

Jarkko Korkealaakso

# Lysosomaalisen kalvoproteiinin kloonaukset ja ilmentäminen hiiren sidekudossoluissa

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioala (AMK)

Laboratorioalan koulutusohjelma

Opinnäytetyö

11.5.2015

Tekijä(t) Otsikko  Sivumäärä Aika	Jarkko Korkealaakso Lysosomaalisen kalvoproteiinin kloonaus ja ilmentäminen hiiren sidekudossoluissa  23 sivua + 4 liitettä 11.5.2015
Tutkinto	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Koulutusohjelma	Laboratorioalan koulutusohjelma
Ohjaaja(t)	Tohtori Eeva-Liisa Eskelinen Taina Suntio Tiina Soininen, lehtori
<p>Opinnäytetyötä tehtiin Helsingin yliopistossa osana laajempaa projektia, missä tutkittiin lysosomin pintaproteiini (LAMP) vaikutusta solun kolesterolikertymille. Lysosomilla tarkoitetaan hajottavaa soluosastoa, mikä on muun muassa solunpinnalta kuroutuvan endosytoosi-rakkulan sisällön loppusijoitus/hajotuspaikka. Oma osaprojektini keskittyi LTL3-kimeerin kloonaukseen ja ilmentymiseen hiiren sidekudossoluissa.</p> <p>Kloonatessa geenijuosteita tai osia geeneistä liitetään yhteen biotekniikan menetelmillä aikaan saaden kimeerisiä yhdistelmägeenejä. Yhdistin fluoresoivat merkkiproteiineja koodaavat geenit RFP-eGFP ja kalvon läpäisevää osaa koodaavan palan geenistä TGN38 yhteen LAMP1 proteiinin solulimassa sijaitsevan C-terminaalista häntää koodaavan geenin osan kanssa, muodostaen yhdistelmägeenin LTL3. Lisäksi kimeeriin kuului LAMP-2 geenin signaalisekvenssi, mikä ohjaa yhdistelmägeenin proteiinituotteen solukalvostolle ja sitä kautta eritysureitille. Ilmentymisen paikallistumiseen aitotumallisessa solussa käytin fluoresoivaa proteiinia RFP, mikä emittoi punaista ja eGFP, mikä emittoi vihreää valoa eksitoituessaan fluoresenssimikroskoopissa. Näillä reportteriproteiineilla voidaan seurata kimeeriproteiinin liikkumista soluissa. eGFPn fluoresenssin tiedetään sammuvan lysosomien happamassa pH:ssa, kun RFPn fluoresenssi kestää happamia oloja kauemmin.</p> <p>Kimeeriä ilmenettiin LAMP1- ja LAMP2- poistogeenisissä hiiren alkion sidekudossoluissa ja merkkiproteiinikertymistä seurattiin fluoresenssimikroskoopilla eri ajankohtina ilmentymisen aikana.</p> <p>LAMP-proteiinin paikallistumista solussa myöhäiseen endosomiin ja lysosomiin ohjaavat osat sijaitsevat C-terminaalisisessa hännässä. Kimera olikin havaittavissa endosyyttisissä osastoissa perustuen vihreän fluoresenssin himmenemiseen punaisena fluoresoivilla alueilla, mitkä yhteispaikantuvat myöhäisen endosomin lipidin BMP ja LIMP2; endosomiproteiinin kanssa. Yhteispaikantuminen oli runsaampi BMPn kanssa perustuen Image Pro mittauksiin. LTL3n kalvonläpäisevä vesipakoisen osaproteiinin pituus aminohapoissa oli lyhyempi kuin alkuperäisen LAMP-proteiinin ja aminohapposekvenssi oli erilainen. Kimeerin havaittiin kertyvän huomattavissa määrin Golgiin, minne endogeeniset LAMP-proteiinit eivät normaalisti kerry. Johtuiko kertyminen lyhyemmästä kalvonläpäisevästä osasta vai lumenalisen LAMP-proteiinin N-terminaalisen pään puutteesta ei tutkittu. Teorian mukaan proteiinit saattavat muodostaa Golgissa lauttoja tunnistautumalla Golgin sisäisillä proteiini-proteiini interaktioilla, mitkä yhteisvaikutukseltaan nopeuttavat Golgista poistumista tai vahvistavat Golgiin jäämistä. Tämä, kuten myös kimeerin vaikutus kolesterolin kertymiseen ovat avoimia kysymyksiä, joihin vastaus saadaan jatkotutkimuksista.</p>	
Avainsanat	Lysosomi, kalvoproteiini, emitointi, fluoresenssimikroskopia

Author(s) Title	Jarkko Korkealaakso Cloning of the lysosomal membrane protein and the expression of mouse connective tissue cells,
Number of Pages Date	23 pages + 4 appendices 15 May 2015
Degree	Bachelor of Laboratory Sciences
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructor(s)	PhD. Eeva-Liisa Eskelinen Taina Suntio Tiina Soininen, Senior lecturer
<p>This Theses was carried out at the University of Helsinki as part of a larger project, which studied how the membrane protein of the lysosome (LAMP) affects the cholesterol that is stored in the cell. The lysosome means degrading cell compartment, which contents of the vesicle endocytosis-pinch off of, inter alia, from the cell surface repository/cleavage.</p> <p>My sub-project focused on LTL3 chimera cloning and expression of mouse fibroblastic cells. In cloning gene strands or parts of gene are joined by methods of biotechnology providing a combination of chimeric genes. The combiner fluorescent marker proteins encoded by genes such as RFP-eGFP and transmembrane parts of the gene encoding TGN38 one piece with LAMP1 in the cytoplasm of the protein c-terminal tail of the coding portion of the gene, to form a recombinant gene LTL3. In addition, the chimera was the signal sequence LAMP2 gene which controls the recombinant gene protein product to the cell membrane and through the secretory pathway. Expression localization in eukaryotic cell I used a fluorescent protein RFP, which emits red light and eGFP, which emits green light as it comes out of the fluorescence microscopy. With these reporter proteins chimeric protein can follow the movement of the in cells. eGFP's fluorescence is known to turn off the lysosomal acidic pH, the fluorescence RFP's will last longer in acidic conditions. Chimera was expressed on LAMP1- and LAMP2- knockout mouse embryonic fibroblastic (MEF) – cells and accumulation of marker protein was monitored by fluorescence microscopy at different time points during expression.</p> <p>LAMP localization of the protein in the cell and the late endosome to the lysosome guiding elements are located in the C-terminal tail. Chimera was a noticeable at endocytic compartments based on red fluorescent areas of green fluorescent obscuration, which both localized at the late endosomal lipid BMP and LIMP2, with the endosome protein. Co localization was abundant based on the BMP's Image Pro measurements. Part of the LTL3's protein's transmembrane hydrophobic amino acids was shorter than the original LAMP protein and amino acid sequence was different. The chimera was found to accumulate a considerable extent Golgi, where endogenous LAMP proteins do not normally accumulate. Was the result due to the N-terminus of the luminal LAMP protein was not investigated. The theory is that proteins may form ferries in the Golgi by identifying intra-Golgi protein-protein interactions, which takes the effect to accelerate the Golgi exit or confirm the Golgi residues. This, as well as the chimera effect on the accumulation of cholesterol are both open questions to which require further studies.</p>	
Keywords	Lysosome, membrane protein, emit, fluorescence microscopy

## Sisällys

Lyhenteet	1
1 Johdanto	2
2 Teoria	3
2.1 Lysosomit	3
2.1.1 Endosyyttinen liikenne eukariotissoluissa	4
2.1.2 Lysosomien toiminnan säätely	6
2.1.3 Lysosomaaliset sairaudet	6
2.2 Kloonaus	7
2.3 Proteiiniexpressio tutkimusmenetelmiä	9
2.3.1 Mikroskopointi	9
2.3.2 Soluviljelmät	10
3 Työn suoritus	11
3.1 Kloonaus	12
3.2 Soluviljely	15
3.3 Sykloheksimidikäsittely	15
3.4 Immunofluoresenssimikroskopia	16
4 Tulokset	17
5 Johtopäätökset	22
Lähteet	23
Liite 1 Kohdegeenin LTL3 onnistunut digestiokaavio	
Liite 2 LTL1 plasmidin digestiokaavio	
Liite 3 LTL1 plasmidikartta	
Liite 4 RFP-eGFP-LC3 plasmidikartta.	

## Lyhenteet

LTL3	Kloonaustuote, joka on yhdistelmä vektorista LTL1 ja insertistä RFP-eGFP
CHX	Sykloheksimidi-yhdiste, jolla pystytään lopettamaan solujen proteiinien tuotanto ja liian pitkään käytettynä tappamaan soluja
LIMP2	Vasta-aine, jolla voidaan tunnistaa lysosomit ja myöhäiset endosomit
LAMP	(Lysosome-associated membrane protein) Lysosomin kalvoproteiini

## 1 Johdanto

Bakteerien geneettinen perimä on yleensä tallennettuna DNA:han ja sen kopiointi on tärkeää bakteerin perinnöllisten ominaisuuksien säilymisen kannalta. Geenin ekspressoitumiseen liittyy sen transkriptio DNA:sta lähetti-RNA:ksi ja lähetti-RNA:sta proteiiniksi. Bakteerin kromosomaalinen perimä on yleensä ympyrän muodossa ja toimii itseään kopioivana osana. Bakteerin perimän ulkopuoliset osat, kuten plasmidit ja bakteriofagit ovat DNA:ta, jonka mukana tulee joitakin bakteerin ominaisuuksia. Tällaisia voisivat olla esimerkiksi antibioottiresistenssi tai viruspartikkeleiden tuotanto.

