

β 1,3-Glukosyyli transferaasin tuoton optimointi ja puhdistus

Pro gradu –tutkielma
Tampereen yliopisto
Lääketieteellisen teknologian instituutti
Kesäkuu 2008
Sanna Virtanen

PRO GRADU –TUTKIELMA

Paikka: TAMPEREEN YLIOPISTO
Lääketieteellinen tiedekunta,
Lääketieteellisen teknologian instituutti
Tekijä: VIRTANEN, SANNA PAULIINA
Otsikko: β 1,3-Glukosyyli transferaasin tuoton optimointi ja puhdistus
Sivumäärä: 84 s. + liitteet 2 s.
Ohjaajat: FT Taisto Heinonen
Tarkastajat: Professori Markku Kulomaa ja dosentti Vesa Hytönen
Päiväys: 10.6.2008

Tutkimuksen tausta ja tavoitteet: Tutkimuksen tavoitteena oli tuottaa ja puhdistaa β 1,3-glukosyyli transferaasia (β 3Glc-T), jonka geeni oli alun perin löydetty ohutsuolen epiteelisolujen erilaistumisesta mallintavasta soluviljelmäjärjestelmästä. Tutkimuksessa pyrittiin optimoimaan tuottoolosuhteita ja puhdistusjärjestelmää puhtaan β 3Glc-T:n mahdollisimman suuren saannon saavuttamiseksi käytettävissä olevilla resursseilla. Tuotettavaa proteiinia tarvittiin tämän ominaisuuksien kuten entsyymaattisen aktiivisuuden ja rakenteen selvitykseen sekä proteiinin tunnistavien vasta-aineiden testaukseen. Täysimittaisen β 3Glc-T:n lisäksi tavoitteena oli tuottaa myös lyhempää, todennäköisesti helpommin kiteytyvää aminoterminaaliseksi domeeniksi kutsuttua aluetta. Tämän rakenteen teki mielenkiintoiseksi sen mahdollinen osallistuminen β 3Glc-T:n oligomerisoitumiseen, substraattien tunnistukseen tai oikean toimintaympäristön tunnistukseen.

Tutkimusmenetelmät: β 3Glc-T:a tuotettiin yhdistelmäproteiinina bakulovirus-hyönteissolutuottojärjestelmässä. β 3Glc-T:n aminoterminaalista domeenia tuottavat bakuloviruskannat valmistettiin *E. coli* -bakteereissa paikkakohtaiseen transpositioon perustuvalla menetelmällä. Tuotetut proteiinit puhdistettiin affiniteetikromatografisesti niihin liitetyn avidiini- tai histidiini-puhdistuskahvan avulla. Tuotetun proteiinin määrää ja puhdistuksen tehokkuutta arvioitiin immunoblottauksen ja Coomassie- sekä hopeavärijäysten perusteella.

Tutkimustulokset ja niiden tarkastelu: β 3Glc-T:n tuottotasoa saatiin parannettua bakulovirus-hyönteissolutuottojärjestelmään liittyvien muuttujien arvojen optimoinnilla. Adherenttiliikkeitä tuottivat β 3Glc-T:a elatusliuokseen noin 250 ng/ml:ssa, mutta suurin osa tuotetusta proteiinista jäi eritysureille ohjauksesta huolimatta solun sisälle. Suspensioviljelmillä saatiin runsas tuotto, mutta β 3Glc-T:a tuottavan virusvaraston tiitterin laskun ja puhdistusvaiheessa esiintyneiden ongelmien vuoksi kiteytykseen tarvittavaa määrää riittävän puhtaasta β 3Glc-T:a ei onnistuttu tuottamaan. Kaksi uutta bakuloviruskantaa valmistettiin paikkakohtaiseen transpositioon perustuvalla bakulovirusten valmistusjärjestelmällä. Molempien kantojen avulla saatiin hyönteissoluissa käynnistymään histidiini- tai avidiini-puhdistuskahvaan liitetyn β 3Glc-T:n aminoterminaalisen domeenin tuotto. Avidiini-puhdistuskahvaan sidottua proteiinia tuottavalla viruskannalla saatiin runsaita tuotteita, mutta puhdistuksessa käytetyn virheellisen liuoserän vuoksi puhdistetun proteiinin saanto jäi vaatimattomaksi. Puhdistusmenetelmistä His-puhdistuskahvaan perustuvalla puhdistuksella arvioitiin saavutetun noin 70 %:n puhtaustason. Alustavien tulosten perusteella tätä tehokkaammalta vaikutti Avd-puhdistuskahvaan perustuva puhdistusmenetelmä.

Johtopäätökset: Bakulovirus-hyönteissolutuottojärjestelmä soveltuu hyvin sekä täysimittaisen β 3Glc-T:n että β 3Glc-T:n aminoterminaalisen domeenin tuottoon. Tuotteiden puhdistukseen valitut menetelmät vaikuttivat myös tarkoitukseen sopivilta, mutta vaativat vielä lisäoptimointia paremman saannon ja rakenteenmäärittämiselle riittävän puhtaustason saavuttamiseksi.

MASTER'S THESIS

Place: UNIVERSITY OF TAMPERE
Faculty of Medicine,
Institute of Medical Technology
Author: VIRTANEN, SANNA PAULIINA
Title: Production and purification of the recombinant β 1,3-glucosyltransferase
Pages: 84 pp + appendices 2 pp
Supervisor: Dr. Taisto Heinonen, PhD
Reviewers: Professor Markku Kulomaa and Docent Vesa Hytönen
Date: 10.6.2008

Background and Aims: The aim of this study was to produce and purify recombinant β 1,3-glucosyltransferase (β 3Glc-T), a novel enzyme that was originally discovered in a cell culture system used to model differentiation of the intestinal epithelial cells. The recombinant protein was needed for enzyme activity assays, antibody testing, and determination of its three-dimensional structure. In addition to the full-length β 3Glc-T, its N-terminal domain was produced. This novel domain is interesting because it may be involved in the subcellular localization, substrate recognition or oligomerization of the enzyme.

Methods: Recombinant β 3Glc-T was produced in a baculovirus-insect cell expression system. New baculovirus strains, which produce the N-terminal domain fused to a histidine or an avidin tag, were generated using a site-specific transposition system. These recombinant proteins were purified with affinity chromatographic methods based on their tags. The yield and purity were determined using SDS-PAGE and Coomassie or silver staining.

Results and Discussion: Various parameters, such as the cell density at the time of infection and the best time to harvest the cells, were studied and optimised in order to increase the amount of recombinant protein. A signal sequence was used to direct the recombinant proteins to the secretory pathway where they would acquire some post-translational modifications such as glycosylation. However the amount of protein secreted into the medium was found to be low, estimated at about 250 ng/mL in adherent culture. The total amount of protein was much higher, but most of it was not secreted and remained intracellular in both adherent and suspension cultures. Enough protein of sufficient purity could not be obtained for crystallization studies because of problems with the titer of the baculovirus stock and during purification. Two new baculovirus strains, which produced the N-terminal domain of β 3Glc-T fused to avidin or histidine tags, were generated. The strain containing the avidin-tagged construct produced a good amount of protein, but the yields after purification were small because of a faulty elution buffer, and these experiments need to be repeated before more definite conclusions can be drawn. The purification method based on the histidine tag yielded protein whose purity was estimated to be about 70 %. According to preliminary results, the avidin tag seems to be more efficient than the histidine tag in affinity purification.

Conclusions: The baculovirus-insect cell expression system is a good method for the production of full-length β 3Glc-T and its N-terminal domain. The methods used to purify the recombinant protein are promising but further optimization is needed before enough pure protein can be produced for structural analysis.

SISÄLLYSLUETTELO:

1	Johdanto	6
2	Kirjallisuuskatsaus	7
2.1	Tuotettava proteiini: β 1,3-glukosyyli transferaasi	7
2.1.1	β 3Glc-T-geenin tunnistus ja karakterisointi	7
2.1.2	β 3Glc-T:n aktiivisuus	10
2.1.3	Peters' plus –oireyhtymä	12
2.2	Vierasperäisten proteiinien tuottoon käytetyt tuottoisännät	14
2.3	Bakulovirus-hyönteissolu-tuottojärjestelmä	16
2.3.1	Tuottojärjestelmän edut ja ongelmat	17
2.3.2	Bakulovirus	18
2.3.2.1	Bakulovirusten rakenne ja luokittelu	18
2.3.2.2	Infektiosykli	19
2.3.3	BEVS (Baculovirus Expression Vector System)	21
2.3.3.1	Käytetty bakulovirustyyppi	21
2.3.3.2	Käytetyt hyönteissolulinjat	22
2.3.3.3	Käytetyt promoottorit	22
2.3.3.4	BEVS-menetelmän kehitys	23
2.3.3.4.1	Ensimmäinen BEVS-menetelmällä tehty vierasperäisen proteiinin tuotto	23
2.3.3.4.2	Menetelmän tehostaminen	24
2.3.3.5	Bakulovirusvektorin valmistus paikkakohtaisen transposition avulla	26
2.3.3.5.1	Yleiskatsaus menetelmään	26
2.3.3.5.2	Sukkulavektorin valmistus	27
2.3.3.5.3	Transformaatioiden onnistumisen tarkistus	27
2.3.3.5.4	Siirtovektorin valmistus	28
2.3.3.5.5	Insertin siirto sukkulavektoriin	28
2.3.3.5.6	Proteiinin tuotto	28
3	Tutkimuksen tavoitteet	30
4	Menetelmät	31
4.1	Bakuloviruskantojen valmistus	31
4.1.1	Siirtovektorien valmistus	32
4.1.1.1	Inserttien valmistus	32
4.1.1.1.1	His- insertti	33
4.1.1.1.2	Avd-insertti	35
4.1.1.2	Inserttien liittäminen FastBac TM 1-siirtovektoriin	37
4.1.1.3	Siirtovektorin transformointi soluun ja virheettömien kloonien valinta	38
4.1.2	Siirtovektorin transformointi DH10Bac TM -bakteereihin	39
4.1.3	Bacmidin eristäminen ja hyönteissolujen transfektio	40
4.2	Proteiinin tuottoon käytetyt solut ja niiden viljely	41
4.2.1	Kasvatusolosuhteet	41
4.2.2	Soluviljelmän ylläpito	41
4.3	Viruksen monistus ja tiitterin tarkistus	42
4.3.1	Viruksen monistus	42
4.3.2	Plakkimääritys	43
4.4	Proteiinintuotto ja tunnistus	44
4.4.1	Proteiinin tuotto	44
4.4.2	Tuoton analysointi	44
4.4.2.1	Histidiinipuhdistuskahvan tunnistus	45
4.4.2.2	Avidiinipuhdistuskahvan tunnistus	46

4.4.3	Tuotetun proteiinin puhdistus	46
4.4.3.1	Histidiinikahvaisten proteiinien puhdistus.....	47
4.4.3.2	Avidiinikahvaisten proteiinien puhdistus.....	47
4.4.3.3	Puhdistuksen analyysit.....	48
5	Tulokset.....	49
5.1	Täysimittaisen β 3Glc-T:n tuoton optimointi	49
5.1.1	Optimointi adherenttiviljelmissä.....	49
5.1.1.1	β 3Glc-T:n keräyspäivän valinta.....	49
5.1.1.2	Optimaalisin infektointihetken solutiheys	50
5.1.1.3	Tuotetun β 3Glc-T:n sijainti soluviljelmässä.....	51
5.1.1.4	Tuottosolinjan vertailu	52
5.1.1.5	Kasvatuslämpötilan vertailu.....	53
5.1.2	β 3Glc-T:n tuotto suspensioviljelmissä.....	54
5.1.2.1	High Five TM –solujen kasvatus suspensiossa.....	54
5.1.2.2	β 3Glc-T:n tuoton optimointi solususpensioviljelmässä.....	56
5.2	β 3Glc-T:n puhdistus	59
5.3	β 3Glc-T:n aminoterminaalista domeenia tuottavien bakulovirus-vektorien valmistus.....	62
5.3.1	Inserttien rakennus	62
5.3.2	Bakulovirusten valmistus.....	63
5.4	Aminoterminaalisen domeenin tuotto ja puhdistus.....	64
5.4.1	Avidiini-puhdistuskahvaisen proteiinin tuotto ja puhdistus	64
5.4.2	His-puhdistuskahvaisen proteiinin tuotto ja puhdistus	66
5.4.3	Tuottojen ja puhdistusten vertailu.....	67
6	Pohdinta	69
6.1	Täysimittaisen β 3Glc-T:n tuoton ja puhdistuksen optimointi	69
6.1.1	Täysimittaisen β 3Glc-T:n tuoton optimointi	69
6.1.2	Täysimittaisen β 3Glc-T:n puhdistuksen optimointi	71
6.1.3	Yhteenveto β 3Glc-T projektista ja sen tulevaisuuden visiot	73
6.2	β 3Glc-T:n aminoterminaalisen domeenin tuotto ja puhdistus.....	74
6.2.1	β 3Glc-T:n aminoterminaalista domeenia tuottavien bakulovirus-vektorien luonti... 74	
6.2.2	Avidiini-puhdistuskahvaan liitetyn β 3Glc-T:n aminoterminaalisen domeenin tuotto ja puhdistus	75
6.2.3	8 \times His-puhdistuskahvaan liitetyn β 3Glc-T:n aminoterminaalisen domeenin tuotto ja puhdistus	76
6.2.4	Yhteenveto β 3Glc-T:n aminoterminaalisten domeenien tuotosta ja puhdistuksesta sekä näiden projektien tulevaisuuden visiot.....	77
6.3	Tuntemattomasta proteiinista β 3Glc-T:ksi	78
7	Johtopäätökset.....	80
8	Lähdeluettelo.....	81

Lyhenteet

β 3Glc-T	UDP-glukoosi: fukoosi β 1,3-glukosyyli transferaasi
AcMNPV	<i>Autographa californica</i> multiple nuclear polyhedrosis virus
Avd	Avidiini
BEVS	Baculovirus expression vector system
Fuc	Fukoosi
Glc	Glukoosi
High Five TM	<i>Trichoplusia ni</i> kanta BTI-TN-5B1-4
His	Histidiini
IPTG	Isopropyyli- β -D-1-tiogalaktopyranosidi
MOI	Multiplicity of infection
Radical Fringe	O-fukoosi β 1,3-N-asetyyli glukosaminyyli transferaasi
Sf9	<i>Spodoptera frugiperda</i> kanta
TSR	Thrombospondin Type 1 Repeat

1 Johdanto

Keliakia on tauti, jossa viljan sisältämä gluteeni-proteiini aiheuttaa perimältään alttiille henkilölle ohutsuolen limakalvovaurion. Tästä johtuen ravintoaineiden imeytyminen ohutsuolesta häiriintyy (Collin ym., 2005). Keliakikon vaurioituneessa ohutsuolessa epiteelisolut kasvavat ja erilaistuvat normaalista poikkeavalla tavalla. Tästä syystä keliakiatutkimusryhmässä, missä tämä *pro gradu* - tutkimus tehtiin, oli luotu solumalli, jonka avulla ohutsuolen epiteelin erilaistumista voitiin tutkia (Halttunen ym., 1996).

