fibronektiini 10 µg/ml.

Kuvassa 8 on esitetty geeli, johon on liitetty BSA. Geelin valmistuksessa käytetyn BSA:n pitoisuus oli 1000 µg/ml. Geelissä näkyvät valkoiset kohdat ovat todennäköisesti valmistusvaiheessa geelille päässeitä roskia. Kuvaan 9 on yhdistetty kaikki testauksen geelit vertailun vuoksi.



KUVA 8. BSA-geeli 1000 µg/ml.

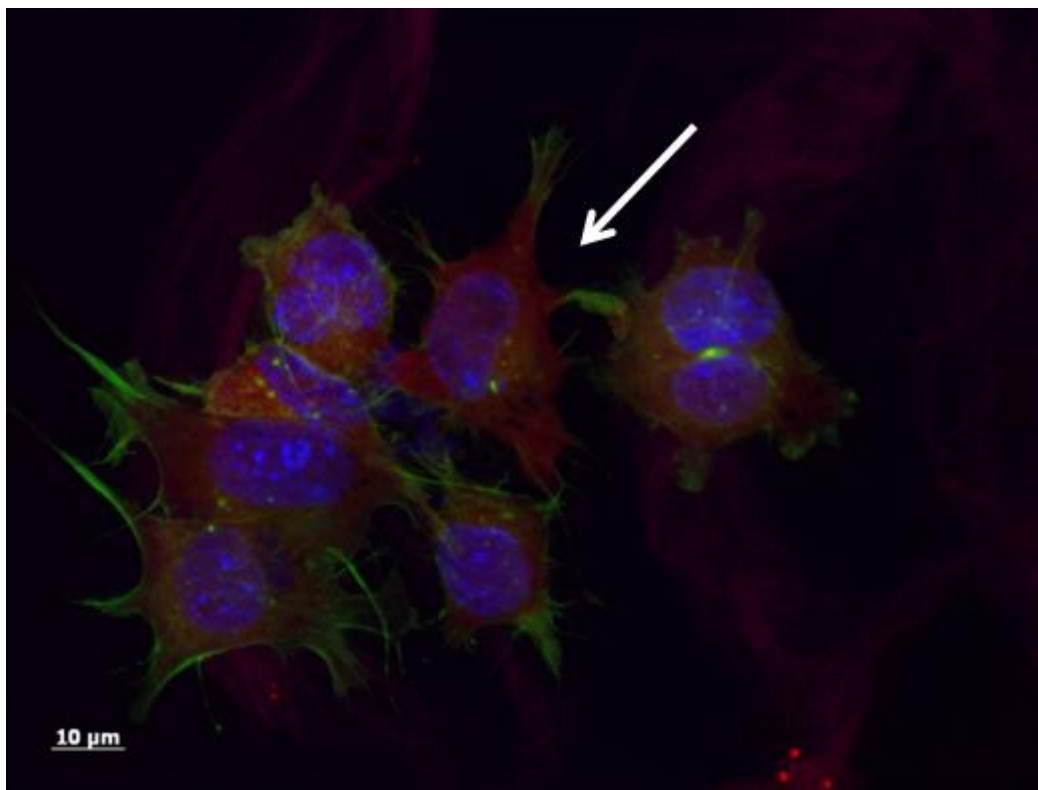


KUVA 9. Yhteenveto hydrogeeleistä. 1. Fibronektiini 1000 µg/ml. 2. Fibronektiini 100 µg/ml. 3. Fibronektiini 10 µg/ml. 4. BSA-geeli 1000 µg/ml.

8.2 Soluviljelyn tulokset

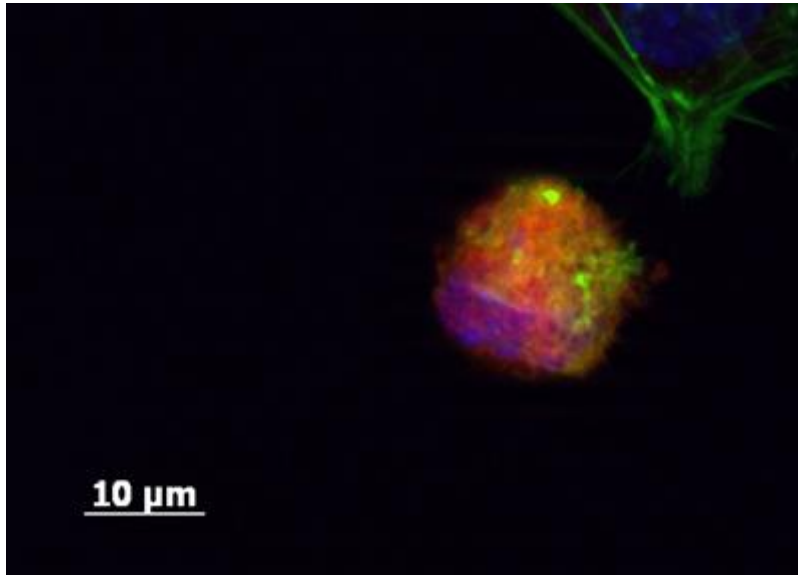
Solujen muodosta oli mahdollista huomata, että solut kiinnittyvät geeleille hieman lasipintaa huonommin. Solut olivat geeleillä pyöreämpiä kuin lasipinnalla, koska fokaaliadheesioita ei ollut muodostunut. Geelillä solut muodostivat fokaaliadheesioita pinnan kanssa heikommin kuin lasilla. Tämä käy ilmi esimerkiksi kuvista 15 ja 18. Koska inkubaatioaika oli lyhyt (vain 1h), solut eivät välttämättä olleet ehtineet tarttua pintaan ja ovat voineet inkubaation jälkeisissä pesuissa irrota.

Solut, jotka ekspressoivat villityypin taliinin geeniä lasilla, olivat tarttuneet kasvualustaan varsin hyvin. Solut olivat levittäytyneet suuriksi. Fokaaliadheesioita oli muodostunut paljon ja transfektiotehokkuus oli ollut varsin hyvä, koska suuressa osassa soluista näkyi punaista. Transfektio ilmenee soluissa reuna-alueiden punaisena värjäytymisenä. Kuvassa 10 on esitettyä laajalle levittäytyneitä soluja, joiden transfektio on onnistunut.



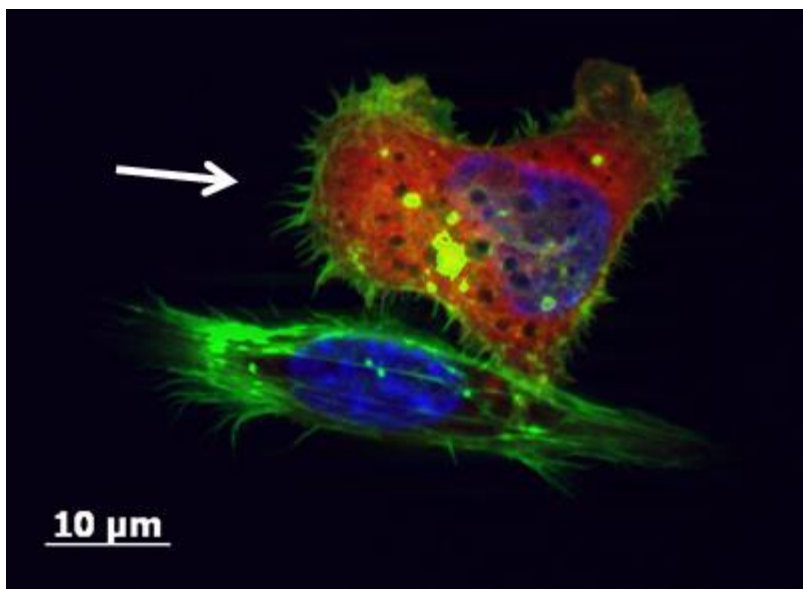
KUVA 10. Lasilla viljeltyjä MEF-soluja, jotka on transfektoitu villityypisellä punaiseksi värjättyllä taliinilla (Tal+). Kuvan nuoli osoittaa yhtä transfektoituneista soluista.