Bakteerien koko genomi määrittelee organismin genotyypin, kun taas sen havaittavissa olevien ominaisuuksien avulla voidaan määritellä sen fenotyyppi. Mutaatiot ovat perinnöllisiä ja voivat tapahtua spontaanisti, kemikaalin tai fysikaalisen käsittelyn johdosta. Organismeja, joilla on luonnonmukainen genotyyppi, kutsutaan villiksi tyypiksi ja tästä perimältään eroavia mutaatioita omaavia mutanteiksi. Kasvatusolosuhteilla, kuten esimerkiksi kasvatusmedialla, voidaan vaikuttaa siihen, minkä fenotyypin omaavat bakteerisolut selviävät.

Bakteereilla geneettinen vaihtelu voi tapahtua useita eri reittejä pitkin. Transformaatiossa bakteeri ottaa vastaan solun ulkopuolelta tulevaa DNA:ta. Transduktiossa soluun tuleva DNA on pakattuna bakteriofageihin, jotka tunkeutuvat bakteerisoluuun. Konjugaatiossa luovuttajabakteeri luovuttaa DNA:ta toiselle bakteerille. Rekombinaatiossa taas luovuttajan ja bakteerisolun oma DNA muodostavat yhdessä uudenlaisen genomin. [1]

Opinnäytetyöni aiheeksi valitsin lysosomaalisen kalvoproteiinin kloonauksen ja ekspresion eli sen ilmentymisen transfektoidussa solussa. Aiheen valinnassa minua kiinnostavat kloonaukseen kuuluvat haasteet ja siihen liittyvien tehtävien monipuolisuus. Lisäksi soluviljelystä ja mikroskopoinnista saatava harjoitus ja kokemus ovat henkilökohtaisesti kiinnostavia ja tulevaisuuden työelämää varten varmasti hyödyllisiä. Opiskeluaikanani laboratorioissa ja oppitunneilla käydyistä menetelmistä tässä projektissa pystytään käyttämään hyväksi valtaosaa.

Opinnäytetyö tehtiin työharjoittelussa Helsingin yliopiston biotekniikan instituutissa Viikissä Eeva-Liisa Eskelisen laboratorioissa. Työ oli osa suurempaa kokonaisuutta, jossa tutkittiin, kuinka lysosomin kalvoproteiini vaikuttaa soluun kertyvän kolesterolin määrään.

Tämän tavoitteen saavuttamiseksi projektin parissa työskenneltiin koko työharjoittelun ajan ja omaa aikataulua sen pohjalta muokaten.

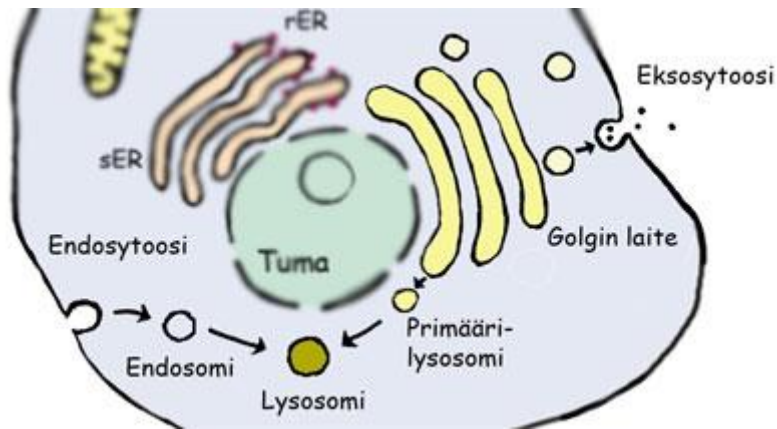
## 2 Teoria

### 2.1 Lysosomit

Lysosomit ovat pyöreitä halkaisijaltaan 0,5 µm kokoisia soluorganelleja, jotka sisältävät laajan valikoiman entsyymeitä, joilla se voi hajottaa polymeerejä: proteiini, nukleiinihappoja, hiilihydraatteja ja rasvoja. Terminä ”lysosomi” tarkoittaa vapaasti käännettynä lyyttistä eli hajottavaa kappaletta. Lysosomissa on alhainen pH 4,5 - 5, jota ylläpitää sen kalvon protonipumppu.

Yksinkertaisimmillaan lysosomin rakennetta voi kuvailla sanoilla tiheä pallonmuotoinen vakuoli, vaikkakin niiden koko ja muoto vaihtelee digestioimien tuotteiden perusteella. Suurin osa lysosomaalisten entsyymien harjoittamasta hajotustoiminnasta tapahtuu lysosomien ja myöhäisten endosomien muodostaessa yhdessä hybridiorganellin.

Lysosomit ovat morfologialtaan laajakirjoinen joukko, jonka tehtävä on hajottaa solunsisäisiä yhdisteitä (kuva 1). Lysosomeilla on solussa monia muitakin tehtäviä, kuten aktiivisten entsyymien vapautus solun ulkopuolelle ja ohjattuun solukuolemaan säätelyyn. Autofagosytoosissa lysosomit pitävät yllä solun sisäistä tasapainoa. [2;3.]

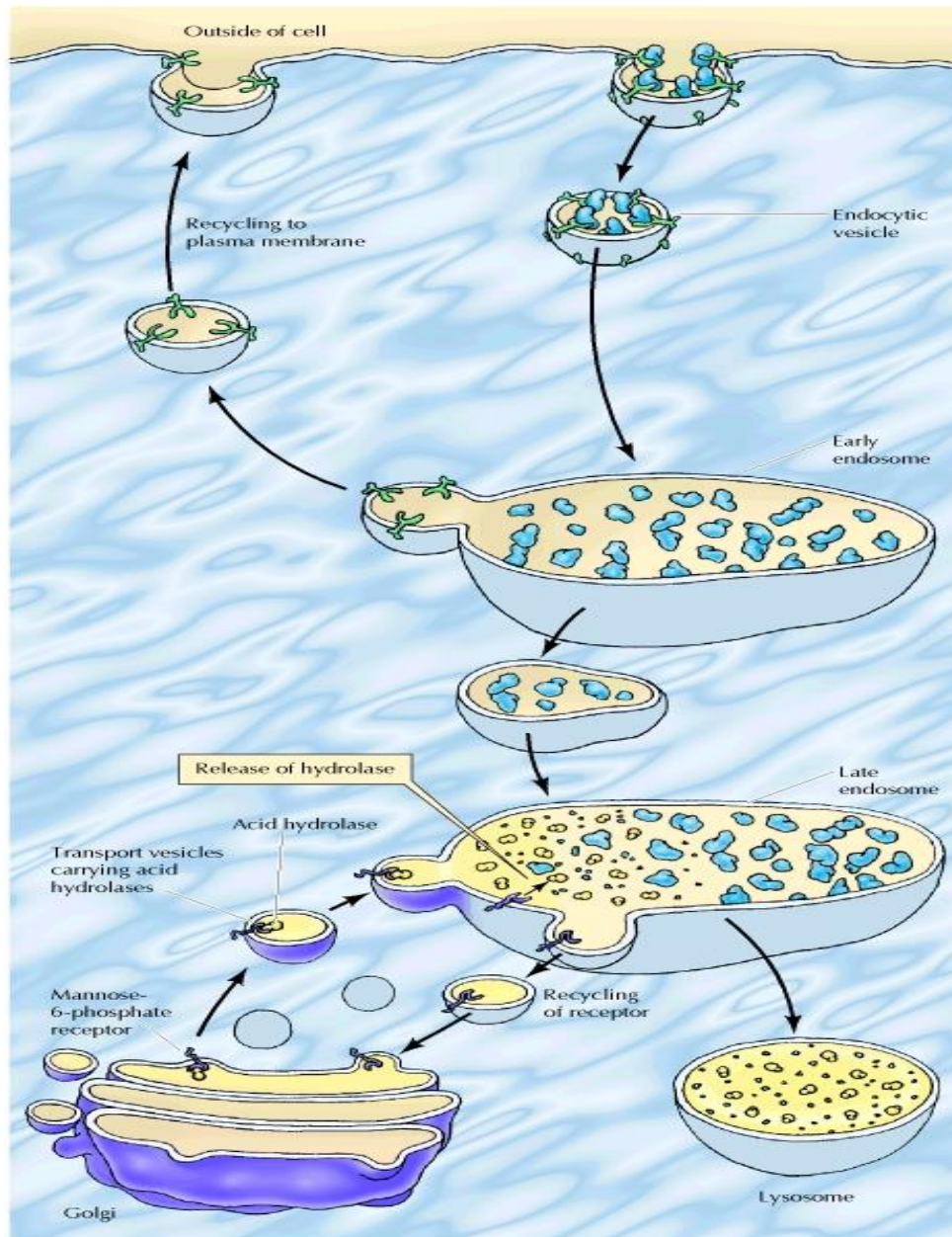


**Kuva 1 Lysosomin toiminta solussa [4]**

### 2.1.1 Endosyyttinen liikenne eukarioottisolussa

Endosyyttinen liikenne alkaa, kun kalvon ulkopuolinen aines tulee kontaktiin kalvonselän kanssa ja endosominen rakkula, joka on erotettu solunpinnasta ottaa sen vastaan. Endosytoosireittejä on ainakin kolme erilaista. Nämä ovat klatriini-välitteinen, fagosytoosi ja makropinosytoosi. Makropinosytoosia lukuunottamatta endosyyttinen muuttoliike tapahtuu niille spesifisissä reseptoreissa solukalvolla. Muodostuneet endosytoottiset rakkulat käyvät läpi maturaatio- ja lajitteluprosessin, joiden jälkeen ne muuttuvat varhaisiksi endosomeiksi (EE), kuten kuvassa 2. Varhaiset endosomit tavallisesti sisältävät yhden suuren vakuolaarisen domeinin ja useita pienempiä alueita, vaikkakin suurin osa plasmamembraanin reseptoreista käy tavallisesti läpi kierrätys- ja lajitteluvaiheet, partikkelit, joita endosomit kuljettavat edelleen tai siirtävät hajotettavaksi, säilytetään joko sen sisällä tai ulkopinnalla sijaitsevilla endosomeissa.