Tämän solumallin avulla etsittiin geenejä, joiden mRNA:n ilmentymistasot muuttuivat epiteelisolujen erilaistuessa. Yhden tässä kokeessa löydetyn ennestään tuntemattoman mRNA:n havaittiin tarkemman analyysin ja sekvenssivertailujen perusteella olevan hyvin samankaltainen β 1,3-glykosyyli transferaasi-perheen entsyymien kanssa. Tästä syystä kyseinen proteiini nimettiin ” β 3-glykosyyli transferaasin kaltaiseksi” (β 3-glycosyltransferase-like, B3GTL) (Heinonen ym., 2003). Tämän proteiinin nimi kuitenkin vaihdettiin entsyymiaktiivisuuden selvittyä β 3Glc-T:ksi.

Erilaisia glykosyyli transferaaseja on ihmisestä löydetty yli 200. Glykosyyli transferaasien tehtävä on siirtää sokeri aktivoituneelta luovuttajamolekyyliltä vastaanottajamolekyylille, joka voi olla toinen sokeri, proteiini tai lipidi. Suurin osa glykosyyli transferaaseista sijaitsee Golgin laitteessa tai solulimakalvostossa, jossa ne osallistuvat proteiinien translaation jälkeiseen muokkaukseen lisäämällä proteiineihin niiden aktiivisen toiminnan kannalta tärkeitä sokeriryhmiä tai muokkaamalla proteiineihin jo liitettyjä sokereita ja sokeriketjuja. Sokeriketjujen muokkauksien avulla glykosyyli transferaasit voivat osallistua esimerkiksi solujen väliseen tunnistukseen, solujen liikkumiseen ja kiinnittymiseen sekä signaalinvälitykseen.

Tutkimuksessa, johon *pro gradu* -projekti liittyi, pyrittiin selvittämään tämän uuden glykosyyli transferaasiksi oletetun proteiinin β 3Glc-T:n entsyymaattista aktiivisuutta, sijaintia solussa sekä sen mahdollista vaikutusta ohutsuolen solujen erilaistumiseen. Tavoitteena oli lisäksi määrittää β 3Glc-T:n rakenne, jotta esimerkiksi β 3Glc-T:lle sopivia substraatteja voitaisiin etsiä myös mallintamisen avulla. Edellä mainittuihin tutkimuksiin tarvittiin runsaasti puhdasta β 3Glc-T:a, jota tässä *pro gradu* -projektissa oli tarkoitus tuottaa.

2 Kirjallisuuskatsaus

2.1 Tuotettava proteiini: β 1,3-glukosyyli transferaasi

Tuotettavasta proteiinista oli työn alkaessa julkaistu vain yksi artikkeli (Heinonen ym., 2003), jonka tietoja käytettiin työn suunnitteluun. Tässä artikkelissa oli esitelty uusi geeni, jonka proteiinin oletettiin sekvenssivertailujen perusteella olevan β 3-glykosyyli transferaasin kaltainen entsyymi. *Pro gradu* -työn aikana kaksi ryhmää selvitti ja julkaisi tämän entsyymin aktiivisuuden, jonka perusteella proteiini nimettiin β 3Glc-T:ksi eli täydelliseltä nimeltään ”UDP-glukoosi: fukoosi β 1,3-glukosyyli transferaasiksi”. Entsyymiaktiivisuuden lisäksi projektin aikana julkaistiin artikkelit, joissa mutaation β 3Glc-T:a ilmentävässä geenissä osoitettiin aiheuttavan synnynnäisen, virheellisestä glykolysoinnista aiheutuvan taudin: Peters’ plus –oireyhtymän.

2.1.1 β 3Glc-T-geenin tunnistus ja karakterisointi

β 3Glc-T:n geeni löydettiin soluviljelmämallista, jossa ohutsuolen epiteelisoluja (T84) erilaistettiin TGF- β -kasvutekijän vaikutuksesta kryptan solujen kaltaisista erittävistä soluista absorboiviksi enterosyyteiksi (Halttunen ym., 1996). Tämän mallin avulla tehdyssä kokeessa etsittiin *differential display PCR* -menetelmällä (DD-PCR) geenejä, joiden ilmentyminen muuttui epiteelisolujen erilaistuessa. Kokeen tuloksena kymmenen geenin mRNA:n ilmentymistasoissa havaittiin muutos erilaistuneiden ja erilaistumattomien solujen välillä (Lindfors ym., 2000). Näistä yhden ennestään tuntemattoman mRNA:n todettiin tarkemman analyysin ja tietokantavertailujen perusteella olevan hyvin samankaltainen β 1,3-glykosyyli transferaasi-perheen entsyymien kanssa. Tästä syystä kyseinen proteiini nimettiin ” β 3-glykosyyli transferaasin kaltaiseksi” (β 3-glycosyltransferase-like, B3GTL) (Heinonen ym., 2003). B3GTL:n nimi vaihdettiin β 3Glc-T:ksi entsyymiaktiivisuuden selviämisen jälkeen.

β 3Glc-T:n geeni sijaitsee ihmisen kromosomialueella 13q12.3. Geenin mRNA:ksi luettavan alueen pituus on pisimmän löydetyn mRNA:n loppuun määriteltynä 132 188 emäsparia, ja se sisältää 14 intronia ja 15 eksonia. (Heinonen ym., 2003.) Geeni ilmentää 498 aminohaposta koostuvaa proteiinia, jonka rakenne on tyypillinen glykosyyli transferaaseille. Rakenteeseen kuuluvat aminoterminaalinen signaalisekvenssi (aminohapot 1-28), varsidomeeni (aminohapot 29-260) ja katalyyttinen domeeni (aminohapot 261-498) (Sato ym., 2006). β 3Glc-T:n nukleotidi- ja aminohapposekvenssi on esitetty kuvassa 2.1.


```

-110 AGAGAAGGGT
-100 CAGCGCGGGCGGAGGGCGGGCGGCGGCGGCGAGCTCCGCTCCCGCGGCTCCCTCCCGCGCCAGGTAGGGCGCTCAGCCTCCGCGCCAGG
1 ATGGGGCGGCGGCTGCTGGTGGCTGCTCGCGCGGCGGCGCTGCTCGGCTCCTCACCTGCTCCCTGGCTTTGGTTGGGTTCTGAGATACAAAAG
M R P P A C W W L L A P P A L L A L L T C S L A F G L A S E D T K K 34
101 AAGAGGTCAGCAGTCTCAGGATTTGGAGAAAATGATCAAGAAAATGACATAGACTTAAAGGAATGTTATTCGTACCCAGTCAAAGTAA
E V K Q S Q D L E K S G I S R K N D I D L K G I V F V I Q S Q S N 67
201 TTCTTTTTCATGCAAGAGAGCAGAGCAGTTAAAAAAGCATCTTAAAGCAGGCTGCAGATCTTACACAGAGCTCCCGAGTGTCTCTCTTCATCAG
S F H A K R A E Q L K K S I L K Q A A D L T Q E L P S V L L L H Q 100
301 CTGGCTAAACAAGAGGTCATGGACCACTCTCCGTTGTACCAGCACTTTCTGTAAATATAGCAGAAATCATCTTGGATTTCCTCTGTGAAGAAG
L A K Q E G A W T I L P L L P H F S V T Y S R N S S W I F F C E E E 134
401 AGACAAGAATACAGATCCAAAACCTTGGAAACCCCTCAGAAGATATGACCCCTCCTAAGGAATGGTTTTGGGAAAAGCATTACATGATGAAGAAGCTAC
T R I Q I P K L L E T L R R Y D P S K E W F L G K A L H D E E A T 167
501 AATAATTCACCATTTGCTTTCCGAGAATCCTACAGTTTAAAGTATCCAGACTTTGCTGCAGGCTGGGCCTTAAAGTATCCACTTGTAAACAAGCTT
I I H H Y A F S E N P T V F K Y P D F A A G W A L S I P L V N K L 200
601 ACCAAGAGACTAAAGAGTGAATCCTTGAATCCGACTTTACAATAGATTTAAACATGAGATGGCCCTTACATCTGGGACAAAAGCGGAGGACCTCCCC
T K R L K S E S L K S D F T I D L K H E I A L Y I W D K G G G P P L 234
701 TGACCCAGTGCCTGAGTTTGTACCAATGACGTGGACTTCTACTGTGTACCACATTCATCTTTTACCAGCTTTGTAGAAAGCCAGTGAAGAAGAA
P V P E F C T N D V D F Y C A T T F H S F L P L C R K P V K K K 267
801 GGATATTTTGTTCAGTAAAAAACATGCAAGAAATTCATGGTGACAGAATCCTATTGTTAAGCAGACTTGGGAGAGCCAGGCAAGTCTCATTTGAATAC
D I F V A V K T C K K F H G D R I P I V K Q T W E S Q A S L I E Y 300
901 TATAGTACTATACTGAAAATCCATTCTACTGTGGATTGGGAATCCATAACAGATAGAGGTCATTGTGGAAAGACATTGGCATTGGGAAGAT
Y S D Y T E N S I P T V D L G I P N T D R G H C G K T F A I L L E R F 334
1001 TTCTGAATCTGATCCAGGACAAAACGATGGTTAGTCTATGTGGATGATGATACATAATAAGTATCTCCAGGCTCCAGCATTGCTTAGCTGTATGA
L N R S Q D K T A W L V I V D D D T L I S I S R L Q H L D S C Y D 367
1101 CTCCGGCAAGCCTGTGTTTCTGGGAGAGCGCTACGGCTACGGCTGGGCACTGGTGGCTACAGCTACATCACGGGAGGAGGAGAAATGGTCTTCAGCAGA
S G K P V F L G E R Y G Y G L G T G G Y S Y I T G G G G M V F S R 400
1201 GAAGCGTCCAGGAGACTTCTGCCAGTAAATGTCGATGTACAGCAATGATGCTCCGATGATATGGTCTGGGAATGTGCTTTAGTGGCTGGGAATCC
E A V R R R L L A S K C R C Y S N D A P D D M V L G M C F S G L G I P 434
1301 CTGTGACACACAGCCCTCTCTCCATCAGGCTCGGCCGGTGGATTACCCTAAGGACTACCTTTCTCATCAAGTCCCATATCGTTCACAAAACACTGGAA
V H S P L F H Q A R P V D Y P K D Y L S H Q V P I S F H K H W N 467
1401 CATCGATCCAGTGAAGTGTATTTACATGGTTGGCACCCAGTACGAGCAAGCCAGGACAGGAGACAGAAAAGGTTTTCGAGAGGAGTTATAAATC
I D P V K V Y F T W L A P S D E D K A R Q E T Q K G F R E E L * 498

1501 AGGTGACCTGTGCGCCTAGCCTGCGCAGGGAATGAACTGGAGACTGTGGCCTCATCCACTGTGCTGTGCTCACAACACTTGTGCTGCCACATGGCAT
1601 TGGTGCCTCCTGACTTTAGGGGAGATTTTATGATGGTATTTTGTGACAGAGGAAGAAAAGGGGTCACAGGAGAAAACATTTTTTTTCTGGGAAAAAT
1701 CACTTGCTTTTACTTATGCACTTGTTTTAACTTAGTGATGACTGTGATTTCTCCAAGCTGTGATACAGCAGTTTTTTTTTTATGTCACAGGGAATA
1801 AATGGTACCAGAAGTCCCTTCTGTTCTGCTCTTCAATGTAATGGAAGTTTCAGTTGGGCATGAGCCTGGAGAGATGTGACTGTCTACAGTCTTATTT
1901 GTATATATAAAAAGAAGACTGAAAGTCTTTGACATGGATATTGTGAATGGTATGAACTTTAAACCATATTTATGATGATGAAAATTTTCTGGGAA
2001 CTCAGTAGGAATAATACCGTATTAAGGAATAACTGTACATAAAACATCATGAAACCCCTAGATATGAAATCCCTGAACTGTGATCATGGTGGTTAT
2101 GTTTGTCTATTCTTTGCTGTTGTGCTCATAAAAAGAGAATGAGGCTCTTGTGCTAGAGCTTCGATTTGCTTTGGAAGTTCATCTGTGTTTTATTTCT
2201 CCCTGAAGCCCTATCTTTATGGCTTACTTGAACATGAAAGTAGTAGTGTCCAGAAAATAGTGTCCCAATATTTAAACAATGTTGACATGTTTT
2301 GTTCAAGTCAGCAAGCTCTATGTGAGTCTCAGGAAGTGAATTAATTTGGACCTTATGTTTTACTCTGTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATGTTACTTAA
2401 GACTCTCTCCTGACTCAGGAGAGAAAACCCCTTGTGGAAGGACAGCATGGTGATCAGGCAATTTCTCTGGTCCCAAGAAGTACATTTGACACAGTAT
2501 TTTGAAACAGCTTAGTTTTCAAATATATCTTTAATATATAGTAATGTAACATTTTCAGTATTAATGATATAAAAAGCACTCTAATATATAATTCAGTT
↓a
2601 TTTGTAAGGTTATTTGCATAAAAATTTAATATGTCTTAACTAATTTTGGTAAATTACTTCTTTTTTTCTTTTTTAAATAAAAAGTGTACTCATTAACTTT
2701 GCTTATAATGCTTTTTTATAGCCAGCACAGAATTTAAAGCCATACCACAAAAGTACCTGTGTGTTAATATGTTTTCTTTGATGATAGATGACTAT
2801 TTGCAATAGTATTAGTATTTACCATTTTCCAAATTAGCAACTACCAGACTCAGCTGTGTCAGTGATAACAATGCATTGGATTCAGTTTTGTGAAAA
2901 TGGATTCGTGGCCATCCAAGGATGATCAGGATGATCAGCTGATGAGAGGCTCCAGAAGGATTTCTAGATCGCTTCAAGCCTATACTGATGGCCTTA
3001 GCTTTGCTCAGTCAATTTGACTGGGATTTGTTGCTTACCTGCTACCTGCTATGATATAAATAGTACTCCTGGAGAGCCCTGGCTGCCTA
3101 CACCAGTGGAAAAGAGTCTCCAGTCTGCTCTGCTCTACTAAGTGTACCTGAGAGAACACATGTTCAATTTGACATGATTGAAGCTGGATCCGTTAT
3201 ATGAAGATCCTGTCAAGCTTCTTCTGTGGTCTGATTAGTGCTTCTACTGATACCGGGGACCTCCTCTGGTACTTTAAGTGTTTTGTAAATATAT
↓b
3301 TTACTTTTTGGAATGGTGTAAAGCCTAACCAAGTAAAGATCTTTGCCTAAGTTTTGATTTTCTCAAATATTGTGTTCAATTAGTCTAGACTGGGAATGG
3401 .GGAGGGGAAATGGGAAAATGAATGAATGAAATCAGAAAAGGTCAGCGGCTCAGTAAATACAGTTTAAAGAGAGAAATTAATCTCAGAGCTACCCCTT
3501 TAAGAAAAACCATCAGAAATGAAATGTTATATAAAGTTATAAAGCTTATAAAGCCATGTGTTTTGTTATATAACAATCAGAGATGTTATTTAGAAATCGAAT
3601 CCCATCTAAAGAATCAATTTGAGTCTGACATTTCCAGGACAGATATTGCTTACTCATTCTTTGCTTTGAAATAGGGCTTTCCCTTCAAATGG
3701 CTATTTTAGGCTAGGATGTTAATCAGGATTTGTGTGGGAATAAAGTAAATGTCATTTTGTCTTTAAGCCATTTCTGATGATATAGCCAAAGCA
3801 GTTGTCTGACTATGTAGGATTTTACATCTTGAACCTAAATCAGAAATCAGACATGAAAATAACCTTTCTAGAATGCCTAGGAGCAGAAAACAATAAT
3901 AGCATGCTAAATCACAATGATGCTATGATGAGGATGTAATATCAGTGTCTGTCATTTCTGGGTTTATTGAAGCCTCTTGTGTATATATCTCTCA
4001 AAAATTAATGTAATGACATCTCAAGAAATGTTTCTATTGCTTCCATTCAATCAGAGATGTAATTTGATGGACTAAATAAAAAGTATTTATATGTA
↓c
4101 TG 4102