Kuvassa 10 näkyy myös soluja, joissa reuna-alueet eivät fluoresoi punaisena. Näissä soluissa ei ole tapahtunut transfektiota.

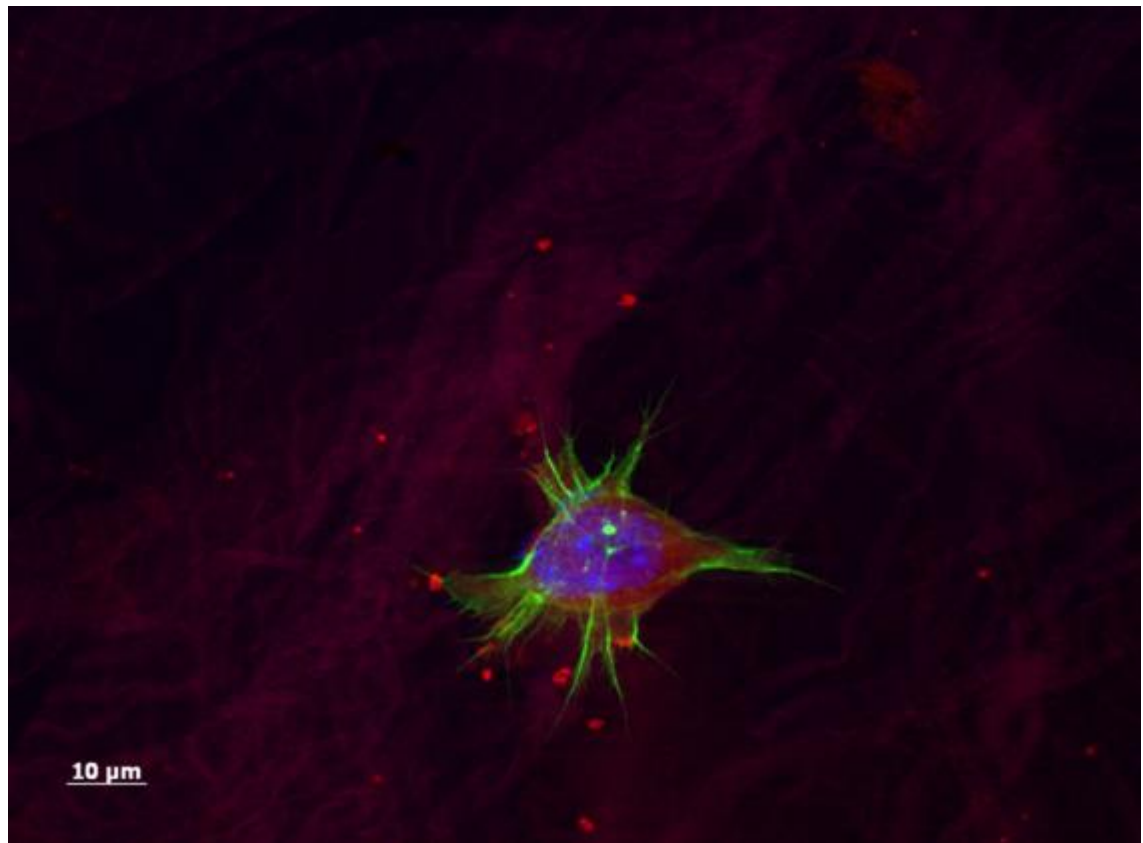


KUVA 11. Tal+ lasilla apoptoottinen solu, joka fluoresoi hyvin voimakkaasti.

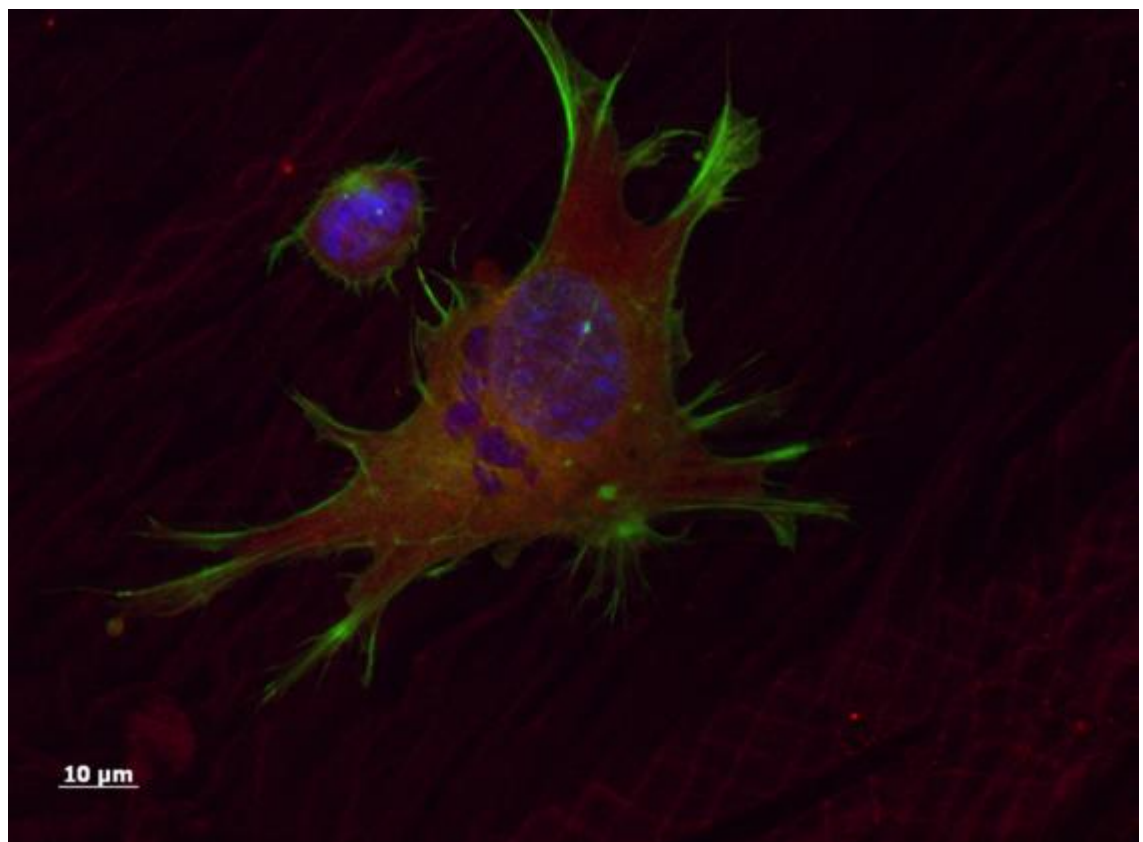
Kuvissa 11 ja 12 on nähtävillä apoptoottinen solu. Apoptoottiset solut erottaa muista soluista helposti, koska niissä fluoresenssi on erittäin silmiinpistävää, ja solut ovat jo alkaneet hajota.