**Kuva 2 Lysosomin muodostuminen endosytoosista [6]**

Lajittelun jälkeen varhainen endosomi käy läpi maturaatiovaiheen, jonka aikana endosomin rakkula maturoituu ja kalvon happotasapaino asettuu noin pH 6:een. Tämän jälkeen niistä muodostuu myöhäisiä endosomeja (LE). Myöhäisen endosomin monikalvoinen rakenne syntyy intraluminaalisista kalvoista. Kuljetusrakkulat Golgin laitteesta kantavat mukanaan lysosomiin kulkevia hydrolyyttisiä entsyymeitä, kuten esimerkiksi lysosomaalinen pintaproteiiniin Limp2. Saapuessaan hydrolyyttiset entsyymit eroavat reseptoreistaan happaman ympäristön takia. Tämän aikana kalvon reseptorit matkaavat takaisin Golgin laitteeseen uutta sykliä varten.

Myöhäiset endosomit pystyvät maturaatiovaiheen läpi käymällä muuttumaan lysosomeiksi. Myöhäiset endosomit käyvät läpi happamuutta muuttavan reaktion vakuolaarisen-H tyypin –ATPase (V-ATPase):n protonipumpun fuusioitumalla jo olemassa olevan lysosomiin. Varhaisten endosomien ja lysosomien pintaproteiinit ovat pitkälti samanlaisia, mutta suurin ero elinten välillä on niiden välinen luminaalinen pH. Myöhäisellä endosomilla luminaalin pH on noin 5 - 6, kun lysosomin pH on noin 4,5 - 5. Lysosomien happamuus onkin suuressa roolissa niiden suorittamassa hajotusprosessissa. Solun ulkopuolinen ja plasmamembraanin kuljettama aines kuljetetaan lysosomeihin endosytoosista reittiä pitkin. Myöhäisten endosomien lisäksi lysosomit vaativat myös sytoplasmaa autofagosomeista hajotusoperaation aikana. Autofagit, jotka sisältävät solun sisäistä ainesta kuten soluorganelleja, fuusioituvat lysosomin kanssa näin muodostaen autolysosomin. Autolysosomin autofagisubstraatit hajotetaan niiden uudelleen käyttöä varten. Lysosomien hajottama aines vapautuu sytosoliin membraanitransporttereiden ja kanavien avulla tai siirretään Golgin laitteeseen uudelleen käyttöä varten. [5.]

### 2.1.2 Lysosomien toiminnan säätely

Vaikka endosomien ja lysosomien aloitus- ja lopetussignaaleita ei tunneta vielä kovinkaan hyvin, joitakin avaintekijöitä voidaan tunnistaa. Näihin kuuluvat pienet GTP:aasit, fosfonositaasit ja  $Ca^{2+}$ -ionit. GTP:aasit toimivat reaktiossa sen säätelijöinä ja kytkiminä, jotka muuttuvat GTP:n toiminnan mukaan. Nämä säätelijät määräävät endosomaalisen kuljetuksen suuntaa ja sen spesifisyyttä. [7.]

### 2.1.3 Lysosomaaliset sairaudet

Eukarioottisolussa soluseinämän läpikulkuprosessi vaatii useamman erilaisen proteiinin, kalvolipidin ja ionin yhteistyötä. Prosessi kulkee endosyyttisen portin (*endocytic trafficking*) läpi ja siinä esiintyvät erilaiset häiriöt yleensä johtavat ihmisillä moniin erilaisiin endosomi- ja lysosomiperäisiin sairauksiin. Normaaliin prosessiin kuuluu useita erilaisia vaiheita, kuten endosytoosi, solunsisäisen kalvon fuusio ja fissio, rakkulaliikkuvuus ja eksosytoosi.

Esimerkiksi LIMP2-proteiinin (*Lysosomal integral membrane protein-2*) puute aiheuttaa AMRF-syndrooman (*Action Myoclonus-Renal Failure Syndrome*), mikä tarkoittaa

munuaisten vajaatoiminta-oireyhtymää. LIMP2-proteiinin normaali tehtävänä on toimittaa glukosereprosidaasi (GBA) lysosomiin. [7.]

## 2.2 Kloonaus

Geenin kloonauksessa ulkopuolinen geeni liitetään vektoriin ja uuden rekombinanttigeenin sisältävä vektori pyritään siirtämään bakteerisolun sisään. Onnistuneet kloonaustuotteet pystytään erottamaan selektion avulla; joko niiden sisältämän juosteen tai fenotyypin antaman ominaisuuden avulla. Rekombinantti-DNA ja geenien kloonaus on tärkeä työkalu niin molekyyli-mikrobiologiassa kuin lääketieteessä. Sovelluksia on useita erilaisia, kuten esimerkiksi: uusien rokotteiden, diagnostisten testien tai erilaisten hoitomenetelmien kehitys

Kaksi geneettisen materiaalin tärkeintä tehtävää on replikoituminen ja ekspressoituminen. Replikaatioprosessin tulee olla niin tarkka, että jälkeläinen jakaa isäntäsolun (genotyypin) geneettiset ominaisuudet. Tietyn geneettisen materiaalin ekspressio määräytyy sen kasvuolosuhteiden pohjalta, joiden avulla voidaan tarkastella elion fenotyyppiä. Erilaisten lajien DNA-sekvenssien samankaltaisuutta vertaamalla voidaan määrittellä kuinka läheistä sukua ne ovat toisilleen.

Plasmidit replikoneja, jotka ovat erillisiä ekstrakromosomaalisia geneettisiä elementtejä bakteerissa. Yleensä plasmidit ovat kooltaan huomattavasti pienempiä kuin bakteerin kromosomit. Kun plasmidit ovat noin alle viidestä yli useaan sataan kiloemäspariin (kb), vaikka ne ovatkin kooltaan yhtä suuria kuin 2 Mbp joissakin bakteereissa. Plasmideja käytetään molekyylibiologiassa vektoreina ja niiden ansiosta voidaan bakteereille antaa erilaisia ominaisuuksia, esimerkiksi antibioottiresistenttisyys. Useimmat plasmideista ovat monikierteisiä, pyöreitä, kaksijuosteisia DNA-molekyylejä, mutta on myös osoitettu, että lineaarisiakin esiintyy. Läheistä sukua toisilleen olevat tai ihan samanlaiset plasmidit eivät pysty asettumaan saman bakteerisolun sisään. Plasmideja, jotka tuovat isäntäsolulle antibioottiresistenssisyyden, kutsutaan R-plasmideiksi. Plasmidien

profiileja vertaamalla voidaan mahdollisia sukulaissuhteita eri kantojen välillä epidemiologisissa tutkimuksissa. [1.]

Transformaatiossa bakteerisolu ottaa vastaan solun ulkopuolelta tulevaa DNA:ta. Jotta transformaatioreaktio olisi mahdollista, on DNA-molekyylin oltava vähintään 500 nukleotidin pituinen. Bakteerin otettua plasmidin sisäänsä se kykenee kopioimaan sitä muun perimäaineksen tahdissa ja näin ollen tuottamaan haluttua sekvenssiä. Bakteerien kykyä ottaa vastaan solun ulkopuolista DNA:ta ja kykyä tulla transformaatioon kutsutaan kompetentiksi. Kompetentti vaihtelee bakteerien fysiologisen tilan mukaan ja useat bakteerit, jotka normaalisti eivät ole kompetenttisiä, voidaan laboratorio-olosuhteissa sellaisiksi muokata. Tällaisia menetelmiä ovat esimerkiksi: Kalsium-käsittely ja lämpöshokki tai altistaminen sähköpulsseille. [1.]

Kloonauksessa käytetään useita erilaisia vektoreita, joita voidaan myös itse muokata liittämällä tarpeellisia sekvenssejä uusien ominaisuuksien aikaan saamiseksi. Reeves työtovereineen (1998) on kehittänyt vektorin, johon oli liitetty membraaniproteiini TGN38 ja lysosomaalinen glykoproteiini 120 (Igp120). Aiemmissä tutkimuksissa on pystytty osoittamaan, että tyypin 1 membraaniproteiini TGN38 ja Igp120 pintaproteiinit, joihin on liitetty reporterimolekyylejä, siirtyvät solussa Trans-Golgi-verkostoon (TGN) ja edelleen lysosomeihin. Membraaniproteiinin ohjautumiseen solussa pystyttiin vaikuttamaan muuttamalla lumenaalin ja transmembraanialue Igp120:een. Transmembraanialueen ja sytosolisen TGN-osan läsnä ollessa proteiini kulkeutuu TGN:ään. Lumenaali ja sytosolinen osa proteiinista taas johtavat siihen, että pintaproteiini päätyy lysosomiin. Sytosolinen osa Igp120 ohjaa pintaproteiinin lysosomiin, kun taas transmembraanialue ja sytosoliset osat TGN38:sta myötävaikuttavat lajitteluun ja kuljetukseen trans-golgi-verkostossa. [8.]

## 2.3 Proteiiniekspression tutkimusmenetelmiä

### 2.3.1 Mikroskopointi

Useimmissa mikroskopiitekniikoissa saadaan erilaisia näkökulmia kohdesolusta käyttämällä eri resoluutioita. Resoluution minimiarvo valomikroskoopissa on noin 0,2  $\mu\text{m}$  ja skannaavassa elektronimikroskoopissa 10 nm. Tärkein asia mikroskopiassa ei kuitenkaan ole kohteesta saatava suurennos, vaan sen mahdollistama kahden lähekkäin olevan objektin tarkastelu eli erotuskyky tai resoluutio. Pelkästä kuvan suurentamisesta ei ole hyötyä, jos kuva itsessään on epätarkka.