```

Kuva 2.1 β3Glc-T:n cDNA ja siitä oikeassa lukekehysessä käännetty aminohapposekvenssi. Alleviivauksella on sekvenssiin merkitty alun perin transmembraanidomeeniksi määritelty alue, jonka nykyisin oletetaan toimivan solulimakalvostoon ohjaavana signaalisekvenssinä. Tähän sekvenssiin kuuluvat myös neljä ensimmäistä aminohappoa. Mustalla laatikolla on sekvenssiin merkitty glykosyylitransferaasin aktiivisen kohdan DxD-motiivi, harmaalla laatikolla KDEL-tyyppinen signaalisekvenssi ja vaaleilla laatikoilla tietokone-ohjelman avulla ennustetut mahdolliset glykosylointikohdat. Katkoviivalla on merkitty katalyyttisen domeenin ja varsidomeenin sekvenssit, joiden välillä on havaittu samankaltaisuutta. Kolme erilaista polyadenylointialoituskohdalla on merkitty alleviivauksilla ja mRNA:n kolme erilaista lopetuskohtaa a-, b- ja c-kirjaimilla. (Heinonen ym., 2003.) Lisäksi kuvaan on vaalean harmaalla merkitty työssä tuotettava aminoterminaliseksi domeeniksi nimetty alue.

Useimmat glykosyylitransferaasit ovat tyypin II kalvoproteiineja, jotka kiinnittyvät Golgin laitteeseen tai solulimakalvostoon. Ensimmäisessä β 3Glc-T-julkaisussa aminohappojen 4-28 oletettiin sekundaarirakenne-ennusteiden perusteella muodostavan transmembraanidomeenin. Myöhemmissä julkaisuissa tämä ennuste kuitenkin osoitettiin vääräksi, sillä hiiren β 3Glc-T:n ortologilla tämä alue on liian lyhyt ollakseen tyypin II transmembraanidomeeni. Nykyisen oletuksen mukaan tämä alue on signaalipeptidi, joka ohjaa proteiinin solulimakalvostoon. (Sato ym., 2006.)

Kalvoihin kiinnittyvissä glykosyylitransferaaseissa varsidomeenien tehtävä on antaa katalyyttiselle domeenille tilaa liikkua etäämmällä kalvosta. Tämän vuoksi varsidomeenin rakenne on yleensä joustava ja sisältää vähän sekundaarirakenteita. (Breton ym., 2001.) β 3Glc-T:n varsidomeeni ei ole kovin tyypillinen, sillä sen rakenne on ennusteiden perusteella globulaarinen, ja sekvenssivertailut osoittavat varsidomeenin olevan paikoin samankaltainen katalyyttisen domeenin kanssa. Tämän alueen tehtävä saattaa liittyä oligomerisoitumiseen, substraattien tunnistukseen, oikean toimintaympäristön tunnistukseen tai alueella voi myös olla omaa katalyyttistä aktiivisuutta (Heinonen ym., 2003). Varsialueen aminohapoista 29-240 muodostuvaa aluetta nimitetään tässä työssä aminoterminaaliseksi domeeniksi.

Katalyyttisen domeenin rakenne glykosyylitransferaaseilla on harvoin yllätyksellinen. Vaikka tämä alue eri glykosyylitransferaaseilla on aminohapposekvenssiltään usein hyvin erilainen, voidaan glykosyylitransferaasit jakaa katalyyttisen domeenin rakenteen perusteella kahteen superperheeseen, GT-A ja GT-B. Kummankin superperheen sisällä glykosyylitransferaasien katalyyttinen alue on hyvin konservoitunut. β 3Glc-T kuuluu GT-A-superperheeseen, jolle on tunnusomaista Rossmannin laskosta muistuttava $\beta/\alpha/\beta$ -kerrosrakenne. GT-A-superperheen jäsenillä tämä rakenne päättyy entsyymien substraatin sitomisen kannalta olennaiseen DxD-motiiviin, jossa x voi olla mikä tahansa aminohappo. Aktiivisessa rakenteessa DxD-motiiviin on sitoutuneena kahdenarvoinen kationi, yleensä Mn^{2+} , joka sitoo substraatin oikeaan kohtaan entsyymiä katalyyysin käynnistymiseksi. (Breton ym., 2006.) DxD-motiivin lisäksi β 3Glc-T:n katalyyttisen domeenin aminohapposekvenssi sisältää kaikki β 1,3-glykosyylitransferaasi-perheen jäsenille tyypilliset 12 aminohappoa viidessä konservoituneessa motiivissa (Heinonen ym., 2003).

β 3Glc-T:n aminohapposekvenssin neljä viimeistä karboksyylipään aminohappoa muodostavat KDEL-tyyppisen signaalisekvenssin (REEL), joka estää proteiinin kulkeutumisen pois solulimakalvostosta (Sato ym., 2006). β 3Glc-T:n onkin osoitettu sijaitsevan solulimakalvostossa kalvoihin sitoutumattomana entsyyminä (Kozma ym., 2006). Ihmisessä β 3Glc-T:n mRNA:n on

todettu ilmentyvän kaikissa tähän asti tutkituissa kudoksissa. Ilmentymisen on kuitenkin havaittu vaihtelevan kudostyyppin mukaan, joten β 3Glc-T-geenin oletetaan olevan voimakkaan kudskohtaisen säätelyn alaisena (Heinonen ym., 2003). Hiirestä on β 3Glc-T:n ortologin muriinin mRNA:n ilmentymistasoja mitattu aikuisen yksilön kudosten lisäksi myös kudosten eri kehitysvaiheissa. Näiden tutkimusten perusteella muriinin ja todennäköisesti myös β 3Glc-T:n voidaan olettaa olevan kudskohtaisen säätelyn lisäksi myös kehitysvaihekohtaisesti säädelty. (Heinonen ym., 2006.)

2.1.2 β 3Glc-T:n aktiivisuus

Glykosyylitransferaasit luokitellaan entsyymaattisen aktiivisuutensa perusteella perheisiin (CAZY-luokitus <http://www.cazy.org/>), joita vuonna 2008 oli 91. Jo ennen entsyymaattisen aktiivisuuden kokeellista selvitystä β 3Glc-T voitiin määrittellä katalyyttisen domeenin aminohapposekvenssin perusteella kuuluvaksi GT31-perheeseen, jonka jäsenet liittävät UDP-sokerin sokeriosan β 1,3-sidoksella toiseen sokeriin (Heinonen ym., 2003).

Vuonna 2006 julkaistiin kaksi tutkimusta, joissa kummassakin osoitettiin β 3Glc-T:n liittävän glukoosi-molekyylin β 1,3-sidoksella trombospondiinin tyyppi 1:n mukaisessa toistojaksossa (TSR, Thrombospondin Type 1 Repeat) sijaitsevaan O-linkitettyyn fukoosiin (Sato ym., 2006 ja Kozma ym., 2006). Reaktion seurauksena muodostuva Glc β 1,3Fuc-O-Ser/Thr-sokerointi on nisäkässoluille epätyypillinen, sillä sokeriketjun päättävä β -sidoksella ketjun edeltävään sokeriin kiinnittynyt glukoosi on erittäin harvinainen nisäkäsproteiineihin liittyneissä sokereissa. Tämän lisäksi myös fukoosin paikka ketjun keskellä on poikkeuksellinen, sillä yleensä fukoosit sijaitsevat sokeriketjujen päissä. (Moloney & Haltiwanger, 1999.)

Jo vuonna 1999 oli julkaistu tutkimus monissa kudoksissa ja useissa eri lajeissa tunnistetusta entsyymaattisesta aktiivisuudesta, jossa UDP-glukoosin glukoosi liittyi β 1,3-sidoksella O-linkitettyyn fukoosiin. Tämä tutkimustulos oli merkittävä, sillä kyseessä oli ensimmäinen osoitus entsyymistä, joka kykeni pidentämään O-linkitettyä fukoosia. (Moloney & Haltiwanger, 1999.) Muutamaa vuotta myöhemmin osoitettiin tämän O-linkitetyn disakkaridin Glu-Fuc-O-Ser/Thr sijaitsevan verihiutaleiden trombospondiini-1 proteiinin (TSP-1) TSR-domeeneissa CXX(S/T)CG sekvenssiin sitoutuneena. Sekvenssissä X on mikä tahansa aminohappo ja S/T disakkaridin sitova aminohappo. (Hofsteenge ym., 2001.)

TSR-domeenit ovat noin 60 aminohapon pituisia kysteiniipitoisia domeeneja, joita on löydetty tähän mennessä yli 90:stä ihmisen solukalvon tai solun ulkopuolisen väliaineen proteiinista (Heinonen & Mäki 2008). Kaikissa näissä ei kuitenkaan ole disakkaridin muodostukseen tarvittavaa sekvenssiä, joka kolmen tutkitun disakkarin sisältävän TSR-domeenin perusteella on laajennettu edellä esitetystä trombospondiinin TSR-domeenien sekvenssistä $WX_5CX_{2-3}S/TCX_2G$ sekvenssiksi (Shao & Haltiwanger, 2003).

Glu-Fuc-O-Ser/Thr-disakkaridin muodostumisreitillä ennen $\beta 3Glc-T$:n toimintaa proteiini O-fukosyyli transferaasi 2 (POFUT2) tunnistaa TSR-domeenista jonkin edellä esitetyn sekvenssin muodon ja liittää fukoosin kyseisen kohdan treoniini tai seriini tähteeseen. Tämän jälkeen $\beta 3Glc-T$ voi pidentää sokeriketjua liittämällä glukoosin fukoosiin. (Luo ym., 2006.) $\beta 3Glc-T$:n lisäksi tiedetään vain yhden entsyymin O-fukoosi $\beta 1,3-N$ -asetyyli glukosamiinyli transferaasin (Radical Fringe) kykenevän pidentämään O-linkitettyä fukoosia. Tämä entsyymi lisää EGF-toistojaksojen (Epidermal Growth Factor repeats) O-linkitettyyn fukoosiin N-asetyyli glukosamiiniryhmän (GlcNAc), minkä jälkeen sokeriketju pidentyy muiden glukosyyli transferaasien toimesta yleensä vielä kahdella sokerilla tetrasakkaridiksi. (Moloney ym., 2000.)

Sekä $\beta 3Glc-T$ että Radical Fringe kykenevät liittämään UDP-sokerin fukoosiin vain mikäli fukoosi on sitoutunut oikeaan ympäristöön eli Radical Fringen tapauksessa EGF-toistojaksoon ja $\beta 3Glc-T$:n tapauksessa TSR-domeeniin (Luo ym., 2006). Radical Fringen ja $\beta 3Glc-T$:n sekvenssien välillä oli jo aiemmin havaittu heikkoa homologiaa, mutta nyt voitiin osoittaa myös entsyymien toiminnan olevan samankaltainen. Radical Fringeä on tutkittu huomattavasti $\beta 3Glc-T$:a enemmän ja sillä tiedetään olevan merkittäviä rooleja useissa signaalinvälitysjärjestelmissä. Tutkituin näistä signaalinvälitysreiteistä on yksilön kehityksessä tärkeä Notch-signaali. Tämä signaalireitti käynnistyy solukalvolla olevan Notch-proteiinin aktivoitumista säätelevät ligandit sitoutuvat Notch-proteiinin useisiin EGF-toistojaksoihin, joiden O-fukoosia voidaan Radical Fringen avulla muokata ja näin estää tai edistää ligandien sitoutumista ja näin vaikuttaa koko Notch-signaalinnin säätelyyn. (Shao & Haltiwanger, 2003).

TSR-domeeneja sisältävät proteiinit osallistuvat solujen väliseen vuorovaikutukseen, soluväliaineen organisoitumiseen ja solujen kulkeutumiseen. Myös yksilönkehityksessä näillä proteiineilla on merkittävä rooli erityisesti verisuoniston ja hermojen muodostumisessa. Useiden edellä kuvattujen toimintojen takana ovat vuorovaikutukset proteiinin TSR-domeenien kanssa.

(Tucker, 2004.) Vielä ei kuitenkaan ole tutkittu TSR-domeenissa sijaitsevan disakkaridin O-fukosylointikohdan sokeroinnin vaikutusta TSR-domeenien vuorovaikutuksiin ligandien kanssa, joten jää vielä selvitetäväksi toimiiko β 3Glc-T Fringen kaltaisena säätelijänä näissä signaalireiteissä. β 3Glc-T:n mutaatiosta aiheutuvat sairaudet ja epämuodostumat Peters' Plus –oireyhtymää sairastavilla potilailla kuitenkin kuvaavat aktiivisen β 3Glc-T:n välttämättömyyttä monissa eri kudoksissa yksilön kehittyessä.

2.1.3 Peters' plus –oireyhtymä

Peters' plus –oireyhtymä on autosomaalisesti ja peittyvästi periytyvä tauti, joka aiheutuu β 3Glc-T-geenin mutaation aiheuttamasta aktiivisen β 3Glc-T:n puuttumisesta elimistössä yksilön kehityksen aikana (Lesnik Oberstein ym. 2006). Peters' plus –oireyhtymä on harvinainen ja tähän mennessä raportoituja tapauksia on alle 70 (Heinonen & Mäki 2008).