KUVA 12. Tal+ lasilla voimakkaasti fluoresoiva transfektoitunut solu, joka on alkanut hajota. Vieressä fokaaliadheesioita muodostanut solu, joka ei ole transfektoitunut.



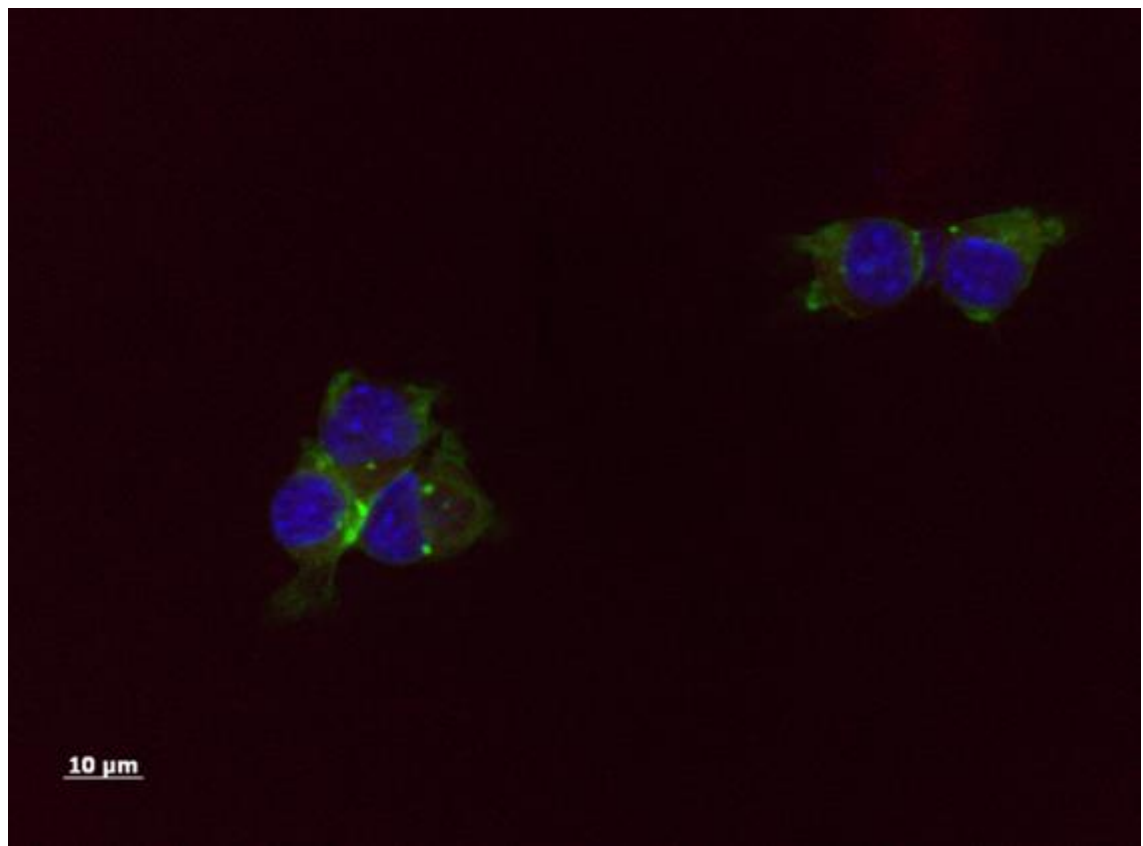
KUVA 13. Tal+ lasilla taustavärjätymistä, joka saattaa johtua fibronektiinin tai käytetyn peittäusaineen muodostamista kasoista.



KUVA 14. Tal+ lasilla taustavärjätymistä. Kuvan ristikkokuvio saattaa olla kaksinkertainen taittunutta fibronektiiniä.

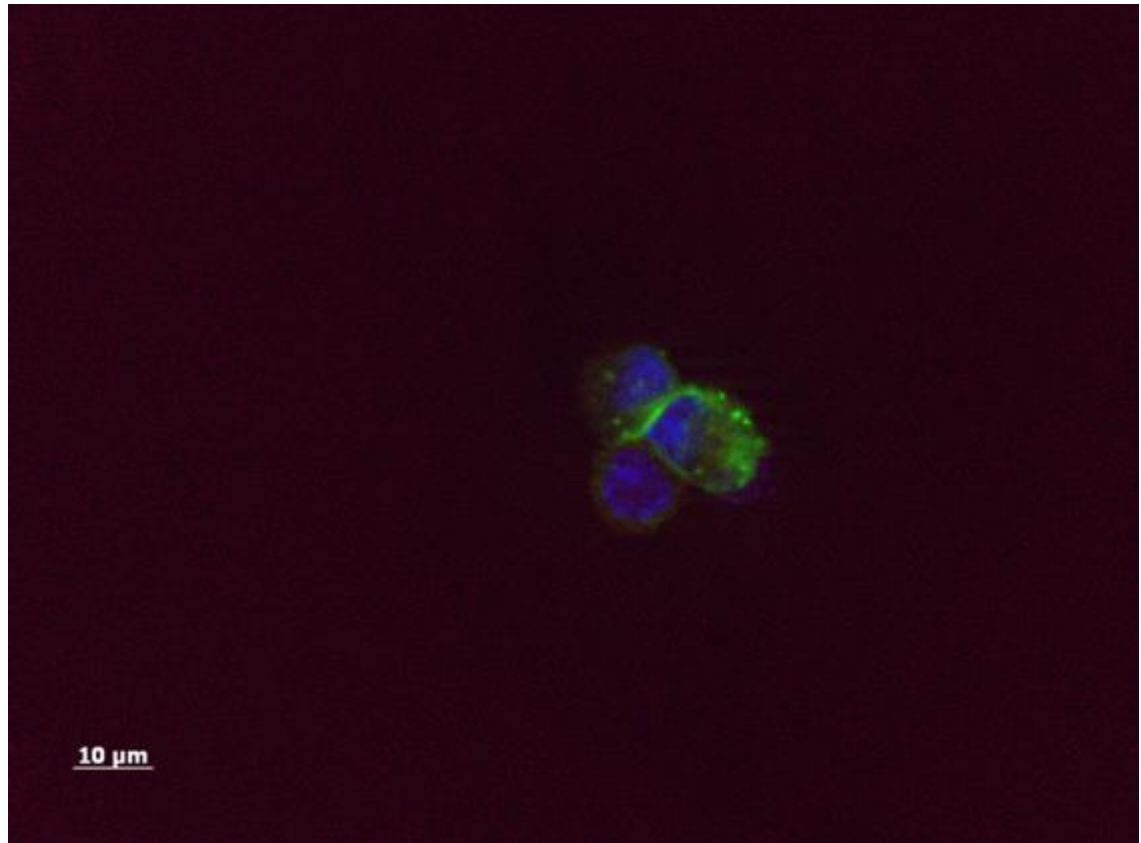
Villityypin solujen taustalla lasialustalla on rihmamaista taustavärjäytymistä esimerkiksi kuvissa 13 ja 14. Taustan rakenteet saattavat olla fibronektiiniä, joka on muodostanut kasoja. Fibronektiini fluoresoi jonkin verran myös luonnostaan. On mahdollista, että fibronektiini on ollut hieman vanhentunutta ja sen takia se reagoi näin. Kyseessä saattaa myös olla osittain kovettuneen Vectashield-peittausaineen aiheuttamat kasat, jotka ovat muodostuneet aineen reagoidessa hapen kanssa. Muilla laseilla ja geeleillä vastaavaa ei kuitenkaan ollut havaittavissa. Kuvan 14 taustalla oleva ristikkokuvio on voinut syntyä alustan fibronektiinin taistuessa kaksin kerroin, kun alustaa on käsitelty.