Mikroskoopin eri linssien tarjoama resoluutio on yhdenmukainen sen antamaan  $D$  arvoon eli kuinka lähellä toisiaan olevia objekteja pystytään minimissään linssillä tarkastelemaan. Mitä pienempi on  $D$ :n arvo sitä parempi resoluutio.  $D$ -arvoon vaikuttaa kolme erilaista tekijää: Ensimmäinen näistä on se, missä kulmassa valo tulee linssiin näytteen alta. Toinen on kuinka paljon ilmaa tai nestettä on linssin ja näytteen välillä. Kolmas tekijä on aallonpituus, jolla näyte emittoi valoa. Näiden kolmen tekijän vaikutusta voidaan laskea kaavalla  $D = (0.61\lambda) \div (N \times \sin \alpha)$ , jossa  $\alpha$  on valon kulma,  $N$  on valon kulkema matka ja  $\lambda$  on aallonpituus. Valon kulmaan voidaan vaikuttaa siirtämällä linssiä lähemmäs näytettä, jolloin kulma ja linssiin tulevan valon määrä kasvaa ja  $D$ :n arvo pienenee. Linssin ja näytteen väliseen tilaan voidaan vaikuttaa siirtämällä mikroskoopin linssi näytteen välittömään läheisyyteen käyttämällä esimerkiksi immersioöljyä, jolloin resoluutio paranee. Näytteen emittoiman aallonpituuden vaikutus taas on se, että mitä pienempi aallonpituus, sitä parempi resoluutio.

Mikroskopoitavat näytteet ovat usein alkoholi- tai formaldehydi-yhdisteillä fiksattuja, jolloin suurin osa proteiineista ja aminohapoista denaturoituvat. Yksi kaikkein monipuolisimmista ja parhaista tekniikoista on tekniikka, jonka avulla voidaan lokalisoida proteiineja, jotka on fluoresenssimerkitty ja joita on mahdollista tarkkailla fluoresenssimikroskoopin avulla. Fluoresenssimikroskopiaa voidaan myös käyttää vielä elossa olevissa soluissa. Tutkimuksissa on todettu, että solut, joissa on merkattuja molekyyliä, eivät eroa toiminnaltaan normaaleista soluista. Fluoresenssimikroskopian avulla pystytään tarkastelemaan tiettyjä proteiineja ja soluorganelleja fiksatuissa

soluissa fluoresenssin värjäyksen tai vasta-ainevärjäyksen avulla (immunofluoresenssimikroskopia). [9.]

Limp2-proteiini toimiessa glukoserebrosidaasin (GBA):n välittäjänä solussa sen on todettu olevan tärkeä osa lysosomin toimintaa. SCRAB2-geeni koodaa LIMP2-proteiinia ja se on välttämätön lysosomien ja endosomien elintoiminnoille ja niiden ylläpitoon. SCRAB2-geenissä esiintyvät mutaatiot onkin yhdistetty moniin sairauksiin. Limp2-proteiini on myös lysosomispesifinen, joten sitä vastaan tuotettuja vasta-aineita voidaan käyttää hyväksi lysosomeja paikannettaessa solussa. [10.]

Reportterigeenit yleensä koodaavat fluoresoivia proteiineja (FP), jotka emittoivat fluoresoivaa valoa tietyllä aallonpituudella. Niitä käytetään yleisesti erilaisissa fuusioproteiineissa, jotta niiden lokalisoitumista solussa pystytään seuraamaan. Maailmassa on useita erilaisia reportteriproteiineja, jotka kukin kykenevät emittoimaan valoa fluoresoivaa valoa omalla aallonpituudellaan. Yleisesti käytetään punaista valoa fluoresoivaa (RFP) ja vihreää valoa fluoresoivaa (eGFP). Näitä yhdessä käytettäessä pystytään tarkkailemaan useita erilaisia proteiineja tai yhtä proteiinia erilaisessa tilanteessa olevaa saman aikaan. [11.]

### 2.3.2 Soluviljelmät

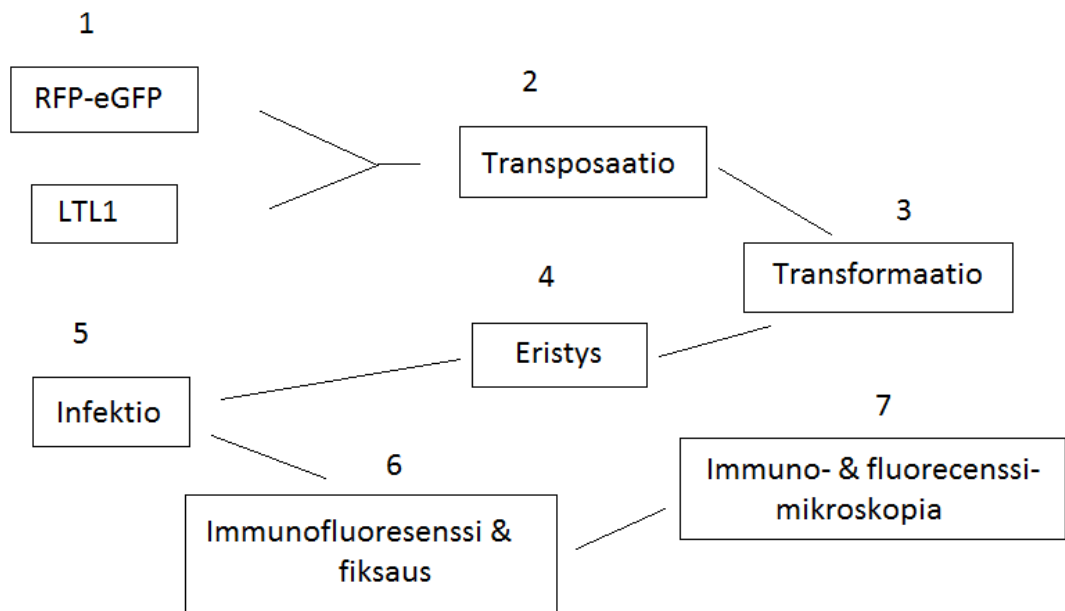
Soluviljelytekniikoiden avulla on mahdollista tutkia solujen elintoimintoja kontrolloidussa olosuhteissa. Tällaisia soluja ovat erilaiset kasvi-, eläin- ja bakteerisolut, joita on mahdollista kasvattaa *in vitro*-laboratorio-olosuhteissa. Laboratorio-olosuhteissa kasvaakseen solut vaativat tarkasti säädellyt ravintoaineiden, lämpötilan ja pH-arvon.

Soluja on mahdollista kasvattaa suspensiossa tai kiinteällä alustalla. Suspensiossa pystytään kasvattamaan suurta määrää soluja, mutta eräät solut kuten eläinsolut eivät pysty kasvamaan ilman kiinteätä alustaa. Tällaisia solulinjoja kasvatetaan kasvatusliuoksessa peitetyissä pulloissa tai maljoissa, jossa ne kasvattavat yksisolukerroksen. Bakteerit taas voidaan kasvattaa niin suspensiossa kuin puolikiinteän kasvatusmedian pinnalla, jossa se kasvaa yksittäisten bakteerien muodostamissa pesäkkeissä. [12.]

Geneettisesti manipuloidut hiiren alkion solut eli MEF (*Mouse Embryonic Fibroblast*) -solulinjan solut ovat tehokas työkalu, kun tutkitaan geenien molekyylimekanismeja proteiinien toiminnassa ja solujen signaloinnissa. [13.]

### 3 Työn suoritus

Vuokaaviossa (kuvassa 3) kuvataan projektin etenemistä sen pääkohtien läpi käynnissä. Kohdassa 1 kuvaa 3 käydään läpi insertin (RFP):N ja vektorin (LTL1) PCR- reaktioita ja geelistä eristystä. Sittemmin seuraa transposaatioreaktio, jonka aikana juosteet yhtyvät. Transformaatiossa juuri kloonattu solu siirretään bakteeriin monistumaan ja eristyksessä kerätään bakteerin kasvattamat vektorit talteen. Tämän jälkeen klooni siirrettiin +/- MEF-soluihin, joiden annettiin ekspressoitua suurin piirtein kaksi päivää. Kohdat 1-4 ovat kertovat kloonauksesta ja 5-7 proteiinin ekspressoinnista.



Kuva 3. Kloonauksen työvaiheet

### 3.1 Kloonaus

Alla olevassa taulukossa 1 kuvataan vektorin PCR alukkeiden ominaisuuksia.

**Taulukko 1. Alukkeet**

Alukkeet			
Aluke	T <sub>m</sub> (C°)	Sekvenssi	Koko(bp)
LTL1 TM-F	64	GTACAGGACGGTAACAACATGGT	23
LTL1 SSR	63,6	CCCCAGCACTGTTCGAG	17

Projektissa haluttiin PCR-reaktion avulla kopioida vektori, joka sisältää fluoresoivat ja vektorin LTL1- sekvenssin osat kuten TGN ja LAMP1 kohdat(Liite 1). Tehtävää varten valittiin kaksi alukeparia, joiden avulla nämä kaksi erilaista templaattia kopioitiin.

**Taulukko 2 Vektorin PCR-reaktio**

PCR Pipetointi		
Reagenssi	Määrä(μl)	Lopullinen pitoisuus
MgCl <sub>2</sub>	4	0,8
GC-puskuri	10	1x
dNTP	1	200μM
Templaatti	5	0,17mg/μl
Oligo TMF	2,5	0,5μl
Oligo SSR	2,5	0,5μl
H <sub>2</sub> O	15	-
Total volume	40	
Mix		
Phusion DNA Polymeraasi	2,5	0,02U/μl
H <sub>2</sub> O	47,5	
Total volume	50	10μl/sample



Alla olevassa PCR-ohjelmassa (Taulukko 3) Phusion DNA-polymeraasi lisättiin vasta esidenaturaatio vaiheen jälkeen.