Peters' plus -oireyhtymää sairastavat henkilöt ovat tyypillisesti lyhyitä, ja heillä on lyhyet raajat, mutta leveät kädet ja jalat. Peters' plus –oireyhtymää sairastavien kehitys on viivästynyt niin sikiökaudella kuin syntymän jälkeenkin, ja suurimmalla osalla potilaista on todettu eriasteista henkistä jälkeenjääneisyyttä. Kaikilla tähän mennessä raportoiduilla Peters' plus –oireyhtymää sairastavilla on havaittu synnynnäinen silmän epämuodostuma, joka suurimmalla osalla potilaista on Peterin anomaliaksi nimetty silmän sarveiskalvon samentuma (Wenniger-Prick ym. 2002). Peterin anomalian lisäksi potilaiden silmien tyvikalvoissa on usein havaittu vaurioita, ja myös silmänpainetautia ja kaihia on esiintynyt joillakin potilailla. Peters' plus -oireyhtymää sairastavalle potilaalle ominaiset kasvonpiirteet ovat voimakas otsa, pieni leuka, epämuodostuneet korvat, ohut ylähuuli, kaukana toisistaan olevat silmät ja matala hieman ylöspäin kääntynyt nenä, joka on normaalia kauempana ylähuulesta. Usein potilailla on myös huuli- ja suuhalkio. Näiden piirteiden lisäksi potilailla on raportoitu epämuodostumia useimmissa sisäelimissä. Jossain tapauksissa Peters' plus –oireyhtymän on havaittu johtavan niin vakaviin kehityksen häiriöihin jo sikiökaudella, että ne ovat aiheuttaneet sikiön kuoleman. (Hennekam ym. 1993.)

Lesnik Oberstein ja kumppanit julkaisivat vuonna 2006 tutkimuksen, jossa he olivat etsineet vertailevan genomisen hybridisaation (CGH, comparative genomic hybridization) avulla muutoksia kahdenkymmenen Peters' plus -oireyhtymää sairastavan potilaan genomeista. Kahden aineistoon kuuluvan veljen genomista tutkijat havaitsivat kromosomi 13:sta q-käsivarren alueella häviämisen, jonka myötä kuusi geeniä puuttui tästä kromosomista. Kaikki nämä geenit sekvensoitiin veljesten toisesta kromosomi 13:sta, jossa häviämää ei ollut tapahtunut. Sekvensointi osoitti pistemutaation

tapahtuneen β 3Glc-T-geenissä. Pistemutaatiossa kahdeksannen intronin ensimmäinen G oli muuttunut A:ksi, mikä aiheutti geenin kahdeksannen eksonin silmukoitumisen pois lopullisesta mRNA:sta. Eksonin silmukoitumisesta puolestaan seurasi oikean lukukehyksen häviäminen, jolloin lopputuloksena oli entsyymi ilman toimivaa katalyyttistä domeenia. (Lesnik Oberstein ym. 2006.)

Kaikista 20:sta potilaasta 16:n todettiin olevan homotsygoottisia tämän mutaation suhteen. Neljästä heterotsygootista kahdelta puuttui toinen alleeli kokonaan ja kahdella havaittiin tutkittua pistemutaatiota sisältämättömässä geenissä toinen pistemutaatio, joka sijaitti intronissa viisi. Myös tämä pistemutaatio aiheutti virheellisen silmukoinnin ja lukukehyksen muutoksen, jonka vuoksi toiminnallista entsyymiä ei muodostunut. Näiden tulosten perusteella voitiin siis osoittaa jokaisen Peters' plus -oireyhtymästä kärsivän potilaan β 3Glc-T -geenin molempien alleelien mutatoituneen niin, että kyseinen yksilö ei kyennyt tuottamaan aktiivista β 3Glc-T:a. (Lesnik Oberstein ym. 2006.)

Edellä kuvatun tutkimuksen yhteydessä ei kuitenkaan löydetty glykosylaatiopuutteita Peters' plus -oireyhtymää sairastavista potilaista (Lesnik Oberstein ym. 2006). Syynä tähän oli, että tutkijat olivat vertailleet O-linkitettyjen sokerirakenteiden sijaan N-linkitettyjä sokerirakenteita Peters' plus -oireyhtymää sairastavien ja terveiden henkilöiden välillä, sillä tutkimuksen tekoaikaan ei β 3Glc-T:n aktiivisuutta vielä tunnettu. Puutteellinen proteiinien glykosylointi Peters' plus -oireyhtymää sairastavilla potilailla todistettiin Hessin ja kumppaneiden tänä vuonna julkaistussa tutkimuksessa, jossa aineistona käytettiin neljää Peters' plus -oireyhtymää sairastavaa ja kolmea tervettä henkilöä. Kaikilta tutkimukseen osallistuneilta analysoitiin massapektrometrian avulla verinäytteistä puhdistetut properdiini-proteiinit. Nämä mittaukset osoittivat terveiden henkilöiden kaikissa neljässä properdiinin TSR-domeenissa olevan O-linkitetyn fukoosin, johon glukoosi oli β 1,3-sidoksella kiinnittynyt. Peters' plus -potilailla sen sijaan kaikissa TSR-domeeneissa oli kiinnittyneenä ainoastaan O-linkitetty fukoosi. Tämä tutkimustulos vahvistaa Peters' plus -oireyhtymän luokittelua yhdeksi synnynnäisistä glykosylaatiohäiriöistä aiheutuvia tauteja (CDG, congenital disorders of glycosylation). (Hess ym. 2008.)

Tutkimusten perusteella Peters' plus -oireyhtymän perimmäisenä syynä voidaan pitää mutaatiota β 3Glc-T-geenissä. Taudin fenotyypin vaikuttavat kuitenkin monet muutkin tekijät, mistä osoituksena on täsmälleen saman mutaation β 3Glc-T-geenissä omaavien Peters' plus -oireyhtymää sairastavien yksilöiden erilaiset taudinkuvat ja epämuodostumat. (Lesnik Oberstein ym. 2006.) Viimeisten kahden vuoden aikana Peters' plus -oireyhtymän syntyyn vaikuttavista syistä on saatu

paljon lisää tietoa. Vielä ei kuitenkaan tiedetä, mitkä ovat ne β 3Glc-T:n kohdeproteiinit, jotka TSR-domeenien puutteellisen glykolysoinnin vuoksi aiheuttavat Peters' plus -oireyhtymää sairastavien henkilöiden fenotyypin.

2.2 Vierasperäisten proteiinien tuottoon käytetyt tuottoisännät

Vierasperäisiä proteiineja tuotetaan nykyään monissa eri eliöissä, kuten bakteereissa, hiivoissa, homeissa sekä kasvi-, hyönteis- ja nisäkässoluissa. Tuottoisäntää päätettäessä kannattaa tuottojärjestelmien ominaisuuksia vertailla keskenään, sillä jokaisella järjestelmällä on omat etunsa ja rajoitteensa. Sopivan tuottoisännän valinnassa on olennaista huomioida minkälaista proteiinia, kuinka paljon ja mihin tarkoitukseen aiotaan tuottaa.

Bakteerituottoisäntien etuna on niiden käsittelyn ja kasvatuksen helppous sekä edullisuus. Tarkkaan selvitetyn genetiikan ansiosta bakteereille on tarjolla yhä kasvava valikoima erilaisia vektoreita, joiden avulla tuotettavan proteiinin geeni voidaan viedä bakteeriin tarkoituksen mukaisen säätelyn alaiseksi. Eukaryoottiperäisten proteiinien tuotossa bakteerituottoisäntien ongelma on translaation jälkeisten muokkausten puuttuminen tuotetusta proteiinista. Proteiinin laskostuminen on myös usein ongelmallista bakteerien pelkistävissä oloissa, joissa esimerkiksi rikkisidokset eivät pysty muodostumaan, eikä sopivia kaitsijaproteiineja välttämättä ole paikalla. (Baneyx, 2004.) Tyypillisesti tuotetut proteiinit kasautuvatkin toimimattomina sulkeumakappaleina (inclusion bodies) bakteerien solulimaan. Kasautuneiden proteiinien palauttaminen oikeaan toimintakuntoon edellyttääkin sulkeumakappaleiden liuottamista ja proteiinien uudelleen laskostamista. (Gellissen, 2005).

Hiivatuottoisäntiä käytetään yleisesti eukaryoottiperäisten proteiinien tuotossa. Ne ovat bakteerien tavoin kohtuullisen edullisia ja helppoja kasvattaa, mutta toisin kuin bakteereissa, hiivoissa tuotetut proteiinit yleensä laskostuvat oikeaan toiminnalliseen muotoonsa. Hiivat kykenevät tekemään nisäkässolujen kaltaisesti suurimman osan translaation jälkeisistä muokkauksista. (Glick ym., 2003). Hiivojen tapa glykosyloidata proteiineja kuitenkin poikkeaa korkeampien eukaryoottien tavasta, sillä niiden N- ja O-linkitetyt sokeriketjut ovat yleensä huomattavasti pidempiä ja sisältävät enemmän mannoosia. Hiivoilla on myös nisäkässoluja herkempi taipumus glykosyloidata proteiineja, jolloin hiivassa tuotetussa proteiinissa saattaa sokeriryhmä olla liitettynä kohtaan, jossa sitä ei todellisuudessa nisäkäsproteiinissa olisi. (Baneyx, 2004.)

Homeutuottoisäntiä on perinteisesti käytetty teollisuuden tarvitsemien entsyymien tuottoon. Homeiden etu on niiden luonnollinen kyky erittää suuria määriä proteiinia kasvuliuokseen sekä kohtalaisen yksinkertainen ja edullinen kasvatus. (Nevalainen ym., 2005.) Ei-sieniperäiset proteiinit tuottuvat kuitenkin toistaiseksi huonosti homeissa. Suurimpana syynä tuoton pienuuteen pidetään homeiden solun ulkopuolelle erittämiä proteaaseja, jotka hajottavat vierasperäisen proteiinin. Tämän vuoksi onkin kehitetty homekantoja, joissa proteaasien ilmentymistä on vähennetty tai se on estetty kokonaan. (van den Hombergh ym., 1997.) Homeet kykenevät usein laskostamaan nisäkäsperäiset proteiinit oikein, samoin suurin osa translaation jälkeisistä muokkauksista tapahtuu nisäkässolujen kaltaisesti. Homeiden ongelma nisäkäsproteiinien tuotossa on ylemmistä eukaryooteista poikkeava sokerointi. Homeet kuitenkin kykenevät lyhentämään N-glykaaneja, toisin kuin hiivat, joten pitkiä mannoosista muodostuvia sokeriketjuja ei homeilla yleensä muodostu. Homeiden etuna hiivoihin verrattuna onkin, että ne harvoin hyperglykosyloivat tuotettavaa proteiinia. (Maras ym., 1999.)

Hyönteissolut ovat yksi uusimmista tuottoisännistä. Bakulovirusten avulla infektoituna ne saadaan hetkellisesti tuottamaan suuria määriä vierasperäistä proteiinia (Smith ym., 1983b). Nisäkässoluihin verrattuna hyönteissolut ovat helpompia ja edullisempia ylläpitää, mutta ne kuitenkin kykenevät laskostamaan ja muokkaamaan tuotetut proteiinit ylempien aiotumallisten solujen kaltaisesti. Virusinfektioon perustuvan tuoton ongelma on sen lyhytkestoisuus, jonka vuoksi hyönteissolutuottoa on tehty myös pysyvän geeninsiirron avulla. Pysyvän tuottolinjan teko on kuitenkin työläs ja pitkäkestoinen prosessi. Lisäksi pysyvän geeninsiirron avulla aikaansaadut tuottotasot ovat olleet huomattavasti heikommat kuin virusinfektioon perustuvassa tuotossa. (McCarroll & King, 1997.) Hyönteissolut O-glykosyloivat proteiinit nisäkässolujen kaltaisesti, mutta N-linkitettyjen kompleksisten sokerien muokkausreitit eroavat näiden tuottoisäntien välillä. (Kost ym., 2005.)

Kasvisolut ovat toinen uusista teollisuuden ja tutkimuksen hyödyntämistä vierasperäisten proteiinien tuottoisännistä. Kasvisolujen etuna on bakteerien kaltainen edullinen kasvatus ja ylläpito synteettisessä elatusliuoksessa yhdistettynä korkeampien eukaryoottien translaation jälkeiseen muokkaukseen. Tämän lisäksi kasvit eivät sisällä tunnettuja patogeenejä, jotka voisivat saastuttaa lopputuotteen. (Hellwig ym., 2004.) Siirtogeenisten kasvien eduksi voidaan laskea myös tuotetun proteiinin varastoinnin ja jakelun helppous, sillä esimerkiksi vasta-aineiden on havaittu säilyvän toiminnallisina huoneenlämmössä varastoiduissa siemenissä useita kuukausia. (Fischer &

Emans, 2000). Ongelmana monilla kasvituottoisännillä on tuotettavan proteiinien alhaiset ilmentymistasot ja uusien siirtogeenisten kasvilinjojen luontiprosessin pitkäkestoisuus, sillä usein vasta kahden tai jopa yhdeksän kuukauden kuluttua transformaatiosta voidaan tuotetun proteiinin ominaisuuksia tarkastella. Kasvien translaation jälkeinen muokkaus tapahtuu hyvin samankaltaisesti kuin nisäkkäillä. Suurin ero muokkauskoneistojen välillä on Golgin laitteessa tapahtuvassa kompleksisten N-glykaaniketjujen muokkauksessa. (Chen ym., 2005.)

Nisäkässoluilla proteiinin tuotto on vaativaa ja kallista. Muihin tuottoisäntiin verrattuna nisäkässolujen jakautuminen on hitaampaa, solutiheys alhaisempi ja vierasperäisen proteiinin tuotto solua kohden usein vähäistä. Nisäkässolut ovat lisäksi herkkiä mekaanisille rasituksille, voivat sisältää patogeenejä, sekä tarvitsevat kasvaakseen kalliita erikoiskasvuliukuksia. Jatkuvan pitkäaikaisen tuottojärjestelmän luominen nisäkässoluissa on vaativaa, sillä nisäkässolujen elinkykyisyyden ja tuotettavien proteiinien geenien aktiivisuuden tulee säilyä koko tuotto prosessin ajan. Näistä ongelmista ja heikkouksista huolimatta suurin osa terapeuttisista proteiineista valmistetaan nisäkässoluissa, sillä ne kykenevät tuottamaan luontaisessa toiminnallisessa muodossa olevia, oikein laskostuneita ja muokattuja, vierasperäisiä nisäkäsproteiineja. (Gellissen, 2005.) Pieniä eroja erityisesti terminaalisisissä sokereissa ja niiden kiinnittymisessä muuhun ketjuun tosin esiintyy eri nisäkkäiden, saman nisäkkään eri kudosten ja jopa saman nisäkkään saman kudoksen erilaisten fysiologisten tilojen välillä (Grabenhorst ym., 1999).

2.3 *Bakulovirus-hyönteissolu-tuottojärjestelmä*

Viimeisten parin vuosikymmenen aikana hyönteissolut ovat saavuttaneet merkittävän aseman vierasperäisten proteiinien tuottajana. Suurin vaikuttaja tähän on ollut 1983 julkaistu BEVS-menetelmä (Baculovirus expression vector system), jonka avulla hyönteissolut saadaan hetkellisesti tuottamaan suuria määriä vierasperäistä proteiinia (Smith ym., 1983b). BEVS-menetelmässä hyönteissolut infektoidaan bakuloviruksilla, jotka sisältävät tuotettavan proteiinin geenin erittäin vahvan polyhedriinipromoottorin alaisuudessa. Solun sisällä tuotettavan proteiinin geenin määrä moninkertaistuu, kun virus monistaa perimäänsä. Noin vuorokauden kuluttua infektiosta polyhedriinipromoottori aktivoituu ja käynnistää vierasperäisen proteiinin runsaan tuoton. Proteiinin tuotto on kuitenkin lyhytaikainen, sillä viruksen vaikutuksesta hyönteissolut tuhoutuvat jo noin 10 vuorokauden kuluttua infektiosta. (Invitrogen, 2002a.)