Tal+ -geeniä ilmentävät solut 8/0.1 -geelillä olivat pyöreämpiä kuin lasilla. Niissä ei näkynyt punaista värjäytymistä, mikä voi viitata siihen, että transfektiotehokkuus on ollut huono. Toisaalta solut ovat kuitenkin samoja kuin lasillakin, jossa transfektiotehokkuuden todettiin olevan hyvä. Punaisen värin puuttuminen saattaakin viitata siihen, että transfektoidun taliinigeenin ilmentäminen alkaa vasta fokaaliadheesioiden muodostuksen myöhäisemmässä vaiheessa. Voimakkaan fokaaliadheesion muodostuminen vaatii kuitenkin aikaa. Tämä sama pätee myös muilla geeleillä, joissa punaista väriä ei ole havaittavissa yhtä paljon kuin lasipinnoilla. Esimerkiksi Tal+ -solut 8/0.1 -geelillä kuvassa 15 ovat tyypillisiä pyöreitä soluja, joissa ei ole havaittavissa taliinin ilmentämistä.



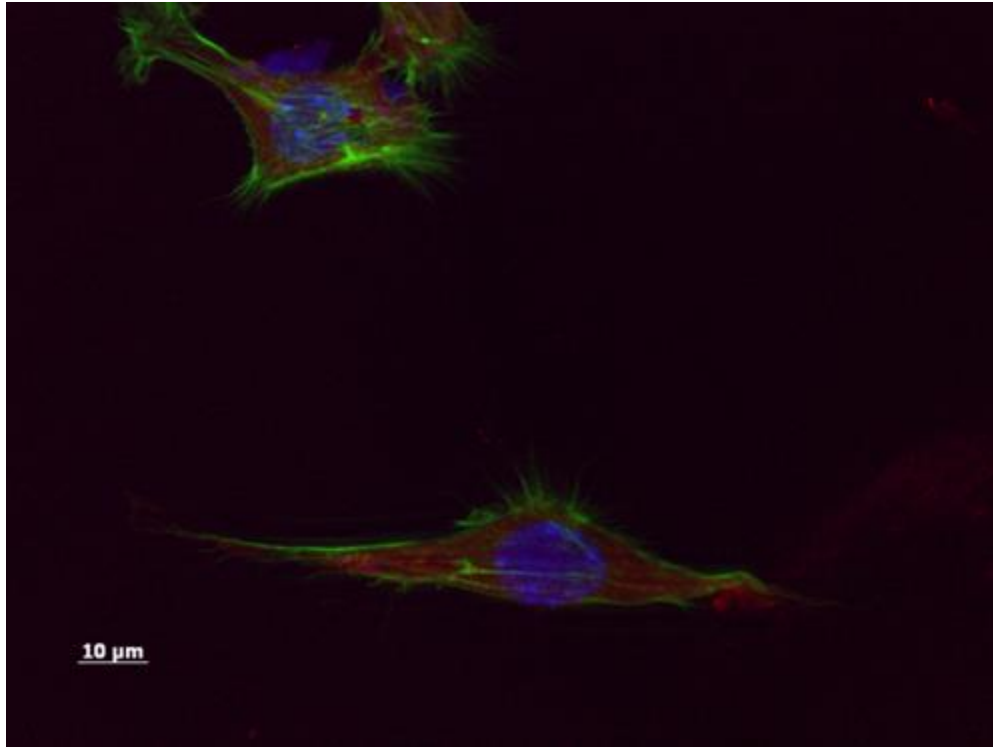
KUVA 15. Ei-transfektoituneita soluja Tal+ 8/0.1 -geelillä. Punaista fluoresenssia ei ole nähtävissä, eivätkä solut myöskään ole muodostaneet fokaaliadheesioita pinnan kanssa.

Kuvassa 16 on esitetty Tal+ -soluja 8/0.03 -geelillä. Kuvassa 16 tausta on punertava. Punainen taustafluoresenssi johtuu todennäköisesti peittausaineen ominaisuuksista. Kuvattaessa mikroskooppi yrittää vahvistaa punaista väriä muuttamalla intensiteettijakauman esitystapaa ja kasvattamalla valotusaikaa, koska näytteen punainen intensiteetti on heikko. Koska värjäytymistä ei kuitenkaan ole ollenkaan, tausta näyttää punaiselta.



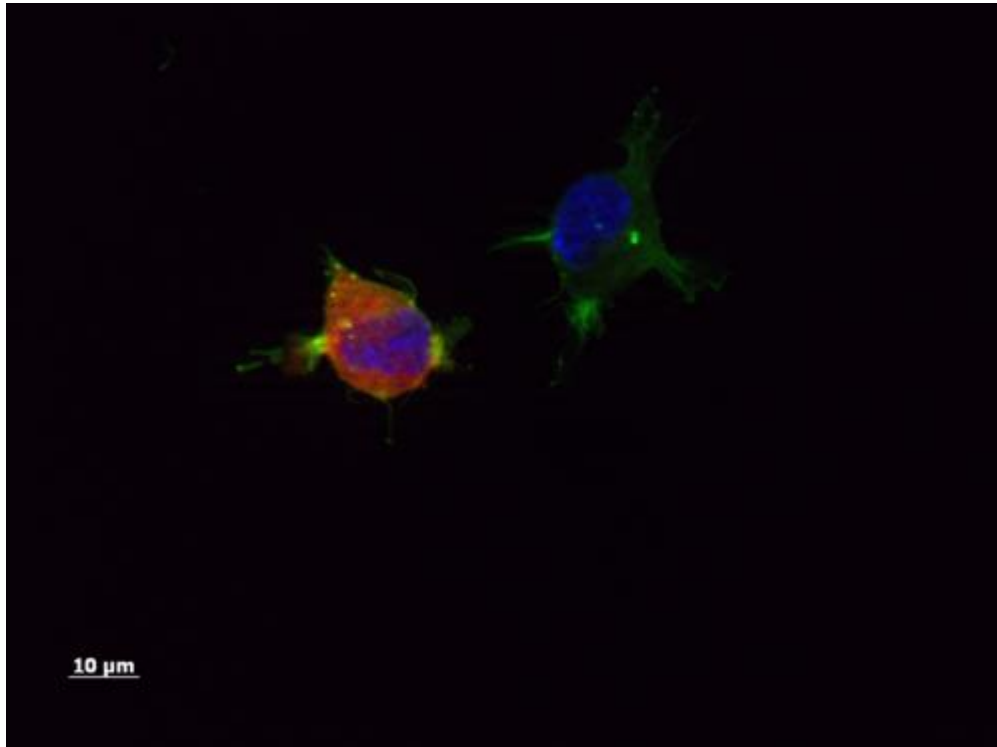
KUVA 16. Tal+ 8/0.03 -geelin taustafluoresenssia. Mikroskooppi yrittää vahvistaa punaista väriä, koska näytteen punainen intensiteetti on heikko.