**Taulukko 3. Vektorin PCR-ohjelma**

PCR-Ohjelma		
Lämpötila (C°)	Aika(s)	Syklit
98	60	
98	10	x40
66,8	30	
72	180	
72	900	

Insertin PCR-reaktiossa (Taulukko 4) monistettiin reportterigeenit RFP ja eGFP sekä light chain 3 (LC3) eli kokonaisuudessaan (RFP-eGFP-LC3). Insertin koon pitäisi kaiken kaikkiaan olla noin 1400 bp.

**Taulukko 4 Insertin PCR-reaktion pipetointi**

PCR Pipetointi		
Aine	Määrä(μl)	Lopullinen pitoisuus
GC-puskuri	10	1x
dNTP	1	200μM
Templaatti	5	0,17mg/μl
Oligo Linker joint LTL1	2,5	0,5μl
Oligo RFP joint to SS LTL1	2,5	0,5μl
H <sub>2</sub> O	15	-
Total volume	40	
Mix:		
Phusion DNA Polymeraasi	2	0,02U/μl
H <sub>2</sub> O	18	
Total volume	20	5μl/sample

Taulukossa 5 on PCR-ohjelma, jonka mukaan näyte ajettiin. Esidenaturaation eli ensimmäisen minuutin +98 °C olon jälkeen näytteeseen lisättiin laimennettu polymeraasientsyymi (esitetty taulukossa 4).

**Taulukko 5. Insertin PCR-ohjelma**

PCR-Ohjelma		
Lämpötila(C°)	Aika(s)	Syklit
98	60	
98	10	
67	30	
72	60	x40
72	900	

PCR-tuotteet pipetoitiin ja ajettiin 1 % agarosigeelillä, jonka jälkeen irtileikatut geelipalat ja niissä olleet templaatit eristettiin GeneJET Gel Extraction Kit -kitin ohjeiden mukaan (cat: K0691).

Vektorit ja insertit yhdistettiin Takara Bio Companyn Infusion -kaupallisen kitin ohjeiden mukaan muuten paitsi, että reaktio tehtiin alla olevan taulukon 6 mukaan. Kontrollireaktio liuoksesta insertin tilalle lisättiin laboratoriovettä.

**Taulukko 6 In fusion transposaatio -reaktio**

In fusion reaktioliuos Pipetointi		
Reagenssi	Määrä(µl)	Lopullinen pitoisuus
In fusion mix(5x)	2	1x
Vektori	5	10,8ng/µl
Insertti	1	5,4ng/µl
H <sub>2</sub> O	2	-
Total volume	10	

Transformaatio soluihin hoidettiin pipetoimalla taulukon 6 reaktioseos kompetenteille In fusion -kitin soluille jääkylmillä kärjillä, jonka jälkeen solujen annettiin sulaa jäällä. Solujen sulettua pipetoitiin jääkylmää reaktioliuosta soluille varovasti sekoittaen välttämällä ilmaa. Reaktioliuoksen lisäyksen jälkeen solujen annetaan seisoa kolmekymmentä minuuttia jäällä, jonka jälkeen solut vietiin 45 sekunniksi +42 °C eli niille annettiin lämpöshokki. Shokin jälkeen solut siirrettiin kolmeksi minuutiksi jäälle, jonka jälkeen soluainekseen lisättiin lämmitettyä SOC-mediumia, jossa bakteerien oli tarkoitus kasvaa tunnin ajan ravistuksessa +37 °C.

Tunnin inkuboinnin jälkeen solut sentrifugoitiin nopeasti pohjalle 6 sekuntia täysillä ja ylimäärä SOC-mediasta (450 µl) poistettiin ja solut resuspensoitiin lopputilavuuteen. Suspensoidut solut maljattiin LB-maljalle. LB-maljalle oli lisätty ampicilliiniä (100 µg/ml) selektiiviseksi antibiootiksi. Maljalla kasvaneista soluista tehtiin puhtasviljelmät, joiden DNA eristettiin Plasmid DNA purification nucleobond Xtra midi -kitin ohjeiden mukaan.

LTL1-RFP-eGFP-LC3 fuusiotuotteen tarkistamiseksi näyte digestoitettiin *Nco1*-fastdigestentsyymillä. Standardina käytettiin Thermo Scientificin GeneRuler DNA Ladder Mix (Cat:#SM0331) -seosta.

### 3.2 Soluviljely

Projektissa käytettiin *-/-*-MEF (*Mouse Embryonic Fibroblasts*) -solulinjaa, jolla suoritettiin valtaosa mikroskopoinnista. Solujen kasvatuksessa käytettiin DMEM-kasvatusmediumia, jossa oli korkea määrä glukoosia, 10 % FCS ja 1x penisilliini streptomysiini (fungizone 1:200) -antibiottiseosta. Solut kasvatettiin + 37 °C –asteisessa soluviljelykaapissa, jossa oli noin 5 % hiilidioksidipitoisuus.

Solujen transfektiossa käytettiin hyväksi Polyplus-transfection SA:in valmistamaa jetPRIME® Transfection Reagent -kittiä (CAT 114-75C), jonka ohjeiden mukaan reaktiot suoritettiin.

### 3.3 Sykloheksimidikäsittely

Työssä pyrittiin määrittelemään tuotetun proteiinin määrä ja sen lokalisoituminen nisäkässoluissa. Projektissa sykloheksimidin (CHX) avulla pyrittiin lopettamaan

proteiinituotanto solussa. Tällöin uusia proteiineja ei synny ja jo olemassa olevat proteiinit siirtyvät Golgin laitteesta lysosomeihin. Soluviljelyn aikana yhdellä maljalla pidettiin noin 2 ml DMEM-kasvatusliuosta, neljää cover slippiä ja siihen lisättiin noin 100 000 solua. Optimoitu CHX-määräksi saatiin noin 0,025 µg/ml ja inkubointiajaksi 3 tuntia. Koska CHX on itsessään solulle myrkyllistä, sen inkubointiaikaa tulee tarkkailla.

### 3.4 Immunofluoresenssimikroskopia

Fiksauslasilevyillä eli coverslipeillä kasvatettujen -/- MEF-solujen kasvatusmedia (DMEM) poistettiin ja maljoille lisättiin 1xPBS-liuosta niin, että maljojen pohjalla olevat coverslipit peittyivät. Nopean PBS-liuos pesun jälkeen coverslipit peitettiin 4 % PSA liuksella, jonka jälkeen reaktioliuoksen annettiin inkuboitua puolen tunnin ajan huoneen lämmössä. Tämän jälkeen PSA-liuos voitiin varovasti poistaa ja liukset voitiin jättää 1xPBS-liukseen kylmiöön +4°C odottelemaan jatkokäsittelyä.

Immunofluoresenssissä fiksausvaiheen läpi käyneet coverslipit peitettiin 280 µl filipinillä, jota oli laimennettu 1xPBS-liuksella siten, että sen lopullinen pitoisuus oli noin 0,017mg/ml. Tämän jälkeen liuosta inkuboitui hiljaisella keikutuksella alumiinifolioon käärittynä näin suojellen coverslippejä valolta tunnin ajan. Tunnin inkuboinnin jälkeen liukseen lisättiin 700 µl blokkausliuosta eli 3 % BSA 1xPBS-liuksessa blokkaamaan filippiiniä. Tämän jälkeen sekoituksen inkubointia jatkettiin vielä puoli tuntia aiemmissa olosuhteissa. Ensimmäinen vasta-aine pipetoitiin pisaroina parafilmille taulukon 7 mukaan, jonka jälkeen coverslipit asetettiin pisaroiden päälle solupuoli pisaraa vasten. Vasta-aineen annettiin inkuboitua parafilmillä tunnin ajan peiteltyä alumiinifoliolla.

### Taulukko 7 Käytetyt vasta-aineet

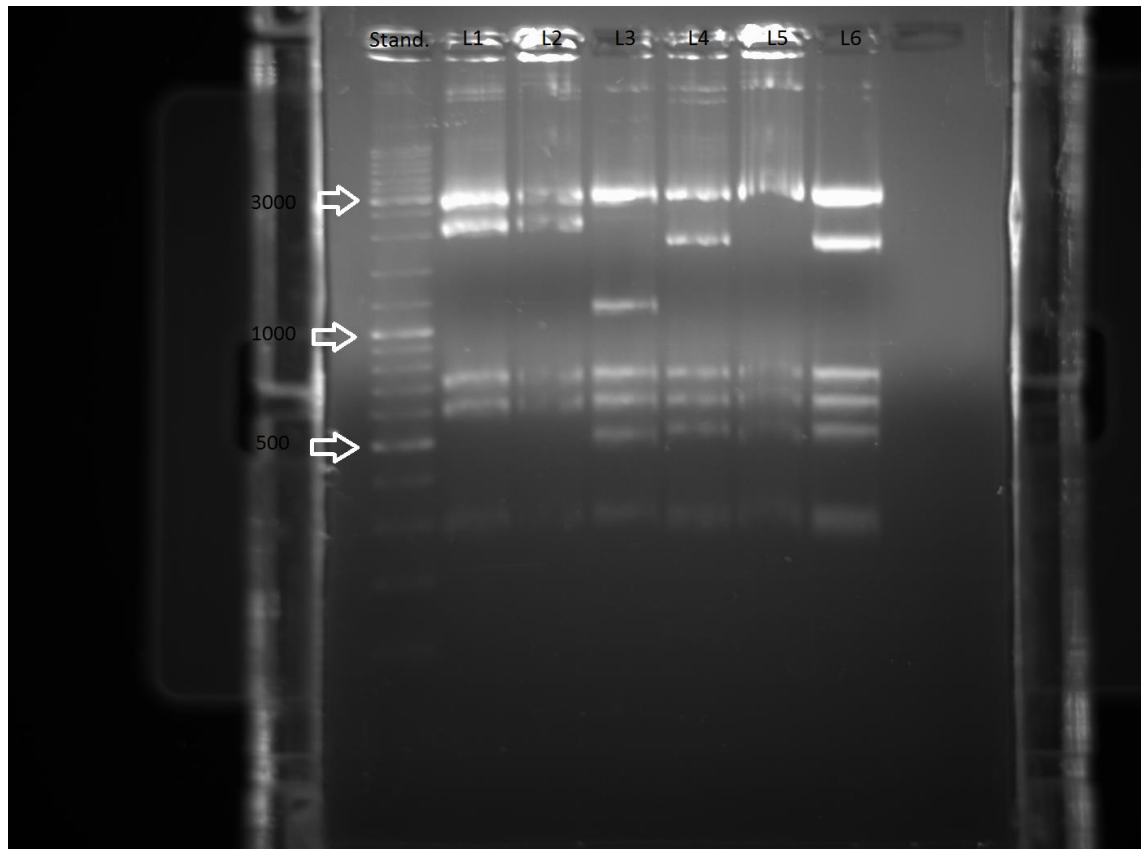
Vasta-ainetaulukko				
Kohde	1. Vasta-aine	Laimennos	2.Vasta aine(HRV 647)	laimennos
Kolesteroli	6C4	1:50	Anti rabbit	1:500
Lysosomi/Myöhäinen endosomi	Limp2	1:100	Anti mouse	1:500
Varhainen endosomi	EEA1	1;50	Anti mouse	1:500