2.3.1 Tuottojärjestelmän edut ja ongelmat

BEVS-menetelmän ongelmana on virusten vaikutus solun normaaliin toimintaan. Vierasperäisen proteiinin tuoton ollessa suurimmillaan lyyttisen syklin loppuvaiheessa on solun kunto kaikista heikoimmillaan, sillä virusproteiinien tuotanto on syrjäyttänyt lähes kokonaan solun omien proteiinien tuotannon. Tällöin solu ei enää pysty pitämään yllä tuotettavalle proteiinimäärälle riittävää entsyymikapasiteettia erityis- ja muokkauskoneistossa. Tästä syystä tuotettujen proteiinien muokkaus voi jäädä keskeneräiseksi ja erityisreitin ollessa täynnä, osa tuotetusta proteiinista kasautuu solun sisälle. (Altmann ym., 1999.) Tuotetun vierasproteiinin määrää vähentävät myös proteaasit, joita vapautuu tuoton joka vaiheessa. Niitä muodostavat sekä isäntäsolu puolustautuakseen bakulovirusta vastaan että bakulovirus tuhotakseen isäntäsolunsa osana lyyttistä järjestelmäänsä. (Ikonomou ym., 2003.)

Hyönteissolujen proteiininmuokkauskoneistoa on tutkittu ahkerasti, sillä hyönteissolutuoton avulla pyritään tuottamaan myös terapeuttiseen käyttöön tarkoitettuja proteiineja, joissa oikeanlainen translaation jälkeinen muokkaus on erityisen tärkeää. Painopiste on ollut N-sokeroinnissa, sillä siinä on havaittu merkittäviä eroavaisuuksia nisäkkäiden ja hyönteissolujen välillä. Sokeritähteiden on havaittu kiinnittyvän samoihin kohtiin peptidiä ja ensimmäisten solulimakalvostolla tapahtuvien muokkausten olevan samankaltaisia. Kahdesta N-asetyyli-glukosamiinista ja useasta mannoosiyksiköstä koostuvien korkeamannoosisokerien (high-mannose-oligosaccharides) on myös todettu rakentuvan Golgin laitteessa samaan tapaan hyönteis- ja nisäkässoluissa, mutta nisäkäsproteiineissa huomattavasti runsaammin esiintyvien kompleksisten sokerien muokkausreitit eroavat näillä tuottoisännillä ratkaisevasti toisistaan. (Kost ym., 2005.)

Sokerinmuokkausketjun kohdassa, jossa $\text{GlcNAc-Man}_3\text{-GlcNAc}_2$:iin nisäkässoluissa tyypillisesti lisätään uusi GlcNAc, hyönteissolut poistavat viimeisenkin sokeriketjun päässä olevan GlcNAc:n. Tämän jälkeen nisäkässoluissa sokeriin tyypillisesti liitetään lisää sokeriyksiköitä ja ketjujen päihin nisäkäsproteiineille ominaiset sialihapot. Hyönteissoluissa puolestaan sokeriketjua voidaan vielä entisestään lyhentää. Tuloksena erilaisesta muokkauksesta onkin, että hyönteissoluilla tuotetussa nisäkäsproteiinissa on lyhyt sokeriyhdistelmä (paucimannose) kohdassa, jossa nisäkässokeroinnin mukaisesti pitäisi olla kohtalaisen pitkä kompleksinen sokeri. (Jarvis, 2003.) Ketjujen pituuden lisäksi ongelmallinen voi myös olla fukoosiryhmän sijainti, sillä hyönteissolut voivat liittää fukoosiryhmän asparagiiniin sitoutuneen N-asetyyli-glukosamiinin eri hiileen kuin nisäkässolut.

Väärään hiileen liitetyn fukoosin epäillään voivan aiheuttaa allergisen reaktion, mikäli kyseistä tuotetta käytettäisiin terapiassa. (Altmann ym., 1999.)

Nisäkäsperäisten proteiinien tuottoa on hyönteissoluissa pyritty tehostamaan parantamalla kasvatusolosuhteita ja liuoksia, ottamalla käyttöön uusia vielä tuottavampia hyönteissolukantoja, estämällä proteaasien toimintaa sekä ylituottamalla muokkauskoneiston proteiineja. Nisäkäsperäisten proteiinien sokeriketjujen muokkausta hyönteissolussa on pyritty muuntamaan nisäkässolujen tekemien muokkausten kaltaisiksi siirtämällä hyönteissoluihin nisäkässtyypistä proteiinin muokkausta aiheuttavien entsyymien geenejä sekä poistamalla ja vaimentamalla hyönteistyypistä sokeriketjujen muokkausta edesauttavia geenejä. Näillä menetelmillä onkin onnistuttu nostamaan tuottotasoa sekä tuottamaan proteiineja, joissa on nisäkässolujen kaltaisia kompleksisia sokerirakenteita. (Jarvis, 2003.)

2.3.2 Bakulovirus

Bakulovirus-hyönteissolu-tuottojärjestelmässä bakuloviruksen tehtävä on toimia vektorina, jonka avulla tuotettavan proteiinin geeni saadaan vietyä hyönteissolun sisään sekä monistettua ja ilmennettyä siellä. Proteiinin tuoton lisäksi bakulovirusia hyödynnetään esimerkiksi tuholaistorjunnassa ja lääketieteellisen tutkimuksen menetelmissä. Eräs uusimmista bakulovirussovelluksista tutkimuksen puolella on bakulovirus display –tekniikka, jota soveltamalla bakulovirusia voitaisiin hyödyntää jopa geeniterapian apuvälineenä. Paljon tutkimustyötä on kuitenkin vielä tehtävänä ennen kuin bakulovirusten käyttö geeniterapiassa turvallisina tarkasti kohdennettavina geeninsiirtovälineinä olisi käytännön sairaudenhoidon arkipäivää. (Matilainen, 2006.)

2.3.2.1 Bakulovirusten rakenne ja luokittelu

Bakulovirusten perimä koostuu rengasmaisesta kaksisäikeisestä DNA:sta, jonka koko on tähän mennessä sekvensoiduilla bakulovirustyypeillä todettu vaihtelevan 82 kiloemäsparista lähes 180 kiloemäspariin, ja sisältävän 90:stä 180:een geeniä. Bakulovirukset esiintyvät infektiosyklinsä aikana kahdessa eri muodossa: niin kutsuttuina silmikoituina viruksina (BV, budded virus), joihin ne leviävät yksilön sisällä solusta toiseen, ja okklusiokappaleina (OB, occlusion bodies), joihin ne selviävät yksilön ulkopuolisissa olosuhteissa ja kykenevät leviämään yksilöstä toiseen. (Okano ym., 2006.)

Bakulovirukset voidaan jakaa kahteen sukuun: nukleopolyhedrovirusiin ja granulovirusiin. Molempien sukujen silmikoidut virukset koostuvat viruksen genomista ja sitä ympäröivästä sauvan muotoisesta proteiiniukuoresta, sekä tätä nukleokapsidiksi kutsuttua rakennetta ympäröivästä proteiinipitoisesta lipidivaipasta. Okklusiokappaleiden ominaisuudet sen sijaan poikkeavat bakulovirussukujen välillä. Granuloviruksilla okklusiokappaleet koostuvat tyypillisesti yhdestä virionista, jota ympäröi granuliinista muodostunut kiteinen proteiimirakenne. Nukleopolyhedroviruksilla okklusiokappaleet voivat sisältää yhden tai useamman virionin, joita ympäröi polyhedriinistä muodostunut proteiimirakenne. Nukleopolyhedroviruksilla edellä kuvattua rakennetta ympäröi lisäksi lipideistä ja glykoproteiineista muodostunut vaippa. Erilaisen okklusiorakenteen perusteella suvut voidaan morfologisesti erottaa toisistaan. Vain yhden virionin okklusiokappaleessaan sisältävät munanmuotoiset granulovirukset (300 nm × 500 nm), erottuvat valomikroskoopilla tarkasteltaessa nimensä mukaisesti rakeisina ja kooltaan huomattavasti monitahokkaan muotoisia nukleopolyhedrovirusia (150 nm × 1500 nm) pienempinä. (Kalmakoff & Ward, 2003.)

Tämän hetkisen virusluokittelun mukaisesti nukleopolyhedrovirukset jaetaan kahteen ryhmään MNP-virusiin (Multiple-embedded nucleopolyhedrovirus) ja SNP-virusiin (Single-embedded nucleopolyhedrovirus). SNP-virusten okklusiokappaleiden virionit koostuvat yhdestä nukleokapsidista ja sitä ympäröivästä vaipasta, kun taas MNP-virusten okklusiokappaleiden virioneissa yksi vaippa ympäröi useita nukleokapsideita. Granuloviruksilla vastaavaa jaottelua ei ole, sillä niiden virionit koostuvat vain yhdestä nukleokapsidista ja sitä ympäröivästä vaipasta.

Granulovirusia on toistaiseksi löydetty vain perhossoluista (*Lepidoptera*). Nukleopolyhedrovirukset sen sijaan ovat patogeenisiä useammille niveljalkaisille, erityisesti perhos- (*Lepidoptera*), pistiäis- (*Hymenoptera*) ja kaksisiipislahkoille (*Diptera*). (Jehle ym., 2006.) Yksittäisen bakulovirustyyppin isäntäkirjo on tyypillisesti hyvin kapea, ja yleensä yksi bakulovirustyyppi kykeneekin infektoimaan vain muutamia läheisesti toisilleen sukua olevia lajeja.

2.3.2.2 Infektiosykli

Infektiosykli voidaan jakaa kolmeen vaiheeseen: varhainen vaihe, myöhäinen vaihe ja erittäin myöhäinen vaihe. Vaiheet voidaan erottaa toisistaan hyönteissolussa tapahtuvien muutosten ja viruksen ilmentämien geenien perusteella.

Bakulovirusinfektio uudessa isännässä alkaa, kun hyönteistoukan ruuan mukana syömät okklusiokappaleet kulkeutuvat sen ruuansulatuskanavaan. Suolen alhaisen pH:n vaikutuksesta okklusiokappaleiden suojaavat proteiinirakenteet liukenevat vapauttaen pakatut virionit, jotka kykenevät sulautumaan keskisuolen epiteelisolujen solukalvoon ja näin siirtämään nukleokapsidit solun sisälle. Soluissa nukleokapsidit ohjautuvat tumaan, jossa viruksen DNA vapautuu. Tällöin solun oman geeninlumentakoneiston avulla käynnistyy viruksen varhaisten geenien ilmentyminen.

Varhaiset geenit voidaan jakaa kahteen ryhmään: varhaisiin välittömiin geeneihin ja varhaisiin viivästettyihin geeneihin. Varhaisten välittömien geenien luenta tapahtuu solun oman geeninlumentakoneiston avulla välittömästi viruksen genomien päästyä tumaan. Viivästettyjen geenien luenta tapahtuu nimensä mukaisesti hieman myöhemmin, sillä luentaan tarvitaan varhaisten välittömien geenien geenituotteita. Varhaisten geenien tuotteiden avulla estetään isäntäsolun ajautuminen ohjelmoituun solukuolemaan, pysäytetään solusykli sekä muokataan solun sisäistä ja ulkoista ympäristöä viruksen käyttöön sopivammaksi. Lisäksi varhaisten geenien tuotteita tarvitaan myöhäisessä vaiheessa viruksen genomien monistamiseen ja myöhäisten geenien ilmentämiseen. (Kalmakoff & Ward, 2003.)

Myöhäinen vaihe määritellään alkaneeksi, kun viruksen oman DNA:n monistus käynnistyy, yleensä noin kuuden tunnin kuluttua infektiosta. Soluviljelyssä myöhäiseen vaiheeseen siirtyminen voidaan havaita solujen läpimitan kasvusta ja tuman laajentumisesta. Lisäksi solut lopettavat jakautumisen. (Invitrogen, 2002.) Myöhäisessä vaiheessa solu siirtyy käyttämään geenien luentaan viruksen omaa polymeeraasia. Tämän vuoksi solun omien geenien ilmentyminen estyy ja solun proteiinikoneisto siirtyy lähes yksinomaan viruksen käyttöön. Myöhäisessä vaiheessa tuotetaan erityisen runsaasti nukleokapsidin ja vaipan rakenneproteiineja sekä genomien monistuksessa tarvittavia proteiineja. Myöhäisessä vaiheessa silmikoitujen virusten erityis on runsaimmillaan. Nukleokapsideita kootaan tumassa ja kuljetetaan solulimaan, josta ne silmikoituvat solukalvon läpi solun ulkopuolelle. Silmikoitumisen yhteydessä nukleokapsidien ympärille muodostuu solukalvosta vaippa. Tämä sisältää viruksen leviämisen kannalta tärkeitä glykoproteiineja, jotka on viruksen toimesta tuotettu ja kuljetettu solukalvolle ennen nukleokapsidin silmikoitumista. (Watson 2005).

Erittäin myöhäinen vaihe, jota usein kutsutaan myös okklusiovaiheeksi, alkaa yleensä noin vuorokauden kuluttua infektiosta. Tunnusomaista erittäin myöhäiselle vaiheelle on okklusiokappaleiden muodostamiseen käytettyjen geenien hyvin nopea ja voimakas ilmentäminen. Erittäin myöhäisen vaiheen edetessä silmikoituneiden viruksien erityis solun ulkopuolelle vähenee,

mutta okklusiokappaleiden muodostus kiihtyy. Nukleokapsideita kasaantuu tumaan, jossa ne ympäröidään viruksen muokkaamalla tumakalvolla. Tämän jälkeen muodostunut virioni koteloidaan bakulovirustyyppin mukaisesti polyhedriini- tai granuliinikiderakenteen sisään. Erittäin myöhäisen vaiheen lopussa tuma on täynnä okklusiokappaleita. Solujen kunto huononee infektiocyklin loppua kohti ja viruksen tuottamat proteiinit (kitinaasi ja katepsiini) tuhoavat viruksen infektoimaa eliötä. Seurauksena on solujen hajoaminen ja viruksen kantajan nesteytyminen (liquefaction). Tällöin tumaan pakatut okklusiokappaleet vapautuvat voidakseen infektoida uusia eliöitä. (Kalmakoff & Ward, 2003.)

2.3.3 BEVS (Baculovirus Expression Vector System)

BEVS-menetelmät ovat vakiintuneet yleisimmäksi tavaksi tuottaa proteiineja hyönteissoluissa. Tässä tuottotekniikassa bakulovirusvektorin avulla saadaan aikaan hetkellinen hyvin runsas vierasperäisen proteiinintuotto hyönteissoluissa. Seuraavissa kappaleissa esitellään proteiinin tuottoon BEVS-menetelmällä tarvittavat komponentit ja BEVS-menetelmien kehitys. Luvun lopuksi tarkastellaan hieman yksityiskohtaisemmin bakulovirusvektorin luontia paikkakohtaiseen transpositioon perustuvan menetelmän avulla, joka tällä hetkellä on käytetyin menetelmä bakulovirusvektorien valmistukseen.