Myös Minital 4 -solut olivat tarttuneet lasille varsin hyvin. Geeleille Minital 4 -solut levisivät paremmin kuin Tal+ -solut. Minital 4 -solujen määrä 8/0.03 -geelillä oli kuitenkin hyvin vähäinen mikroskopoinnin perusteella. Kuvassa 17 on Minital 4 -soluja lasille kiinnittyneenä. Nämä solut ovat muodostaneet fokaaliadheesioita ja levittäytyneet niiden avulla laajalle.



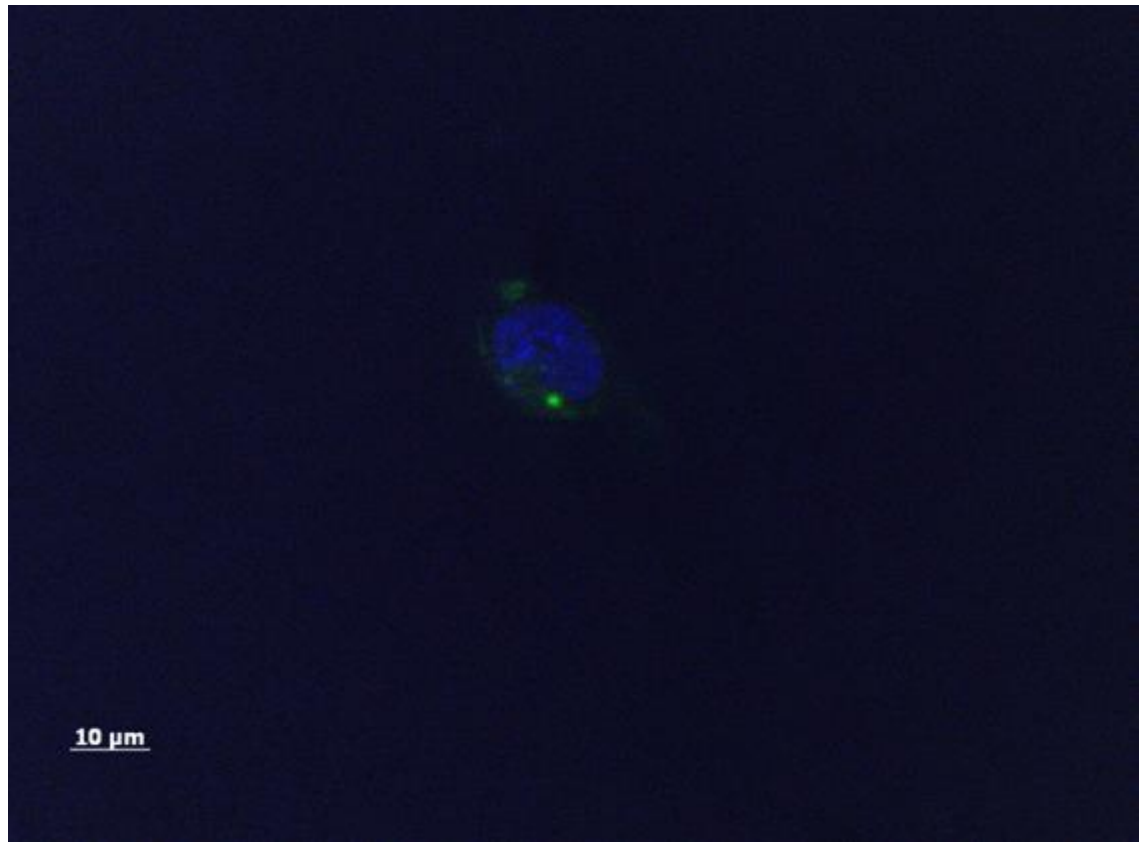
KUVA 17. Fokaaliadheesioita muodostaneita Minital 4 -soluja lasilla.

Kuvassa 18 Minital 4 -ekspressoivat solut on siirrostettu 8/0.1 -geelille. Tällä alustalla solut olivat pyöreitä. Kuvassa 18 on punaisena fluoresoiva transfektoitunut solu ja ei-transfektoitunut solu. Solut ovat muodostaneet jonkin verran ulokkeita ympäröivään geeliin, mutta fokaaliadheesioiden muodostumisesta ei voida olla varmoja.



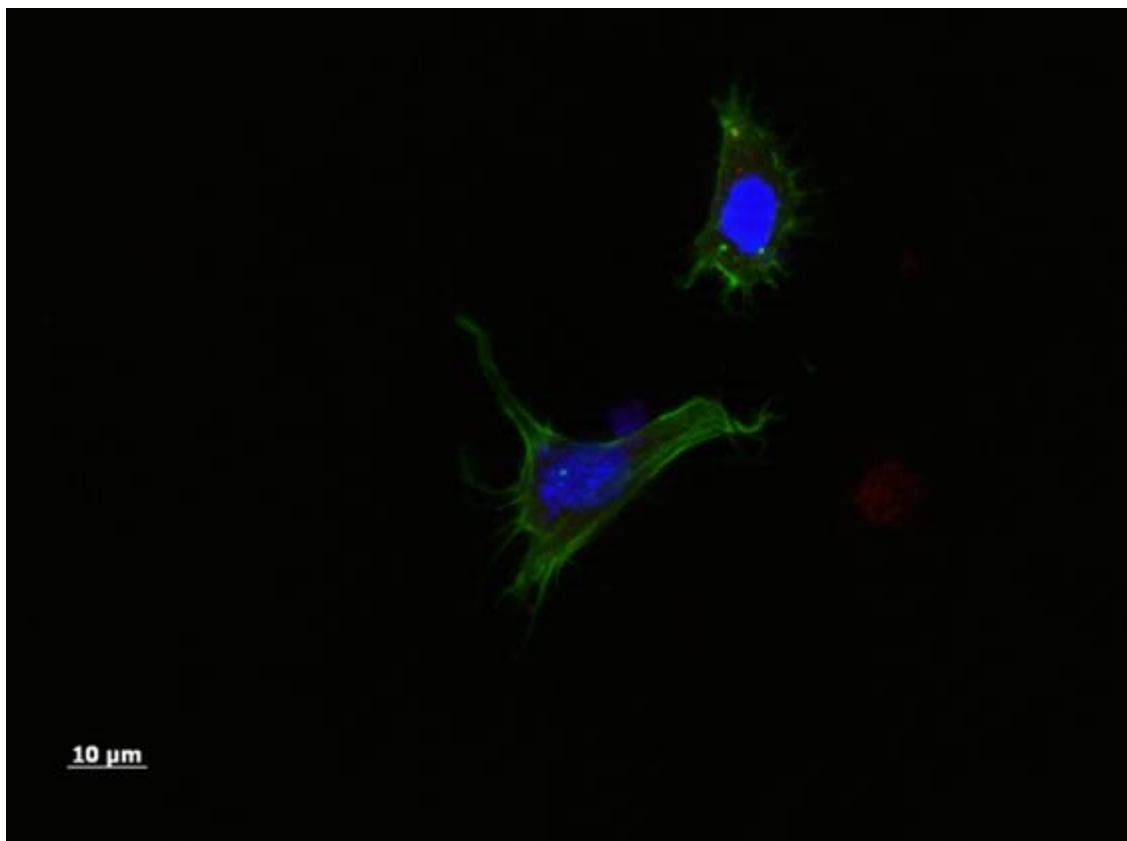
KUVA 18. Minital 4 -soluja 8/0.1 -geelillä. Solut ovat muodostaneet ulokkeita, jotka eivät välttämättä ole fokaaliadheesioita.