Inkubaation jälkeen coverslipit siirrettiin kuoppalevyille ja pestiin 3 % BSA -liuksessa, jota oltiin laimennettu 1xPBS-liuksella. Pesuliuksen annettiin olla keikuttajassa viiden

minuutin ajan, jonka jälkeen pesuliuos vaihdettiin uuteen. Tätä toistettiin kolmesti, jonka jälkeen voitiin siirtyä toiseen vasta-aineeseen. Toisen vasta-aineen kanssa toimittiin samoin kuin ensimmäisen kanssa, vaikkakin käytettiin eri vasta-ainetta. Coverslipit siirrettiin taas kuoppalevyille, joilla ne taas pestiin 3 % BSA - PBS-liuoksella taas kolme kertaa. Coverslipit mountattiin objektiivilasille solupuoli alaspäin. Solujen ja lasin väliin oli jo aikaisemmin pipetoitu 1,4-Diazabicyclo (2,2,2)-octane (DABCO), jossa ei ollut 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride(DAPI:a). Liuosta pipetoitiin levyille 7 µl ja annettiin DABCO:n kuivua yön yli pimeässä huoneen lämmössä. Seuraavana päivänä lasit siirrettiin säilytettäväksi kylmiössä kansiossa. Tämän jälkeen näytteet olivat valmiita mikroskoitavaksi.

#### **4 Tulokset**

Kuvassa 4 on esitetty 1 % agarosigeelin, jolla on analysoitu (LTL3) kloonien 2 - 7 digestiot. Liitteessä 1 on esitetty tietokonemallinnus, jonka kaltainen tulos tulisi syntyä edellä mainitusta digestiosta. Kuvia vertaamalla voidaan huomata, että näytteen L6 tulos on juuri samanlainen kuin tietokannasta saatu mallinnus. L4-näyte antaa myös samanlaisen tuloksen, vaikkakin sen pitoisuus on pienempi kuin L6. Näytteistä L1 ja L2 on saatu samanlainen tulos kuin olisi saatu pelkän vektorin (LTL1) digestiosta. Näytteistä L3 ja L5 on nähtävästi tullut vääränlainen tuote. Kyseessä saattaa olla plasmidin ja jonkin epäspesifisen tuotteen fuusiosta tai partiaalisesta digestiosta.



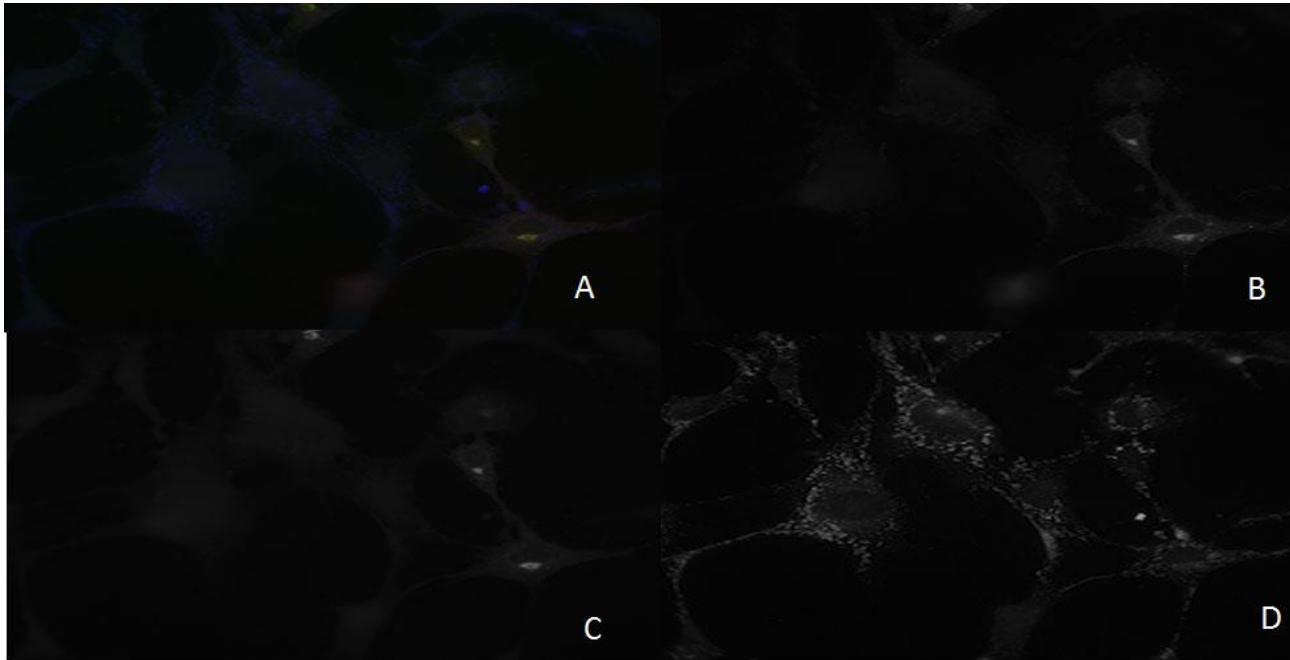
**Kuva 4 LTL3- geenin Nco1-digestion tulokset 1 % agarosigeelissä**

Taulukon nro 8 perusteella voidaan nähdä selkeät erot alkuperäisen vektorin (LTL1) ja uuden kloonin (LTL3) digestiotuotteiden välillä.

**Taulukko 8 *In silico* NcoI -digestion fragmentit**

Verkko digestio Nco1 digestio entsyymillä				
	Vekori(LTL1)		Klooni(LTL3)	
	Koordinaatit	Koko(bp)	Koordinaatit	Koko(bp)
1	4280-513	2962	4703-513	2962
2	1124-3264	2141	1898-3687	1790
3	3561-4279	719	3984-4702	719
4	514-1123	610	514-1123	610
5			1124-1624	501
6	3265-3560	296	3688-3983	296
7			1625-1897	273

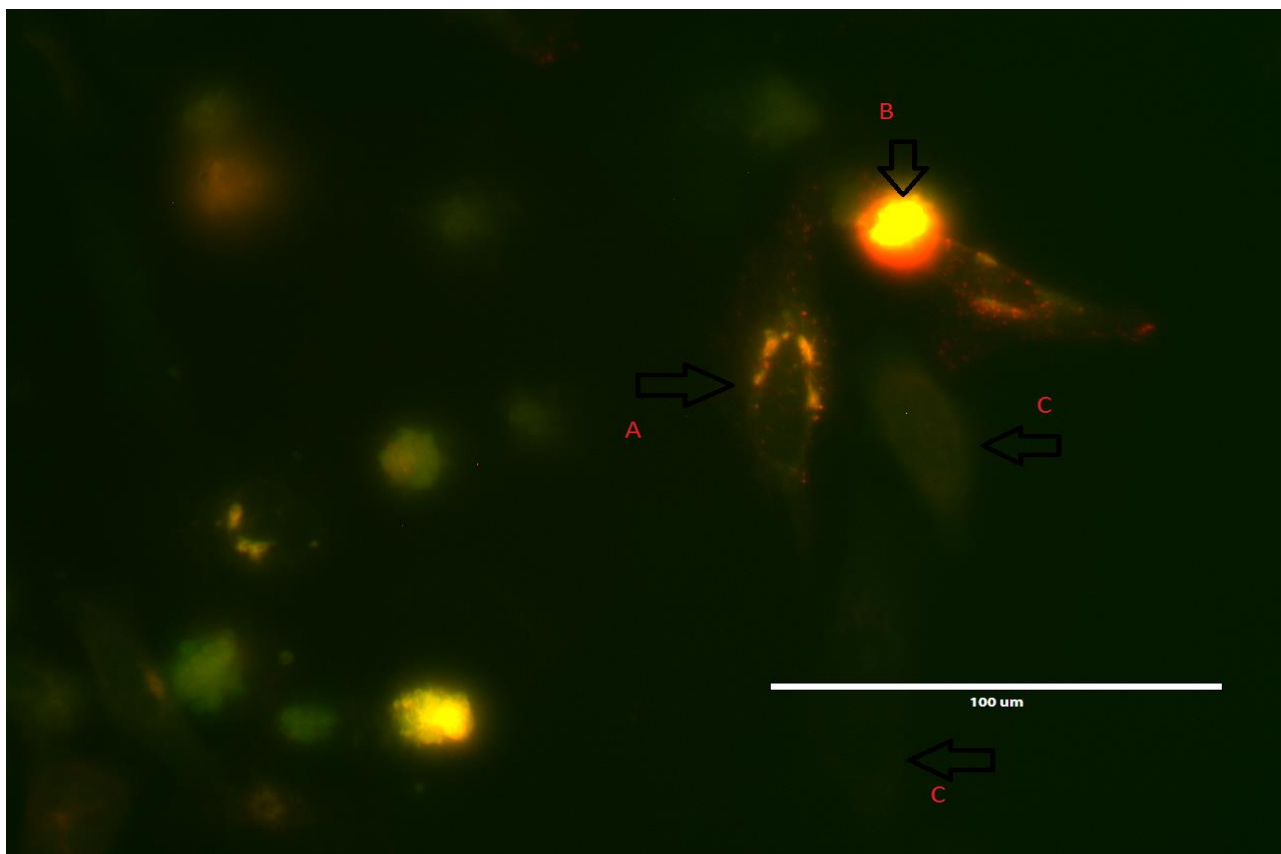
Kuvassa 5 on  $-/-$ MEF-soluihin transfektoitu kloonattu LTL3- geeni. Transfektion jälkeen solujen annettiin ekspressoitua kahden päivän ajan, jonka jälkeen niitä käsiteltiin CHX-yhdisteellä kolmen tunnin ajan. Lopuksi fiksatusnäytettä siihen lisättiin lysosomispesifistä Limp2-vasta-ainetta.