2.3.3.1 Käytetty bakulovirustyyppi

Bakuloviruksiksi luokiteltavia virustyyppejä tunnetaan yli 600, kuitenkin näistä vain muutamaa kymmentä on aktiivisesti tutkittu (Szewczyk ym, 2006). Eniten tutkituin ja sovelletuin bakuloviruksista on *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV), jonka voidaan katsoa saavuttaneen malliorganismin aseman bakulovirussovelluksissa.

Alun perin mielenkiintoa AcMNPV:n tutkimista kohtaan herätti sen patogeenisuus useille perhoslahkon hyönteisille, jotka tuhosivat maanviljelijöiden satoja. Tutkimuksissa AcMNPV:n havaittiin monistuvan *in vitro* tietyissä hyönteissoluissa, joita oli mahdollista kasvattaa keinotekoisissa elatusliuoksissa. Tämä mahdollisti viruksen runsaan tuoton tuholaistorjunnan sovelluksiin. AcMNPV:n käyttökelpoisuutta lisäsi myös sen kyky infektoida kohtuullisen suurta isäntäkirjoa, jota pystyttiin vielä laajentamaan siirtämällä virukseen uusia geenejä AcMNPV:n hyvän rekombinaatiokapasiteetin ansiosta. AcMNPV:n avulla havaittiin myös olevan mahdollista aiheuttaa hyönteissoluissa erilaisten, eri isännistä peräisin olevien proteiinin tuottoa. Vaikka AcMNPV:ta edelleen sovelletaan tuhohyönteistorjunnassa, on AcMNPV tutkimuksen painopiste siirtynyt vierasperäisten proteiinin tuottoon. (Taha ym., 1995.) Nykyisistä BEVS-menetelmistä

lähes kaikissa käytetäänkin AcMNPV:ta vektorina, jonka avulla vierasproteiinintuotto hyönteissolussa saadaan aikaan.

2.3.3.2 Käytetyt hyönteissolulinjat

Hyönteissolulinjoja on luotu monien hyönteislajien erilaisista kudoksista ja kehitysasteista. BEVS-menetelmän tuottosoluiksi näistä soveltuvat ne, joissa AcMNPV kykenee monistumaan ja näin levittämään infektiota koko tuottoympäristöön. Sopivien tuottosolujen valintakriteereinä voidaan pitää myös solujen helppohoitoisuutta ja sopeutuvuutta, sekä tietysti kykyä tuottaa vierasperäistä proteiinia viruksen ohjaamana mahdollisimman tehokkaasti ja oikein muokattuna.

Tyypillinen valinta olisi käyttää tarkoin tutkittuja *Drosophila melanogaster* -solulinjoja. AcMNPV:a virusvektorina käyttävien BEVS-menetelmien avulla tapahtuvaan tuottoon *D. melanogaster* ei kuitenkaan sovellu, sillä se kuuluu kaksisiipislahkoon, jonka soluissa AcMNPV:t eivät pysty monistumaan. Suosituimmat hyönteissolulinjat proteiinien tuotossa ovatkin eristetty perhoslahkon *Spodoptera frugiperda*- ja *Trichoplusia ni* -yökkösiltä. *S. frugiperda*-solulinjoista käytetyimmät ovat solulinja Sf21, ja siitä eristetty Sf9-kanta. *T. ni* -kannoista yleisimmin käytössä ovat TN-368 ja BTI-TN-5B1-4, joista jälkimmäisen kannan soluja kutsutaan myös High-FiveTM-soluiksi. (Baneyx, 2004.) Perinteisesti proteiinin tuottoon on käytetty Sf9- ja Sf21-soluja, mutta nykyisin High FiveTM -solujen käyttö tuottoisäntänä on yleistynyt, sillä High FiveTM -soluilla on saatu aikaan Sf9-soluja suurempia vierasproteiinin tuottoja (Hink ym., 1991). Olemassa olevien hyönteissolulinjojen lisäksi uusia hyönteistuottoisäntiä testataan jatkuvasti, jotta saataisiin aikaan vielä suurempiin tuottoihin tai tuotettavalle proteiinille sopivampiin muokkauksiin kykeneviä solulinjoja. (Baneyx, 2004.)

2.3.3.3 Käytetyt promoottorit

BEVS-menetelmissä vierasproteiinin tuotto hyönteissolussa saadaan aikaan infektoimalla hyönteissolut bakuloviruksella, joka sisältää tuotettavan proteiinin geenin erittäin vahvan promoottorin alaisuudessa. Käytetyin promoottori AcMNPV:n tapauksessa on polyhedriinigeenin promoottori *polh*. Tämä promoottori aktivoituu virusinfektion erittäin myöhäisessä vaiheessa hyvin tehokkaasti ja tuottaa viruksen okklusiokappaleiden tärkeintä rakennusainetta, polyhedriinia. Virusinfektion loppuvaiheessa polyhedriinin osuuden kaikista solun proteiineista on havaittu voivan nousta jopa yli 50-prosenttiin. Polyhedriinipromoottorin säätelyn alaisuudessa tuotetuilla vierasperäisillä proteiineilla näin suurta tuottoa ei kuitenkaan ole saavutettu. (Baneyx, 2004.) Toinen AcMNPV:n vierasproteiinien tuotantoon käytetty promoottorivaihtoehto on erittäin

myöhäisessä vaiheessa voimakkaasti ilmennettävän geenin *p10* promoottori. Tämän geenin rooli virusinfektiossa ei ole täysin selvä, mutta sen arvellaan osallistuvan polyhedriinirakenteen kypsymiseen sekä infektoidun tuman hajoamiseen (Okano ym, 2006).

Molemmat edellä esiteltyistä promoottoreista saavat aikaan proteiinin massiivisen tuoton erittäin myöhäisessä vaiheessa viruksen infektiocykliä. Tällöin solun proteiinien muokkauskoneisto on todennäköisesti ehtinyt kärsiä viruksen vaikutuksesta, joten proteiinien muokkaus ei välttämättä onnistu parhaalla mahdollisella tarkkuudella. Mikäli proteiinin oikea laskostuminen on erityisen tärkeää eikä proteiinia tarvitse välttämättä tuottaa suuria määriä, voidaan promoottorina käyttää viruksen infektiocyklin varhaisessa vaiheessa aktivoituvia promoottoreja, tyypillisesti transkriptiota säätelevän *ie1*-geenin promoottoria. Tällöin vierasproteiinin tuotto alkaa heti viruksen infektoitua solun, jolloin muokkauskoneisto ei ole vielä ehtinyt rapautua.

2.3.3.4 BEVS-menetelmän kehitys

Vuonna 1983 Smith, Fraser ja Summers julkaisivat tutkimuksen, jota voidaan pitää BEVS-menetelmän idean perustana. Tutkimuksessa tuotettiin AcMNPV:ia, joiden polyhedriinigeeniin oli tehty erilaisia mutaatioita, lähinnä muutaman sadan emäsparin poistoja. Muunnosten vaikutuksesta geneistä tuotetut mutatoituneet polyhedriinit eivät enää kyenneet muodostamaan okklusiokappaleisiin tarvittavaa kiteistä proteiinirakennetta. Kun näitä okklusio-negatiivisia viruskantoja tarkasteltiin, havaittiin niiden edelleen tuottavan infektoivaa virusta. Tämän lisäksi mutatoituneen polyhedriinin tuottomäärässä ei ollut eroa mutatoimattoman polyhedriinin tuottoon verrattuna. Tästä voitiin tehdä johtopäätös, että tiettyjen polyhedriinigeenin osien tuhoaminen ei vaikuta polyhedriinin ilmentämisen säätelyyn eikä siis proteiinin tuottotasoon. Näiden tulosten perusteella myös esitettiin, että polyhedriinigeenin voisi korvata muulla geenillä ja saada näin aikaan huomattava kyseisen geenin proteiinintuotto viruksen infektoimiskyvyn säilyessä ennallaan. (Smith ym. 1983a.)

2.3.3.4.1 Ensimmäinen BEVS-menetelmällä tehty vierasperäisen proteiinin tuotto

Puoli vuotta edellä esitellyn artikkelin ilmestymisestä samat tutkijat julkaisivat uuden artikkelin, jossa he todistivat vierasperäisen proteiinin tuoton todella tapahtuvan hyönteissoluissa bakuloviruksen polyhedriinipromoottorin ohjaamana. Kokeessa luotiin AcMNPV-kanta, jossa polyhedriinigeeni oli korvattu ihmisen β -interferonin geenillä. Kun Sf21-soluja infektoitiin tämän AcMNPV-kannan viruksilla, saatiin biologisesti aktiivista interferonia tuotettua suurempi määrä kuin millään aiemmin käytetyllä tuottomenetelmällä. Kirjoittajat arvioivat tuotoksi 10 μ g β -

interferonia miljoonaa infektoitua solua kohti. Suuren tuottomäärän lisäksi kirjoittajien mukaan 95 % tuotetusta proteiinista onnistuttiin keräämisen helpottamiseksi erittämään ulos solusta. Ensimmäinen BEVS-menetelmän avulla tuotettu vierasproteiini oli luotu. (Smith ym., 1983a.)

Smithin ja kumppanien käyttämässä BEVS-menetelmässä β -interferonigeenin liittäminen AcMNPV:n genomiin tapahtui *E. coli* -pohjaisen siirtovektorin avulla, sillä 130 kiloemäsparin kokoisesta AcMNPV:n genomista ei tunnettu uniikkia leikkauskohtaa, johon tuotettavan proteiinin geeni olisi voitu suoraan liittää. Käytetty siirtovektori sisälsi polyhedriinin promoottorialueen sekvenssin, β -interferoni-geenin sekvenssin oikeassa lukukehyksessä promoottoriin nähden sekä polyhedriinin lopetussekvenssin. Edellä kuvattu rakenne oli reunustettu villityypin AcMNPV:n polyhedriinigeeniä normaalisti ympäröivällä sekvenssillä. Lisäksi siirtovektori sisälsi tarvittavat osat vektorin monistamiseen *E. coli*:ssa. (Smith ym. 1983b.)

Proteiinin tuottoon ja viruksen monistukseen soveltuvat Sf21-solut transfektoitiin AcMNPV:n genomilla ja siirtovektorilla. Tällöin virusgenomin ja siirtovektorin geeniä ympäröivien AcMNPV:n genomille samanlaisten sekvenssien välillä saattoi tapahtua homologinen rekombinaatio, jonka seurauksena AcMNPV:n polyhedriinigeeni korvautui siirtovektoriin rakennetulla sekvenssillä. Homologisen rekombinaation onnistuminen havaittiin okklusio-negatiivisten plakkien ilmestymisenä viljelymaljalle. β -interferonia tuottavan viruskannan muodostamiseksi näistä plakeista poimittiin viruksia jatkopuhdistusta ja viruksen monistusta varten. (Smith ym., 1983b.) Työään edellä kuvatussa BEVS-menetelmästä teki homologisen rekombinaation tehottomuus, sillä vierasgeeni siirtyi alle prosenttiin viruksista. Lisäksi okklusio-negatiivisten plakkien erottaminen villityypin plakeista oli subjektiivista ja aikaa vievää sekä vaati kokeneen arvioijan ja usein vielä varmistuksen esimerkiksi PCR:n avulla.

2.3.3.4.2 Menetelmän tehostaminen

BEVS-menetelmän potentiaali vierasperäisen proteiinin tuottosysteeminä kiinnosti tutkijoita, ja niinpä menetelmää pyrittiin kehittämään helpommaksi ja nopeammaksi. Ensimmäinen kehitysaskel oli siirtogeenin sisältämien virusplakkien helpompi tunnistus. Tätä varten rakennettiin uusi siirtovektori, joka edellisessä kappaleessa mainittujen osien lisäksi sisälsi reunustavien, AcMNPV:lle homologisten sekvenssien sisäpuolella *E. coli* -bakteereista peräisin olevan β -galaktosidaasin geenin (*LacZ*) ja sen ilmentymistä säätelevän *D. melanogaster* -soluista peräisin olevan *hsp70*-geenin (heat shock-protein70) promoottorin. (Zuidema ym., 1990.)

Hsp70-promoottorin oli aiemmissa Sf21-solulinjan kokeissa havaittu ilmentävän säätelynsä alaista geeniä koko virusinfektion ajan. Siirtovektorin mukaisessa rakenteessa tämä promoottori sääteli nyt *LacZ*-geeniä, jonka tuote β -galaktosidaasi kykenee hydrolysoimaan X-gal:n (5-bromo-4-kloro-3-indolyyli-beta-D-galaktopyranosidi) galaktoosiksi ja sinistä väriä ilmentäväksi kromoforiksi. Kun Sf21-soluihin transformoitiin villityypin AcMNPV:a ja edellä esiteltyä siirtovektoria, voitiin β -galaktosidaasin jatkuvan ilmentämisen ansiosta erottaa tuotettavan proteiinin geenin sisältävistä AcMNPV:sta kehittyneet plakit villityypin plakeista sinisen värin perusteella X-gal:a sisältävissä soluviljelmissä. (Zuidema ym., 1990).

Toinen optimoinnin kohde oli homologisen rekombinaation tehostaminen, sillä edellä kuvatussa tekniikassa vierasgeeni siirtyi vain alle prosenttiin kaikista soluviljelmän AcMNPV:sta. Homologisen rekombinaation tehokkuutta oli esimerkiksi hiiva- ja nisäkässoluilla onnistuttu kasvattamaan linearisoimalla genomiin liitettäväksi aiottu sekvenssi. Tähän ideaan perustuen myös AcMNPV:n genomi pyrittiin linearisoimaan. Linearisointi ei kuitenkaan ollut suoraviivaisesti tehtävissä, sillä AcMNPV:n suuren koon vuoksi jokainen genomien leikkaava katkaisusentsyymi katkaisi genomien vähintään kahdesta kohdasta. Katkaisusentsyymi Bsu36I:lle ei kuitenkaan löytynyt genomien alueelta yhtään katkaisukohtaa, joten AcMNPV:n linearisoimiseksi rakennettiin AcMNPV-kanta AcRP6-SC, johon polyhedriinigeenin keskelle luotiin leikkauskohta Bsu36I:lle. (Kitts ym., 1990.)

Uuden kannan avulla voitiin tehdä infektointikoe AcMNPV:n lineaarisen ja rengasmaisen muodon välillä. Kyvyn infektoida *S. frugiperda*-soluja havaittiin vähenevän 15-150-kertaisesti, kun viruksen genomi linearisoitiin. Yhteistransfektoimalla Sf21-soluja lineaarisella AcMNPV:n genomilla ja siirtovektorilla, havaittiin vierasgeenin siirtyneen 30 %:lle transfektoidun soluviljelmän AcMNPV:sta. Prosenttiosuuden nousu selittyi osittain taustakohinan pienentymisellä, sillä lineaariset villityypin AcMNPV:t infektoivat isäntäsolujaan heikommin, joten vaikka muodostuneiden tuotettavan geenin sisältämien AcMNPV:n määrä pysyisi ennallaan niiden prosentuaalinen osuus viljelmässä olevista AcMNPV:sta kasvaa villityyppien vähentyessä. Toisaalta homologisen rekombinaation avulla AcMNPV:n genomi saavuttaa rengasmaisen, tehokkaammin infektoivan muotonsa takaisin, joten tämän voisi olettaa suosivan homologisen rekombinaation lisääntymistä transfektiossa. (Kitts ym., 1990.)