Kuvassa 19 on Minital 4 -solu 8/0.03 -geelillä. Tältä geeliltä soluja oli löydettävissä varsin vähän.



KUVA 19. Minital 4 -konstruktilla transfektoidusta viljelmästä kuvattuja fokaaliadheesioita muodostaneita soluja 8/0.03 -geelillä.

Tyypillisimmillään geeliin tarttunut solu oli pyöreä ja fokaaliadheesioita oli niukasti tai ei lainkaan. Tästäkin tosin oli nähtävissä poikkeuksia, mikä näkyy kuvassa 20. Soluissa ei näy punaista fluoresenssia, joten niissä ei ole todennäköisesti tapahtunut Minital 4 -geenin transfektiota.



KUVA 20. Fokaaliadheesioita muodostaneita soluja 8/0.03 -geelillä.

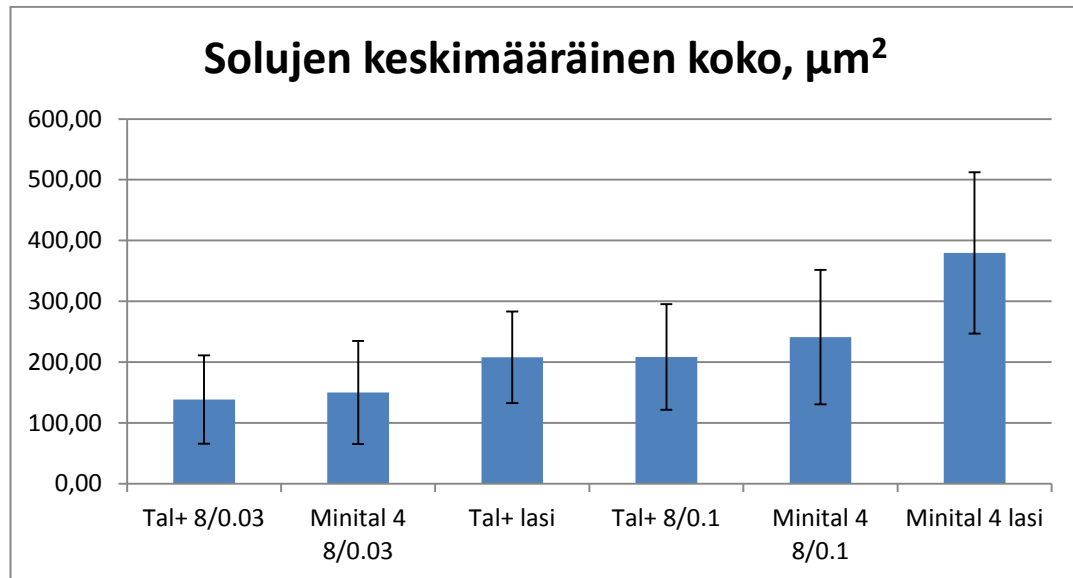
8.3 Solujen pinta-alat

Tarkastellessamme solujen pinta-aloja valitsimme taulukointiin sattumanvaraisesti kymmenen transfektoitunutta solua jokaiselta alustalta. Mittasimme pinta-alat neliömikrometreinä (μm^2) ja taulukoimme ne Excel-tilukkolaskentaohjelman avulla. Koko pinta-alataulukko on esitetty liitteessä 2.

Solujen pinta-alan analyysi tukee havaintoa, että solut tarttuvat paremmin kovemmalle alustalle. Sekä täysipitkää taliini-1:a ilmentävät solut että Minital 4 -solut levittäytyvät suuremmalle alalle lasilla kuin geelipinnalla. Tämä tarkoittaa sitä, että solut muodostavat enemmän fokaaliadheesioita kovemman pinnan kanssa.

Pinta-alan perusteella selvisi myös, että Minital 4 -solut kasvavat suuremmiksi kuin Tal+ -solut. Taulukossa 1 näyttää, että Tal+ -solut lasilla ovat pienempiä kuin Tal+ -solut 8/0.1-geelillä. Solujen keskimääräinen kokoero on $1 \mu\text{m}^2$.

TAULUKKO 1. Solujen keskimääräinen koko neliömikrometreinä.



9 POHDINTA

Olemme hyödyntäneet työssämme uusimpia kansainvälisiä tutkimustuloksia ja tehneet eri lähteistä lähdesynteesiä taataksemme tietojen oikeellisuuden. Hakiessamme teoreettista taustatietoa aiheesta huomasimme, että bioteknologista tutkimusta tehdään nyt paljon myös hydrogeeleihin liittyen. Tästä syystä opinnäytetyömme aihe on erittäin ajankohtainen.

Tutkimuksemme luotettavuutta olisi ollut mahdollista lisätä esimerkiksi suurentamalla otoskokoa. Nyt teimme kutakin hydrogeelialustaa vain kaksi kappaletta, joista kummallakin kasvatimme erilaisia soluja. Vaikka solujen kasvun kontrollina toimikin villityypin solu, olisi mutatoituja soluja voinut kasvattaa useammalla eri geelillä. Toisaalta lasialusta toimi geelin kontrollina, mutta useampi kappale samaa geelijäykkyyttä olisi tuonut tutkimukseen toistoa. Mikäli transfektiotehokkuus olisi ollut parempi, olisi voitu varmistua, että jokainen tarkastelemamme solu on varmasti ottanut plasmidin sisäänsä. Tuloksiamme saattavat siis vääristää solut, joissa ei ole taliinia tuottavaa geeniä.

Kokeellisen osuuden toteuttamista rajoitti lukujärjestyksemme suoma viikon mittainen aika tutkimuksen toteuttamiseen laboratoriossa. Soluviljelyssä viikko on hyvin lyhyt aika tuloksien saamiseen, eikä meillä ollut aikaa toistaa tutkimusta tai suurentaa otoskokoa.

Tutkimuksen tuloksia olisi mahdollista tarkentaa jatkotutkimuksilla. Tutkimus voitaisiin toistaa soluilla, joista on poistettu endogeeninen taliini. Tällöin solun oma taliinin tuotanto ei vaikuta tuloksiin. Toisaalta parempi transfektiotehokkuus varmistaisi, että kaikissa kasvavissa soluissa olisi varmasti muokattua taliinia koodaava geeni. Tässä tutkimuksessa ei voitu varmuudella sanoa, että kaikki solut olivat transfektoituneet. Lisätietoa solujen kiinnittymisestä alustaansa toisi myös solujen lukumäärän laskeminen kasvualustoilta. Tämä vaatisi enemmän resursseja kuin meillä oli tätä työtä tehdessämme. Mielenkiintoista olisi myös selvittää, miksi Minital 4 -solut kasvavat suuremmaksi kuin Tal+ -solut.