**Kuva 5  $-/-$  MEF –solu LTL3 2d exp .Limp2 vasta-aineessa**

Kuvan 5 (A ruudussa) nähdään kaikki kolme kanavaa päällekkäin. Punaisella kanavalla (B ruutu) nähdään eriteltynä RFP:n lähettämä signaali. Ruudussa C on eroteltuna RFP-eGFP:n lähettämä signaali, joka näyttäisi pääasiallisesti tulevan Golgin laitteesta. Viimeisenä ruudusta D nähdään LIMP2-vasta-aineen lähettämä signaali. LIMP2-vasta-aine tunnistaa myöhäiset endosomit ja lysosomit, joista lähtevä signaali voidaan myös nähdä. Ruutuja B ja D vertaamalla voidaan todeta, että osa signaalista todellakin menee päällekkäin eli ne lokalisoituvat samaan soluorganelliin.

Kuvassa 6 nähdään -/-MEF- solu, johon on transfektoitu opinnäytetyössä valmistettu LTL3-klooni. Kuva on otettu kahden päivän ekspression jälkeen.



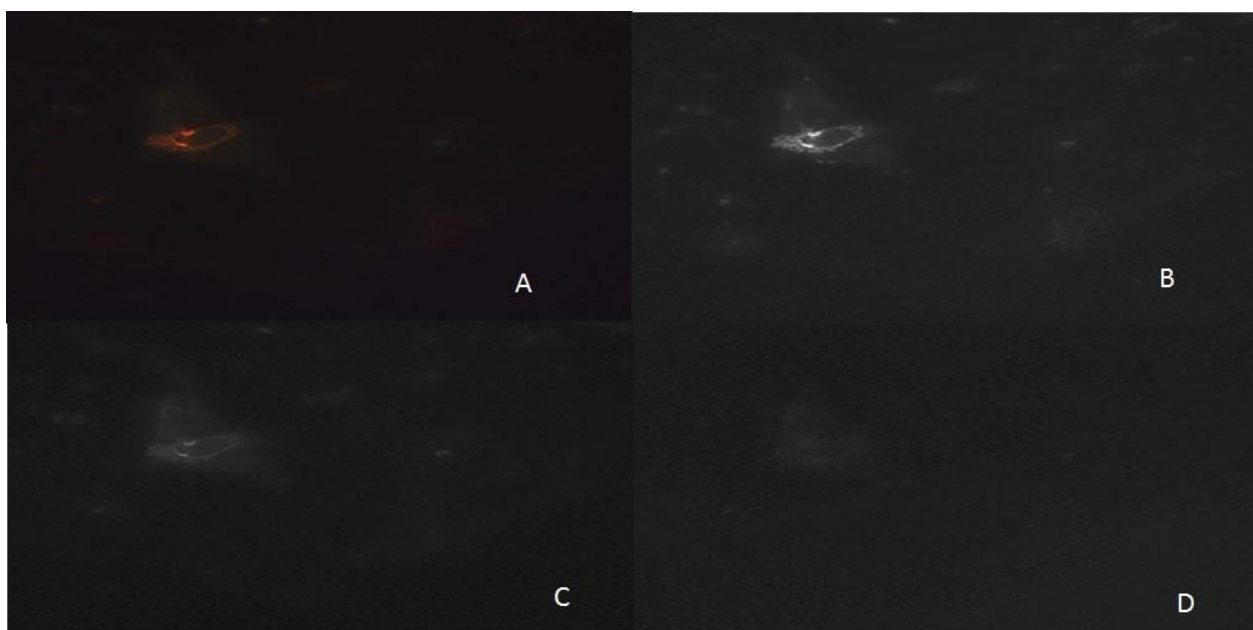
**Kuva 6 LTL3 klooni -/-MEF- solussa**

Kuvasta 6 voidaan havaita ekspressoiva ja vielä elossa oleva solu (A), joka emittoi keltaista ja punaista valoa. Keltainen valo tulee Golgin laitteesta, jossa pH:n 6 ansiosta molemmat fluoresoivat RFP- ja eGFP -geenit toimivat. Punainen valo taas näyttäisi tulevan lysosomeista ja koska siellä taas on matalampi pH (4,5 - 5), eGFP-geeni on inaktivoitunut.

Nuoli (B) kuvaa kuollutta yli-ekspressoitunutta solua. Kuolleet solut ovat ympyrän muotoisia ja ovat useimmiten yli-ekspressoivia. Nuoli (C) taas kuvaa normaaleja soluja, jotka ovat vielä elossa, mutta jotka eivät ole sisällä LTL3-geenin ekspressoivia alueita RFP- tai eGFP- markkereita.



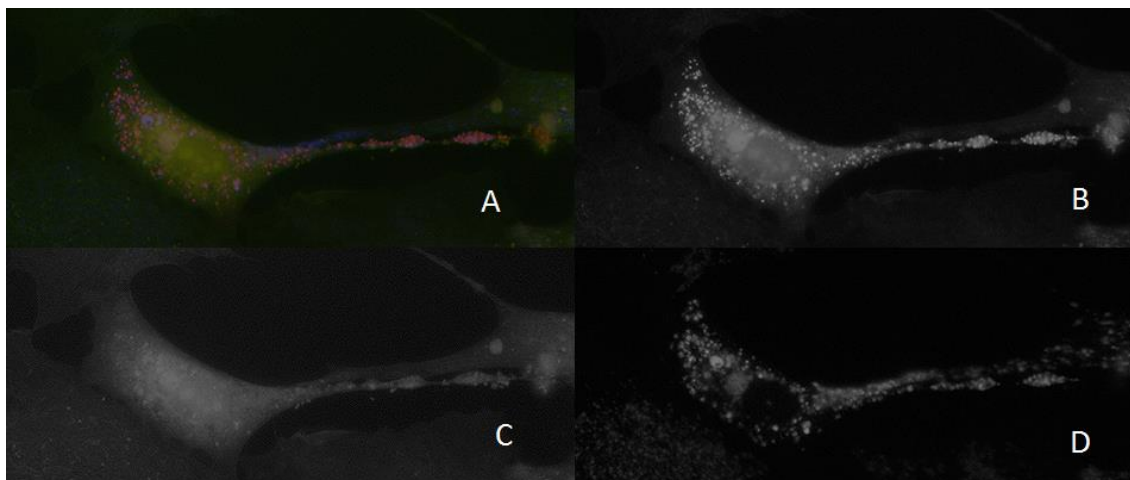
Kuvassa 7 on  $-/-$  MEF-soluja, jotka ovat transfektoitu kloonatulla LTL3-geenillä. Transfektion jälkeen soluja on ekspressoitua kahden päivän ajan, jonka jälkeen ne on fiksattu ja käsitelty EEA1 (*Early Endosome Antigen*)-vasta-aineella, jonka pitäisi tunnistaa varhaiset endosomit.



Kuva 7 LTL3 EEA1vasta-aine 2dexp .filip.MEF

Yllä olevassa kuvassa on 7 yksi näyttää olevan selkeästi ekspressoiva solu, koska siinä näkyvät molemmat RFP- ja eGFP -signaalit hyvin. Ikävä kyllä kuvan 7 D kohdasta ei nähdä minkäänlaista vasta-ainereaktiota. Voidaan siis sanoa aika suurella todennäköisyydellä, ettei immunofluoresenssivärjäys ole toiminut tällä kertaa.

Kuvassa 8 on -/-MEF-soluja, jotka ovat transfektoitu kloonatulla fluorisoivalla kloonilla. Kuvan soluja on ekspressoitu kahden päivän ajan, ja värjätty GC4-vasta-aineella eli BMP:llä, joka tunnistaa solusta myöhäisen endosomin lipidejä.



Kuva 8 LTL3 6C4 2dexp 38p .filip.MEF

Kuvassa 8 ylhäällä vasemmalla näkyy kaikilta kolmelta kanavalta koostunut kuva (ruutu A). Ylhäällä oikealla taas nähdään RFP - kanavalta tuleva kuva, josta voi nähdä kloonin osan, jossa eGFP on lopettanut toimintansa ja RFP - osa on vielä aktiivinen (ruutu B). Alhaalla vasemmalla nähdään kuva, jossa eGFP ja RFP ovat molemmat vielä aktiivisia ja RFP:n, jonka eGFP osa on inaktivoitunut (ruutu C). Alhaalla taas näkyy vasta-aineella GC4 eli BMP:llä tehty vasta-ainevärjäys, joka tehtiin projektin seuraavaa vaihetta varten (ruutu D).