Muutamaa vuotta myöhemmin julkaistiin edellistä tehokkaampi myöskin AcMNPV:n genomien linearisointiin perustuva transfektiomenetelmä. Tämän menetelmän avulla saavutetaan lähes 100 %

todennäköisyys, että jokainen transfektion jälkeen soluviljelymaljalta löytyvä plakki on peräisin viruksesta, joka sisältää tuotettavan proteiinin geenin. Menetelmässä AcMNPV:n genomiin on luotu kaksi Bsu36I-katkaisukohta polyhedriinigeenin molemmille puolille. Polyhedriinistä alavirtaan oleva katkaisukohta sijaitsee viruksen genomien monistumisen kannalta oleellisessa geenissä, joten Bsu36I-katkaisuelementeillä käsitelty AcMNPV:n genomi ei kykene infektoimaan isäntäsolujaan. Siirtovektori on puolestaan suunniteltu niin, että tuotettavan proteiinin geenin lisäksi siihen on liitetty ne geenit, jotka Bsu36I-käsittelyllä on tehty toimimattomiksi katkaistussa AcMNPV:n genomissa.

Yhteistransfektiossa AcMNPV pystyy infektoimaan hyönteissolut vain, mikäli se ensin homologisen rekombinaation avulla hankkii itselleen puuttuvan, genomien monistumisen kannalta oleellisen, geenin loppuosan siirtovektorilta. Tämän geenin loppuosan lisäksi AcMNPV:n genomiin siirtyvät homologisessa rekombinaatiossa kaikki muutkin siirtovektorin homologisten alueiden väliin liitetyt sekvenssit, kuten tuotettavan proteiinin geeni. Tämän vuoksi hyönteissolumaljalla kaikkien plakkeja muodostavien AcMNPV:n voidaan olettaa käyneen läpi homologisen rekombinaation ja sisältävän tuotettavan proteiinin geenin. (Kitts & Possee 1993.)

2.3.3.5 Bakulovirusvektorin valmistus paikkakohtaisen transposition avulla

Edellisissä kappaleissa kuvattu bakulovirusvektorien luonti hyönteissoluissa AcMNPV:n genomien ja siirtovektorin homologiseen rekombinaatioon perustuen vaatii yleensä useampia plakkipuhdistuskierroksia puhtaan viruslinjan saavuttamiseksi. Plakkipuhdistusten vuoksi uuden bakulovirusvektorin luonti kestääkin useampia viikkoja. Luckow:n ja kumppanien vuonna 1993 julkaisema uusi paikkakohtaiseen transposition perustuva tekniikka nopeuttaa rekombinanttivirusten luontiprosessia huomattavasti, sillä siinä plakkipuhdistus ei ole välttämätön.

2.3.3.5.1 Yleiskatsaus menetelmään

Luckowin tekniikka perustuu sekä *E. coli* -bakteereissa, että hyönteissolussa monistumaan ja toimimaan kykenevän sukkulavektorin (shuttle vector) käyttöön. Sukkulavektori sisältää AcMNPV:n genomien, jonka polyhedriinigeeni on korvattu alueella, joka huolehtii sukkulavektorin replikaatiosta *E. coli* -bakteereissa ja sisältää kohdan, johon tuotettavan proteiinin geeni voidaan transposition avulla liittää. Transposition jälkeen sopivien valintageenien perusteella *E. coli*-viljelmästä voidaan poimia tuotettavan proteiinin geenin sisältävät bakteeripesäkkeet jatkokasvatukseen. Kasvatuksen jälkeen sukkulavektorit eristetään *E. coli* -bakteereista. Kaikki sukkulavektorit sisältävät tuotettavan geenin osana bakuloviruksen genomia, joten niitä voidaan

käyttää heti hyönteissolujen infektoimiseen pienimuotoista proteiinintuottoa tai bakuloviruksen monistusta varten. (Luckow ym., 1993.)

2.3.3.5.2 Sukkulavektorin valmistus

Sukkulavektori, jota usein myös kutsutaan bacmidiksi (baculovirus-plasmid hybridimolekyylillä), on tuotettu Smithin tekniikan mukaisesti AcMNPV:n genomien ja siirtovektorin homologisen rekombinaation avulla. Siirtovektorin AcMNPV:n genomien osien kanssa homologisten sekvenssien väliselle alueelle on liitetty kanamysiini-antibiootille vastustuskyvyn antava geeni, *E. coli*-bakteerissa toimiva replikaation aloitusalue (ori) ja *lacZ* α -geeni, jonka keskelle samassa lukukehyksessä on sijoitettu transposioon tarvittava *attTn7*-elementti. Kun siirtovektori ja villityypin AcMNPV yhteistransfektoidaan hyönteissoluihin ja okklusionegatiivisten plakkien tunnistukseen perustuen jatketaan plakkipuhdistuksia, saadaan lopulta aikaan AcMNPV-kanta, jonka genomi on myös *E. coli* -bakteereissa monistumaan kykenevä sukculavektori. (Luckow ym., 1993.)

Valmistetulla AcMNPV-kannalla infektoiduista hyönteissoluista viruksen genomi voidaan eristää ja transformoida *E. coli* -bakteereihin. Koska AcMNPV:n genomiin edellä kuvatussa homologisessa rekombinaatiossa liitettiin miniF-plasmidilta peräisin oleva miniF-replikaation aloitusalue, kykenee sukculavektori nyt monistumaan myös *E. coli*-soluissa. Replikaation lisäksi ori-alue huolehtii bacmidin alhaisen kopiolukumäärän säilymisestä *E. coli*-bakteereissa. (Luckow ym., 1993.)

2.3.3.5.3 Transformaatioiden onnistumisen tarkistus

E. coli -kantana, johon sukculavektorit siirrettiin, käytettiin DH10B:tä. Tämä kanta ilmentää β -galaktosidaasin puutteellista muotoa (*lacZ* Δ M15), kun laktoosianalogi IPTG (isopropyyl- β -D-1-tiogalaktopyranosidi) indusoi geeniä. Puutteellinen muoto ei ole biologisesti aktiivinen, sillä sen aminohapot 11:sta 44:een puuttuvat. Mikäli soluun siirretään *lacZ* α -geeni, kykenee tämän geenin tuote muodostamaan puutteellisen β -galaktosidaasin kanssa aktiivisen yhdistelmän. Koska sukculavektori sisältää *lacZ* α -geenin, erottuvat IPTG:tä ja X-gal:a sisältävillä maljoilla sinisinä ne *E. coli*-pesäkkeet, jotka transformaatioissa ovat ottaneet sukculavektorin sisäänsä. (Luckow ym., 1993.)

Tuotettavan proteiinin geenin sukculavektoriin siirtoa varten tulee *E. coli*-soluihin transformoida vielä kaksi muuta plasmidia: siirtovektori, jota usein kutsutaan myös luovuttajavektoriksi, ja avustajaplasmiidi. Avustajaplasmiidi sisältää tetrasykliinille vastustuskyvyn antavan geenin ja

transpositiossa tarvittavat geenit. Transpositioon käytetään transposoni 7:a (Tn7), sillä se, toisin kuin useimmat transposonit, liittyy hyvin paikkaspesifisesti tiettyyn kohdesekvenssiin (*att*Tn7). Tämä kohdesekvenssi on kertaalleen *E. coli* -bakteerien genomissa ja lisäksi se on liitetty sukkulavektorin luonnissa keskelle *lacZα*-geeniä. Transposition tapahtuessa sukkulavektoriin *lacZα*-geenin lukukehys sekoittuu, ja geenin tuote ei enää kykene muodostamaan puutteellisen β-galaktosidaasin kanssa aktiivista muotoa, joten pesäkkeen jääminen vaaleaksi kertoo onnistuneesta transpositiosta sukkulavektoriin. (Luckow ym., 1993.)

2.3.3.5.4 Siirtovektorin valmistus

Siirtovektori rakennetaan varsin samaan tapaan kuin Smithin ja kumppanien tekniikassa. Tuotettavan proteiinin geeni liitetään vahvojen, myöhäisessä vaiheessa hyvin aktiivisten polyhedriini- tai *p10*-promootorien säätelyn alaisuuteen. Lisäksi siirtovektoriin liitetään tyypillisesti gentamysiinille vastustuskyvyn antava geeni. Koska edellä kuvatun rakenteen liittäminen sukkulavektoriin perustuu homologisen rekombinaation sijaan transpositioon, Smithin menetelmässä käytettyjä AcMNPV-sekvenssien kanssa homologisia alueita ei rakennelman ympärille tarvita, vaan ne korvataan transposaasi Tn7:n päätte-elementeillä Tn7L ja Tn7R. (Luckow ym., 1993.)

2.3.3.5.5 Insertin siirto sukkulavektoriin

Tn7L- ja Tn7R-päätte-elementtien väliin siirtovektorissa muodostettua aluetta kutsutaan mini-Tn7:ksi, joka pystyy avustajaplasmidin tarjoamien entsyymien avustuksella hyppäämään siirtovektorista sopivaan *att*Tn7-sekvenssiin. Tuotettavan proteiinin geeni tarvittavine promootoreineen saadaan näin vietyä AcMNPV:n genomiin transfektoimalla sukkulavektorin ja avustajaplasmidin sisältämään *E. coli* -bakteeriin siirtovektori. Kuten edellä on todettu, transposition sukkulavektoriin voidaan todeta onnistuneen, mikäli IPTG:tä, X-gal:a, kanamysiinia, gentamysiiniä ja tetrasykliiniä sisältäviltä maljoilta löytyy valkoisia pesäkkeitä. (Luckow ym., 1993.)

2.3.3.5.6 Proteiinin tuotto

Proteiinin tuotto saadaan aikaiseksi, kun valkoisista pesäkkeistä kasvatetuista bakteeriviljelmistä eristetään sukkulavektorit ja niillä transfektoidaan hyönteissolut esimerkiksi kalsiumfosfaattiyhteissaostusmenetelmällä, jossa solu ottaa endosytoosilla sisäänsä kalsiumfosfaattikompleksiin saostuneen DNA:n. Sukkulavektorin päästyä solun sisään AcMNPV:n genomi aloittaa infektiocyklin ja uusia bakulovirusia alkaa muodostua. Erittäin myöhäisen vaiheen

alkaessa noin vuorokauden kuluttua infektiosta myös vierasproteiinin tuotto käynnistyy. (Luckow ym., 1993.)

Edellä kuvattua sukkulavektorin luomista ei tehdä joka kerta uutta proteiinia tuottaessa, vaan kerran luotua kantaa voidaan käyttää useiden proteiinien tuottoon. Lisäksi useat valmistajat tarjoavat valmiita *E. coli* -kantoja, jotka sisältävät sukkulavektorin ja avustajaplasmidit valmiina. Yksi käytetyimmistä kaupallisista paikkakohtaiseen transpositioon perustuvista menetelmistä on Luckow'n ja kumppaneiden käyttämää koejärjestelmää kohtalaisen tarkasti myötäilevä Invitrogenin Bac-to-Bac[®] Baculovirus expression system. Siirtäjävektorin rakentaminen, transposointi sukkulavektoriin ja hyönteissolujen transfektointi kuuluvat uuden vierasperäistä proteiinia tuottavan bakulovirusvektorin luomisen työvaiheisiin.

3 Tutkimuksen tavoitteet

Pro gradu -työn tavoitteena oli optimoida β 3Glc-T:n tuottoa bakulovirus-hyönteissolutuottojärjestelmässä sekä valita ja testata sopivat β 3Glc-T:n puhdistukseen käytettävät menetelmät. Tuoton optimoinnin ja tehokkaan puhdistusmenetelmän valinnan avulla oli tarkoitus tuottaa mahdollisimman paljon riittävän puhdasta β 3Glc-T:a tuottokustannusten kuitenkin pysyessä kohtuullisina. Puhdasta β 3Glc-T:a oli tarkoitus käyttää entsyymiaktiivisuuden määrittämiseen, vasta-aineiden testaukseen ja rakenteen määrittämiseen.

Tämän lisäksi työn tavoitteena oli valmistaa kaksi uutta bakuloviruskantaa, joiden avulla voitaisiin tuottaa hyönteissoluissa kahteen erilaiseen puhdistuskahvaan histidiiniin ja avidiiniin liitettyä β 3Glc-T:n aminoterminaalista domeenia. Uusien viruskantojen avulla pyrittiin tuottamaan runsaasti β 3Glc-T:n aminoterminaalista domeenia, jotta sitä puhdistusprosessien jälkeenkin olisi riittävästi rakenteen määrittämistä varten.

4 Menetelmät

Työ koostui kahdesta osaprojektista, joista toisessa tuotettiin ja puhdistettiin täysimittaista β 3Glc-T:a ja toisessa sen aminoterminaalista domeenia (β 3Glc-T:n aminohapot 29...240). Jälkimmäinen projekteista oli vielä jaettu proteiiniin liitetyn puhdistuskahvatyyppin perusteella avidiini- ja histidiiniprojekteiksi.

Tutkimustyö aloitettiin optimoimalla olosuhteita β 3Glc-T:n tuoton tehostamiseksi, mutta pian rinnalle otettiin myös aminoterminaalisen domeenin tuottoon tähtäävät projektit. Jokaiseen kolmesta projektista liittyy samoja työmenetelmiä, mutta kaikista löytyy myös joitakin vain kyseisessä projektissa käytettyjä menetelmiä.

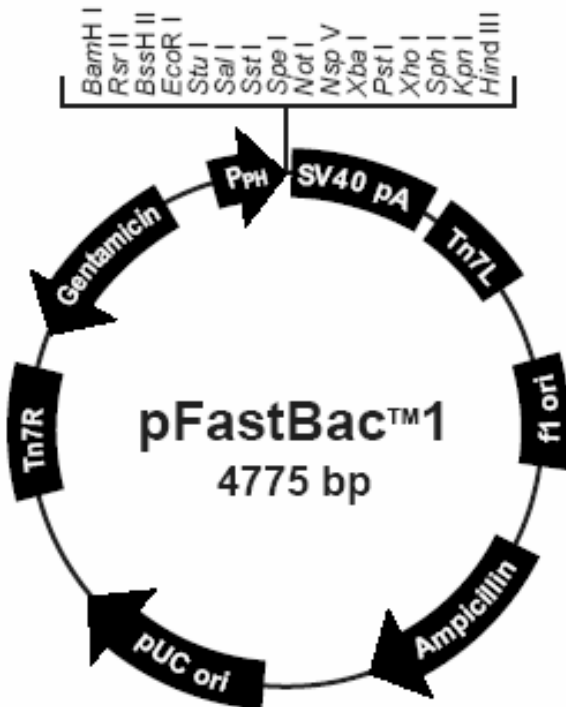
4.1 Bakuloviruskantojen valmistus

β 3Glc-T:n aminoterminaalisen domeenin tuottamista varten suunniteltiin ja valmistettiin kaksi bakuloviruskantaa, joista toinen tuotti histidiinikahvaan ja toinen avidiinikahvaan sidottua aminoterminaalista domeenia. Täysimittaisen β 3Glc-T:n tuottamiseen uutta bakuloviruskantaa ei tarvinnut valmistaa, sillä tuottoon käytettiin Christelle Bretonilta (Centre de Recherche sur les Macromolecules Vegetales, Grenoble, Ranska) saatua valmista viruskantaa.