Tätä opinnäytetyötä tehtäessä ei käytetty ihmisperäisiä näytteitä. Käyttämämme solut olivat kansainvälisten tutkimusryhmien yleisesti käyttämiä hiiren alkion fibroblastisoluja.

Opinnäytetyön teoreettista taustaa kootessamme löysimme runsaasti uutta tietoa hydrogeelien ominaisuuksista ja bioteknologisista sovelluksista. Uutta meille olivat myös erilaiset solujen kuvantamis- ja analysointimahdollisuudet. Koulutusohjelmassamme soluviljely rajoittuu yhteen kurssiin, joten pääsimme huomattavasti syventämään aiempaa tietämystämme ja osaamistamme soluviljelyssä. Näistä tiedoista on meille varmasti hyötyä myös tulevaisuudessa.

Työskennellessämme opinnäytetyön parissa opimme tärkeitä asioita parityöskentelystä. Olemme molemmat erittäin pikkutarkkoja ihmisiä. Työskennellessämme yhdessä meidän oli opittava luottamaan toistemme kykyyn hoitaa oma osuus työstä. Toisaalta tämä pikkutarkkuus sai meidät haluamaan opinnäytetyöhömmme samoja asioita. Pohdimme kirjoitusprosessin aikana, että mikäli toinen meistä olisi esimerkiksi yhdyssanojen tai pilkutuksen kanssa suurpiirteinen ja toinen tarkka, opinnäytetyön tekemisestä olisi tullut kaksin verroin haastavampaa. Mielestämme opinnäytetyömme syntyi loppujen lopuksi varsin helposti. Syynä voi olla yhteistyön luontevuus tai työelämäyhteistyön toimivuus, tai nämä molemmat yhdessä.

Työmme tekemistä helpotti suuresti sujuva yhteistyömme proteiinidynamiikan tutkimusryhmän kanssa. Tutkimusryhmässä opinnäytetyömme otettiin vakavasti ja sen tuoksista ja etenemisestä oltiin kiinnostuneita. Proteiinidynamiikan tutkimusryhmän kanssa oli ilo työskennellä, koska sieltä saimme jatkuvasti ohjausta ja nopeasti vastaukset kysymyksiimme, ja meitä ohjattiin alusta asti tarkoin käyttämään oikeita menetelmiä. Tästä haluaisimmekin esittää erityiset kiitokset Vesa Hytöselle, Jenita Pärssiselle, Rolle Rahikaiselle ja Outi Väätäiselle.

10 JOHTOPÄÄTÖKSET

Pelkän hydrogeelin värjäyksessä ja mikroskopoinnissa selvisi, että 1000 µg/ml pitoisuus fibronektiinia on todennäköisesti liian vahva. Fibronektiini ei levity alustalle tasaisesti, vaan muodostaa kasaumia. 100 µg/ml pitoisuudella muodostunut fibronektiinikerros näyttää varsin tasaiselta. 10 µg/ml puolestaan on ehkä liian laimea pitoisuus, sillä värjäytyminen on varsin heikkoa.

BSA-hydrogeelillä ei tapahtunut värjäytymistä, koska alustalla ei ole fibronektiinia, johon immunologinen väri tarttuisi. Fluoresenssimikroskooppi yrittää vahvistaa tietoteknisesti värjäystulosta, jotta heikkokin värjäytyminen saadaan näkyviin. Tästä syystä BSA-hydrogeelin kuva näyttää siltä, että väriä olisi erittäin runsaasti. BSA saattaa myös itsessään fluoresoida, mutta tämä ei ole tuloksen kannalta merkityksellistä.

Solujen kasvatuksessa huomattiin, että solut tarttuivat paremmin lasille kuin geelille. Solut olivat levittäytyneet ja fokaaliadheesioita muodostui enemmän. Solujen kiinnittymisestä huomattiin myös, että löysemmälle 8/0.03 -geelille solut eivät tarttuneet yhtä hyvin kuin kovemmille alustoille. Näin ollen, mitä löysempi alusta on, sitä huonommin solut tarttuvat.

Transfektoidut solut tarttuivat villityypin soluja huonommin alustalleen. Erityisesti Minital 4 -mutantti vaikutti solujen kiinnittymiseen heikentävästi, koska solujen lukumäärä löysällä geelillä oli hyvin vähäinen. On mahdollista, että tunnin inkubaatioaika on fokaaliadheesioiden muodostumisen kannalta liian lyhyt. Tällöin solut irtoavat pesuissa pois alustalta. Taliinin osuus kiinnittymisessä alkaa ehkä vasta myöhemmin, minkä takia taliinin ilmeneminen soluissa on vähäistä. Koska soluja on kuitenkin kiinnittynyt kasvatusalustoille, on huomioitava myös, että soluissa on edelleen endogeenistä taliinia, joka voi osallistua kiinnittymisreaktioihin.

LÄHTEET

Aalto-yliopisto, 2013. Keinotekoisia verisuonia ja kudoksia 3D-tulostimen avulla. 25.4.2013. Luettu 5.9.2013.

<http://www.aalto.fi/fi/current/news/view/2013-04-25/>

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. 2002. *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. United States of America.

Ankeriasniemi, K. & German-Kinnari, M. 2012. Ihobiopsioiden immunofluoresenssi-värjäys. Käsivärjäysmenetelmän ja Ventana BenchMark™ system –värjäysautomaatin vertailu. Metropolia ammattikorkeakoulu. Opinnäytetyö.

Barczyk, M., Carracedo, S. & Gullberg, D., 2010. Integrins. *Cell Tissue Research*, vol. 339. 269-280.

<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00441-009-0834-6>

BioVision Inc. 2013. mCherry Fluorescent Protein. Luettu 16.4.2013. <http://www.biovision.com/mcherry-fluorescent-protein-2210.html>

Buxboim, A., Rajagopal, K., Brown, A.E.X. & Discher, D.E., 2010. How deeply cells feel: methods for thin gels. *Journal of Physics: Condensed Matter* 22 (19).

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2864502/>

Calderwood, D.A., Shattil, S.J. & Ginsberg, M.H., 2000. Integrins and Actin Filaments: Reciprocal Regulation of Cell Adhesion and Signaling. *Journal of Biological Chemistry*.

<http://www.jbc.org/content/275/30/22607.short>

Cooper, G. M. & Hausman, R. E. 2004. *The Cell: A Molecular Approach*. 3. painos. United States of America: ASM Press

Critchley, D. R. & Gingras, A. R. 2008. *Journal of Cell Science* 121, 1345–1347.

<http://jcs.biologists.org/content/121/9/1345.full#corresp-1>

DAPI Nucleic Acid Stain, 2013. Invitrogen life technologies. Luettu 18.4.2013

<http://products.invitrogen.com/ivgn/product/D1306>

Freshney, I. R. 2005. *Culture of Animal Cells: A manual of basic techniques*. 5. painos. United States of America: John Wiley & Sons, Inc.

Gao, M. 2006. *Fibronectin and integrin*. University of Illinois.

<http://www.ks.uiuc.edu/Research/fibronectin/>

Glick B.R. & Pasternak J.J. 2003. *Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA*. 3rd ed. United States of America.

Gulrez, S. H. K., Al-Assaf, S. & Phillips, G. O. 2011. *Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications*. Teoksessa Carpi, A. (toim.) *Progress in Molec-*

ular and Environmental Bioengineering – From Analysis and Modeling to Technology Applications. InTech. 117–150.