## 5 Johtopäätökset

Työssä esiintyneet tekniset hankaluudet liittyivät alun kloonauksessa saatuihin huonoihin PCR- saantoihin, mutta toistettaessa kloonauksen onnistui kuitenkin odotusten mukaisesti. Solujen fiksauksessa oli taas haasteita kahdesta eri syystä. Menetelmässä käytetty filipiini on erittäin valoarkaa ainetta ja liiallinen valon saanti tuhosi näytteitä. Toisekseen coverslpeillä kasvaneet solut olivat erittäin alttiita irtoamaan pesujen yhteydessä. Tulosten kannalta olisi ollut myös toivottavaa, jos EEA1 early endosomi immunofluoresenssi ja gm130 Golgimarkkeri olisivat onnistuneet tai niistä olisi parempia kuvia tallessa.

Tulosten mukaan opinnäytetyössä saavutettiin sille asetetut odotukset ja tavoitteet.

Kloonauksessa onnistuttiin saamaan oikeanlainen fuusioproteiini, joka sisälsi inserttinä RFP-eGFP- sekvenssit. Soluihin transfektoituna fuusioproteiinin läsnäoloa pystyttiin seuraamaan fluoresenssimikroskoopilla. Vasta-ainevärjäyksistä voitiin lopuksi todeta, että kohderekombinanttiproteiini oli todellakin päätynyt golgin laitteen kautta lysosomeihin ja myöhäisiin endosomeihin.

## Lähteet

1. Holmes, R & Jobling, M. 1996. Chapter 5 Genetics. Verkkodokumentti. NCBI. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7908/>>. Luettu 4.5.2015
2. Solunetti. 2006. Lysosomi. Verkkodokumentti. Solunetti. <<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/lysosomi/>>. Luettu 5.5.2015
3. Cooper, G. 2000. Lysosomes. Verkkodokumentti. NCBI. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9953/>>. Luettu 5.5.2015
4. Solunetti. 2006. Lysosomi. Verkkodokumentti. Solunetti. <[http://www.solunetti.fi/tiedostot/kuvat\\_solubiologia/Kalvokierto/MTlysosomintoiminta.jpg](http://www.solunetti.fi/tiedostot/kuvat_solubiologia/Kalvokierto/MTlysosomintoiminta.jpg)>. Luettu 14.5.2015
5. Xinran, L, Garrity, A & Haoxing, X. 2013. Regulation of membrane trafficking by signalling on endosomal and lysosomal membranes. Verkkodokumentti. Wiley Online Library. <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1113/jphysiol.2013.258301/pdf>>. Luettu 4.4.2015
6. Cooper, G. 2000. Endocytosis and lysosome formation. Verkkodokumentti. NCBI. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9953/figure/A1524/?report=objectonly>>. Luettu 15.5.2015
7. Blanz, J., Groth, J., Zachos, C., Wehling, C., Saftig, P & Schwake, M. 2013. Lysosomal integral membrane protein-2: a new player in lysosome-related pathology. Verkkodokumentti. Pubmed. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24389070>>. Luettu 9.5.2015

8. Reaves BJ1, Banting G, Luzio JP. 1998. Luminal and transmembrane domains play a role in sorting type I membrane proteins on endocytic pathways. Verkko-dokumentti. Pubmed. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9571243>>. Luettu 1.5.2015
9. Lodish H, Berk A & Zipursky SL. 2000. Microscopy and Cell Architecture. Verkkodokumentti. NCBI. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21629/>>. Luettu 2.5.2015
10. Blanz, J., Groth, J., Zachos, C., Wehling, C., Saftig, P & Schwake, M. 2009. Disease-causing mutations within the lysosomal integral membrane protein type 2 (LIMP-2) reveal the nature of binding to its ligand beta-glucocerebrosidase. Verkkodokumentti. NCBI. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19933215>>. Luettu 10.5.2015
11. Samie, M & Xu, H. 2011. Studying TRP Channels in Intracellular Membranes. Verkkodokumentti. NCBI. <[www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7908/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7908/)>. Luettu 4.5.2015
12. Solunetti. 2006. Soluviljely. Verkkodokumentti. Solunetti. <[http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/soluviljely\\_1/](http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/soluviljely_1/)>. Luettu 14.5.2015
13. Howerton, K., Schlaepfer, D. & Ilic, D. 2011. Cell lines from mouse embryos with early embryonic lethality. Verkkodokumentti. NCBI. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3057554/>>. Luettu 5.5.2015

EBcutter - Custom Digest



http://tools.neb.com/NEBcutter2/listdig.php?name=b2149d95-&showgel=1

### Custom Digest

unnamed sequence - digested with: NcoI

Gel Type: 0.7% agarose

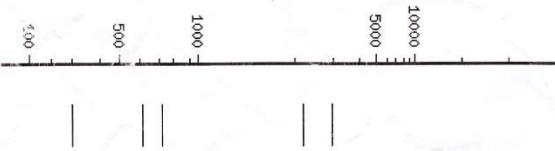
Marker: none

DNA Type: Unmethylated

L= 102 mm

#	Ends	Coordinates	Length (bp)
1	NcoI-NcoI	4280-513	2962
2	NcoI-NcoI	1124-3264	2141
3	NcoI-NcoI	3561-4279	719
4	NcoI-NcoI	514-1123	610
5	NcoI-NcoI	3265-3560	296

ALKUPERÄINEN HTA: NcoI



The virtual gel was generated by interpolating experimental data. See details.



### Custom Digest

unnamed sequence - digested with: NcoI

Gel Type: 0.7% agarose

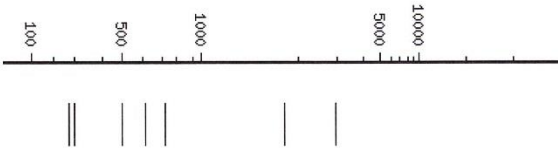
Marker: none

DNA Type: Unmethylated

L= 102 mm

#	Ends	Coordinates	Length (bp)
1	NcoI-NcoI	4703-513	2962
2	NcoI-NcoI	1898-3687	1790
3	NcoI-NcoI	3984-4702	719
4	NcoI-NcoI	514-1123	610
5	NcoI-NcoI	1124-1624	501
6	NcoI-NcoI	3688-3983	296
7	NcoI-NcoI	1625-1897	273

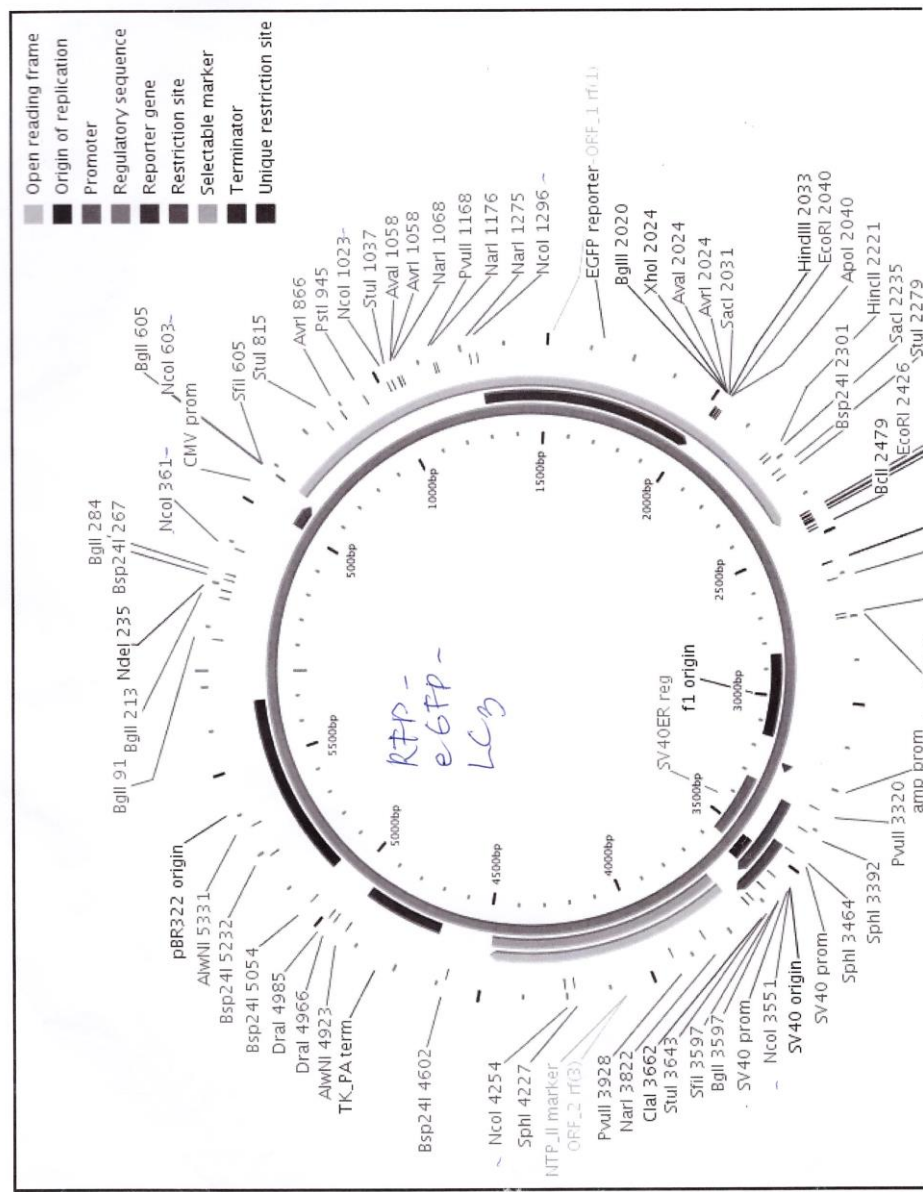
*LT<sub>1</sub> - runko + RFP-eGFP  
=> TRIVOTRUCLOS NcoI*



The virtual gel was generated by interpolating experimental data. See [details](#).

http://wishart.biology.ualberta.ca/PlasmMapper/jsp/displayPlasmidMap.jsp

per - Graphic Map



14.7.2014 12:13

Abstract: TMF for SSR-LTL1  
-LTL1