Hammarén, H. 2012. Setting Up Methods for the Study of Intracellular Mechanotransduction. Tampereen yliopisto. Biolääketieteellisen teknologian instituutti. Pro gradu – tutkielma.

Hirsjärvi, S., Remes, P. & Sajavaara, P. 2007. Tutki ja kirjoita. 13. painos. Helsinki: Tammi.

Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. 2013. Whole IgG of Affinity-Purified Antibodies and Conjugates. Anti-Rabbit. Luettu 18.9.2013.
<http://www.jacksonimmuno.com/catalog/catpages/whol-rab.asp>

Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Bretscher, A., Ploegh, H. & Matsudaira, P. 2008. Molecular Cell Biology. 6th ed. United States of America.

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D. & Darnell, J. 2000. Molecular Cell Biology. 4. painos.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21498/>

Malcherey-Nagel, 2013. NucleoBond® Xtra plasmid purification
<http://www.mn-net.com/tabid/1479/default.aspx>

Murphy, S., Skardal, A. & Atala, A. 2012. Evaluation of Hydrogels for Bio-Printing Applications. Journal of Biomedical Materials Research Part A. 272–284.

Pal, K., Banthia, A. K. & Majumdar D. K. 2009. Polymeric Hydrogels: Characterization and Biomedical Applications – A mini review. Designed Monomers and Polymers 12, 197–220.

Phalloidine – Compound Summary, 2013. PubChem Compound. Luettu 18.4.2013.
http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=4752&loc=ec_rcs

Pollard, T. D. & Earnshaw, W. C. 2004 Cell Biology. 1. uudistettu painos. United States of America: Saunders

Rodriguez, F., Cohen, C., Ober, C.K. & Archer, L.A. 2003. Principles of Polymer Systems. 5th ed. United States of America.

Slaughter, B., Khurshid, S., Fisher, O., Khademhosseini, A. & Peppas, N. 2009. Hydrogels in regenerative medicine. Advanced Materials 21, 3307–3329.

Thermo Scientific, 2013. Thermo Scientific TurboFect Transfection Reagent.
www.thermoscientific.com/fermentas

Tibbitt, M. W. & Anseth K. S. 2009. Hydrogels as Extracellular Matrix Mimics for 3D Cell Culture. Biotechnol Bioeng. 655–663.

Työterveyslaitos, 2011. Onnettomuuden vaaraa aiheuttavat aineet: Akryyliamidi. Luettu 18.12.2012.

Wang group protocol: Preparation of polyacrylamide substrates.

us-

ers.ece.cmu.edu/~yuliwang/Methods/Materials/Artificial%20Materials/PAASubstrates.pdf

WHO: Acrylamide. 2012. Health topics. Luettu 18.12.2012.

Yang, T-H. 2007. Recent Applications of Polyacrylamide as Biomaterials. Recent Patents on Materials Science 1. 29–40.

LIITTEET

Liite 1. Wangin protokolla

Tarvittavat liuokset

- 0,5 % glutaraldehydi PBS:ssä
 - 8 % glutaraldehydia
 - PBS (fosfaattipuskuroitu saliini)
 - dH₂O
- 2 % bis-akryyliamidi
- 10 % akryyliamidi
- HEPES (4-(2-hydroksyylietyyli)-1-piperatsiinietaanirikkihappo)
- PBS
- APTES ((3-aminopropyli)trioksylosilaani)
- NaOH
- tislattu vesi
- 70 % etanoli
- Sulfo-SANPAH 1 mg/ml HEPES:ssä (Sulfosuccinimidyyli 6-(4'-atsido-2'-nitrofenyyliamino)heksanoatti)
- APS (ammoniumpersulfaatti)
- TEMED (N,N,N',N'-tetrametyylietyleenidiamiini)
- fibronektiini
- BSA (naudan seerumin albumiini)

Geelien valmistus

1. liekitä haluttu määrä peitinlaseja bunsenpolttimella
2. kasta lasit NaOH:iin ja huuhtelee nopeasti tislatulla vedellä
3. anna lasien kuivua
4. laita kuivat lasit eksikaattoriin
5. ota APTES:a ruiskulla pieneen pulloon
6. aseta avattu APTES-pullo eksikaattoriin lasien kanssa ja laita päälle vakuumi-imu noin 5 minuutiksi
7. sulje vakuumi-imu ja anna inkuboitua noin tunnin ajan

8. peitä lasit glutaraldehydillä
9. inkuboi huoneenlämmössä noin 30 minuuttia
10. poista glutaraldehydi
11. pese huolellisesti tislattulla vedellä
12. sekoita akryyliamidi, bis-akryyliamidi ja HEPES
13. tee liuokselle kaasujen poisto (happi voi inhiboida polymerisaatiota myöhemmin)
14. pese toiset peitinlasit etanolilla ja tislattulla vedellä
15. lisää silanoiduille lasille APS ja TEMED ja heti perään akryyliamidi-bis-akryyliamidi-HEPES-liuos
16. peitä pizarat etanolilla pestyillä lasilla ja odota geelin polymerisoitumista
17. polymerisoitumisen tapahduttua huuhto geelit HEPES:llä
18. poista päällimmäiset lasit varovasti
19. pese uudelleen HEPES:llä
20. poista ylimääräinen neste, mutta älä anna lasien kuivua
21. lisää vastavalmistettu Sulfo-SANPAH geelien päälle
22. laita geelit UV-valon alle 1,5 minuutiksi
23. poista Sulfo-SANPAH ja toista UV-käsittely
24. pese nopeasti HEPES:llä
25. laita fibronektiinitipat kuoppalevyn kannelle ja aseta peitinlasit geelipinta alaspäin pizaroiden päälle, inkuboi tunti 37 °C tai 4 tuntia huoneenlämmössä tai yön yli +4 °C
26. siirrä lasit steriilille kuoppalevylle puhtaaseen laminaarikaappiin
27. huuhtelee geelit steriilillä PBS:lla ja steriloi ne 30 minuuttia UV-valon alla
28. huuhtelee steriilillä HEPES:llä
29. geelit säilyvät jääkaappilämpötilassa käyttökelpoisina viikon (Wang 2013.)

Liite 2. Solujen pinta-alataulukko

Hydrogeeli- alusta	Tal+ 8/0.03	Minital 4 8/0.03	Tal+ lasi	Tal+ 8/0.1	Minital 4 8/0.1	Minital 4 lasi
1	81,31	290,3	234,41	106,76	134,05	495,63
2	71,13	212,64	160,91	165,15	147,13	619,97
3	114,64	286,87	138,82	153,01	143,32	471,21
4	121,92	161,61	185,08	329,98	217,84	316,82
5	160,7	93,99	305,96	91,99	175,98	181,35
6	124,09	71,83	221,73	267,63	143,96	397,15
7	74,43	103,22	205,37	197,49	353,96	421,56
8	206,9	82,43	159,55	181,87	292,51	338,47
9	118,35	116,6	354,81	239,36	405,61	349,16
10	309,6	78,38	111,15	346,9	394,31	203,02
Solujen keskimää- räinen koko	138,31	149,79	207,78	208,41	240,87	379,43
Keskihajonta	72,89146	84,80194	75,4967	86,96911	110,5469	132,8092