Uudet bakuloviruskannat luotiin mukailien paikkakohtaiseen transposition perustuvaa Invitrogenin Bac-to-Bac[®]-bakulovirusluontimenetelmää, jonka teoriatausta on esitelty kappaleessa 2.5.3.5. Menetelmässä rakennettiin ensin hyönteissoluissa tuotettavaksi aiottu DNA-insertti, joka liitettiin siirtovektoriin. Siirtovektoreiden monistuksen jälkeen oikean insertin sisältäneitä siirtovektoreita transformoitiin bakuloviruksen genomien sisältäviin *E. coli* -bakteereihin, joissa insertti siirtyi plasmidista osaksi bakuloviruksen genomia transposition avulla. Virustuotto käynnistyi, kun hyönteissolujen päälle lisättiin eristetyt bakulovirusgenomit ja ne solun sisään kuljettava reagenssi. Valmistetut virukset silmikoituivat elatusliuokseen, josta muodostui uusi virusvarasto. (Invitrogen, 2004).

4.1.1 Siirtovektorien valmistus

Siirtovektorina käytettiin Invitrogenin Bac-to-Bac[®] menetelmän mukaista FastBac[™]1-plasmidia, joka oli saatu Henri Nordlundilta (IMT, Tampere). FastBac[™]1-plasmidin rakenne on esitetty kuvassa 4.1.



Kuva 4.1 Invitrogenin pFastBac[™]1:n rakenne. Plasmidi sisältää ampisilliinille vastustuskyvyn antavan geenin, korkean kopioluvun sallivan replikaation aloitusalueen pUC-orin ja f1-orin, jonka aktivoinnin avulla plasmidista voidaan monistaa yksinauhaista muotoa. Näiden lisäksi plasmidi sisältää Tn7R- ja Tn7L-pääte-elementtien väliin jäävän mini-Tn7-transposonin, joka myöhemmässä bakuloviruksen luontivaiheessa siirretään transposition avulla bakuloviruksen genomiin. Minitransposoni koostuu gentamysiini-antibiootille vastustuskyvyn antavasta geenistä, polyhedriinipromootorista (P_{PH}), transkription lopettavasta polyadenylaatiosekvensistä (SV40 pA) sekä polylinkkerialueesta, johon rakennettu insertti voidaan liittää.

4.1.1.1 Inserttien valmistus

Uusien bakuloviruskantojen luonti aloitettiin inserttien suunnittelulla. Histidiinipuhdistuskahvaisen proteiinin tuottoa varten valmistettiin His-insertti ja avidiinipuhdistuskahvaisen proteiinin tuottoa varten Avd-insertti. Molemmat insertit rakennettiin polymeraasiketjureaktiomenetelmällä (PCR, polymerase chain reaction) käyttäen taulukossa 4.1 esitettyä PCR-ohjelmaa. Hybridisaatiolämpötila valittiin jokaisessa PCR-reaktiossa käytettyjen alukkeiden T_m-arvojen mukaan.

Taulukko 4.1 PCR-syklin vaiheet. PCR-ohjelmassa vaiheet 2-4 toistettiin 20 kertaa.

Vaihe	Lämpötila / °C	Aika
1. Alkudenaturaatio	+94	3 min
2. Denaturaatio	+94	1 min
3. Hybridisaatio	+40...+70	1 min
4. Elongaatio	+72	2 min
5. Loppupidennys	+72	10 min
6. Loppuviilennys	+4	0...24 h

Inserttien valmistukseen käytettiin PCR-reaktioseoksia, jotka koostuivat 1 µM Forward-alukkeesta, 1 µM Reverse-alukkeesta, 0,25 U Amplitaq Gold –polymeraasista (Applied Biosystems), noin 100 ng:sta templaattia, 10×PCR-puskurista (Applied Biosystems) ja 0,2 mM dNTP sekoituksesta, joka oli valmistettu dATP-, dCTP-, dTTP- ja dGTP-nukleotideista (Fermentas). Käytetyt alukkeet tilattiin TAG Copenhagen A/S:lta ja ne on esitetty taulukossa 4.2.

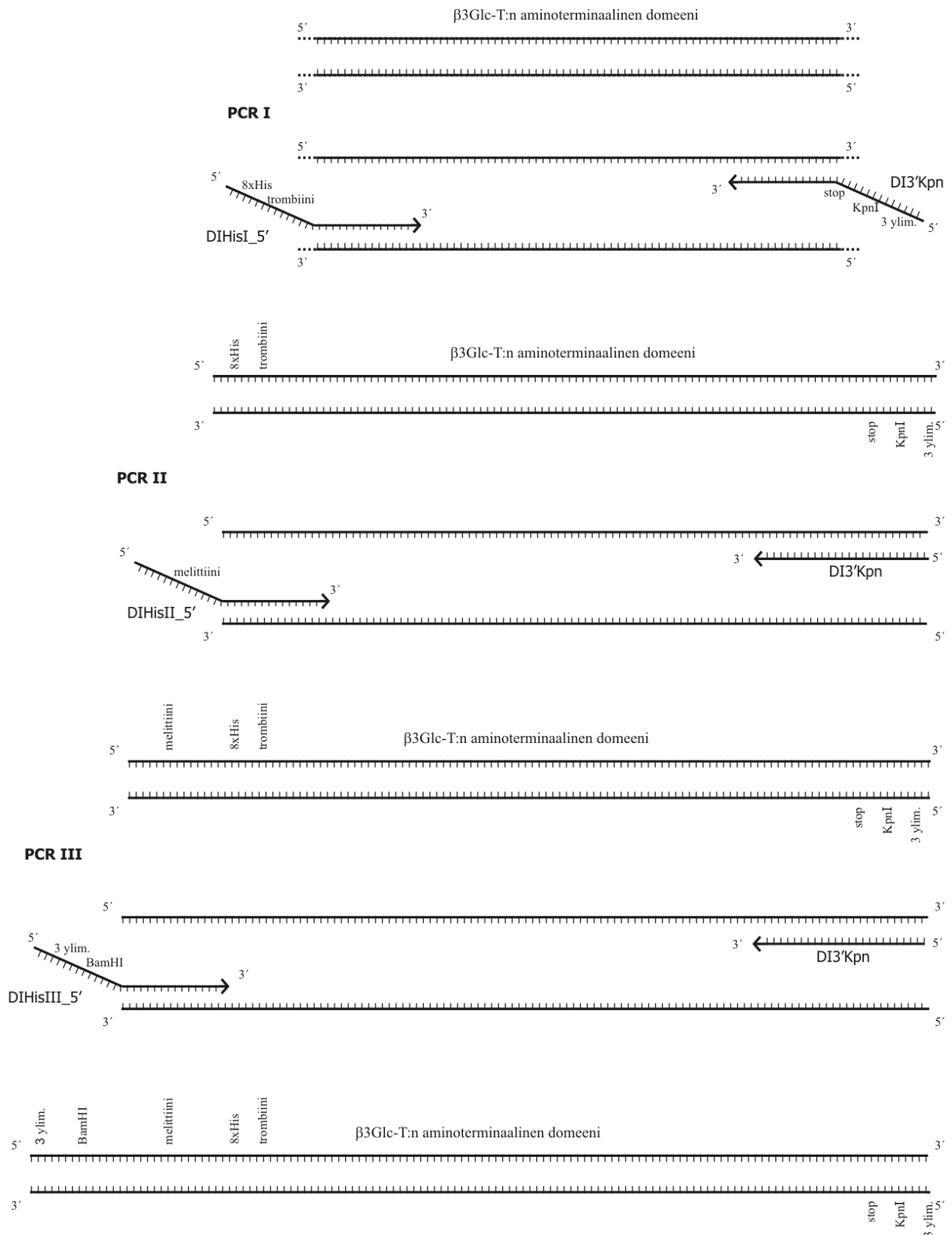
Taulukko 4.2 Työssä käytetyt alukkeet.

Aluke	Sekvenssi
DIHisI_5'	5'-CACCATCACCACCATCACCACCTGGTGCCCCGTGGTTCCTCTGAAGATACAAAGAAAGAG-3'
DIHisII_5'	5'-ATGGTGGTGTACATCTCCTACATCTACGCTGACCGTTGGCACCACCATCACCACCATCAC-3'
DIHisIII_5'	5'-CGCGGATCCATGAAGTTCCTGGTGAACGTGGCTCTGGTGTTCATGGTGGTG TACATCTCC-3'
DI3'Kpn	5'-CGCGGTACCTTAAACTCAGGCACTGGGGTCAG-3'
Avd5'BamHI	5'-CGCGGATCCATGGTGCACGCAACCTCCCCG-3'
DI5'GGS	5'-GGTGGCTCCCTGGTGCCCCGTGGTTCCTCTGAAGATACAAAGAAAGAG-3'
Avd3'GGS	5'-GGGCACCAGGGAGCCACCGGAACCGCCCTCCTTCTGTGTGCGCAGGCG-3'

PCR-reaktioissa muodostuneet tuotteet eroteltiin agarosigeelielektroforeesi-menetelmän avulla 1-prosenttisellä agarosigeelillä, joka oli valmistettu Certified Molecular Biology agarosista (Biorad) ja 0,5×TBE-puskurista (45 mM Tris-emäs, 45 mM boorihappo, 1 mM EDTA, pH 8.0) sekä sisälsi 0,5 µl/ml etidiumbromidia. Näytepuskurina käytettiin 6×Loading Dye Solutionia (Fermentas) ja standardina Hyperladder I:stä (Bioline). Oikean pituinen PCR-tuote puhdistettiin geelistä QIAquick Gel Extraction –kitillä (Qiagen), sen ohjeiden mukaisesti.

4.1.1.1.1 His- insertti

His-insertti koostui puhdistuskahvana toimivasta histidiini-motiivista, β3Glc-T:n aminoterminaalista domeenista ja näiden väliin sijoitetusta trombiini-katkaisuentsyymien tunnistussekvenssistä, jota voitiin käyttää His-puhdistuskahvan irrottamiseen puhdistetusta proteiinista. Insertti sisälsi myös melittiini-signaalin, jonka tehtävä oli ohjata tuotettu proteiini eritysureitille. Melittiinin, histidiini-motiivin ja trombiini-katkaisukohdan sekvenssit optimoitiin hyönteissoluntuoton kannalta mahdollisimman suotuisaksi *S. frugiperda* –solujen Kazukan kodonin käyttötaulukon (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>) perusteella. Insertin päihin suunniteltiin tunnistussekvenssit BamHI- ja KpnI-katkaisuentsyymeille, joiden avulla insertti voitiin liittää FastBacTM1-vektorin MCS-alueelle. Liitteessä 1 on yhteenveto His-insertin osista sekä niiden sekvensseistä ja sijainnista insertissä.



Kuva 4.2 His-insertin rakentaminen kolmen peräkkäisen PCR:n avulla. Kuvaan on merkitty PCR-reaktioissa käytetyt alukkeet ja mitä sekvenssin osia ne aminoterminaaliseen domeeniin lisäävät.

His-insertin rakentamiseen käytettiin SES-PCR-menetelmää (stepwise elongation of sequence PCR), jossa insertin luominen perustui templaatin pidentämiseen alukkeiden avulla useissa PCR-reaktioissa. Ensimmäistä reaktiota lukuunottamatta templaattina käytettiin edellisen PCR:n tuotetta, jota pidennettiin alukkeiden avulla, kunnes kaikki liitettävät sekvenssit oli lisätty. (Majunder, 1992). Kaavakuva His-insertin rakentamisesta SES-PCR:n avulla on esitetty kuvassa 4.2.

His-insertissä aminoterminaalisen domeenin sekvenssiä pidennettiin 123 nukleotidilla 5'-pästä ja 12 nukleotidilla 3'-pästä. 5'-pään pidennys tehtiin kolmella PCR-reaktiolla ja käytettyjen 5'-pään alukkeiden pituus oli 60 nukleotidia, joista 20 nukleotidia sitoutui templaattiin ja 40 nukleotidia muodosti uutta sekvenssiä. 3'-pään alukkeena käytettiin kaikissa PCR-reaktioissa samaa aluketta, jonka avulla jo ensimmäisen PCR-reaktion aikana luotiin 3'-päähän tarvittavat lisäykset. Ensimmäisessä PCR:ssä templaattina toimi β 3Glc-T-geenin sisältävä plasmidi (p441). Jokaisesta kuvassa 4.2 kuvatusta PCR:stä tehtiin kaksi PCR-reaktiota, joissa käytettiin eri hybridisaatiolämpötiloja Forward- ja Reverse-alukkeiden erisuuruisten T_m -arvojen vuoksi. Taulukossa 4.3 on esitetty kaikissa kuudessa PCR-reaktiossa käytetyt templaattit, alukkeet, hybridisaatiolämpötilat ja PCR-tuotteen pituus. PCR-reaktioon käytetty reaktioseos ja lämpösykli olivat kappaleessa 4.1.1.1 esitetyn mukaiset.

Taulukko 4.3 His-insertin valmistukseen käytetyt PCR-reaktiot

PCR-reaktio	Templaatti	Forward-aluke	Reverse-aluke	Pituus	$T_H / ^\circ C$	$T_H / ^\circ C$
PCR I	p441	DIHisI_5'	DI3'Kpn	687	+40	+58
PCR II	PCR I:n tuote	DIHisII_5'	DI3'Kpn	729	+55	+70
PCR III	PCR II:n tuote	DIHisIII_5'	DI3'Kpn	771	+55	+70

Jokaisessa PCR-reaktiossa muodostuneen puhdistetun lopputuotteen pidentyminen varmistettiin ja kolmannen PCR-reaktion lopputuotteen pitoisuus arvioitiin agarosigeelielektroforeesin avulla. Pitoisuuden määrittäminen tehtiin vertaamalla lopputuotteen vyöhykkeen paksuutta standardivyöhykkeiden paksuuteen. Silmämääräisen vertailun perusteella His-insertin pitoisuudeksi arvioitiin noin 30 ng/ μ l.

4.1.1.1.2 Avd-insertti

Avd-insertti koostui aminoterminaalisen domeenin sekvenssistä ja puhdistuskahvan muodostavan avidiinin sekvenssistä, josta transkription lopetuskodoni oli poistettu. Lopetuskodoni sen sijaan lisättiin aminoterminaalisen domeenin loppuun, jotta transkriptio päättyi tähän. Erillistä erityisreitille ohjaavaa signaalsekvenssiä ei inserttiin tarvittu, sillä avidiini-geeni sisältää erityisreitille ohjaavan

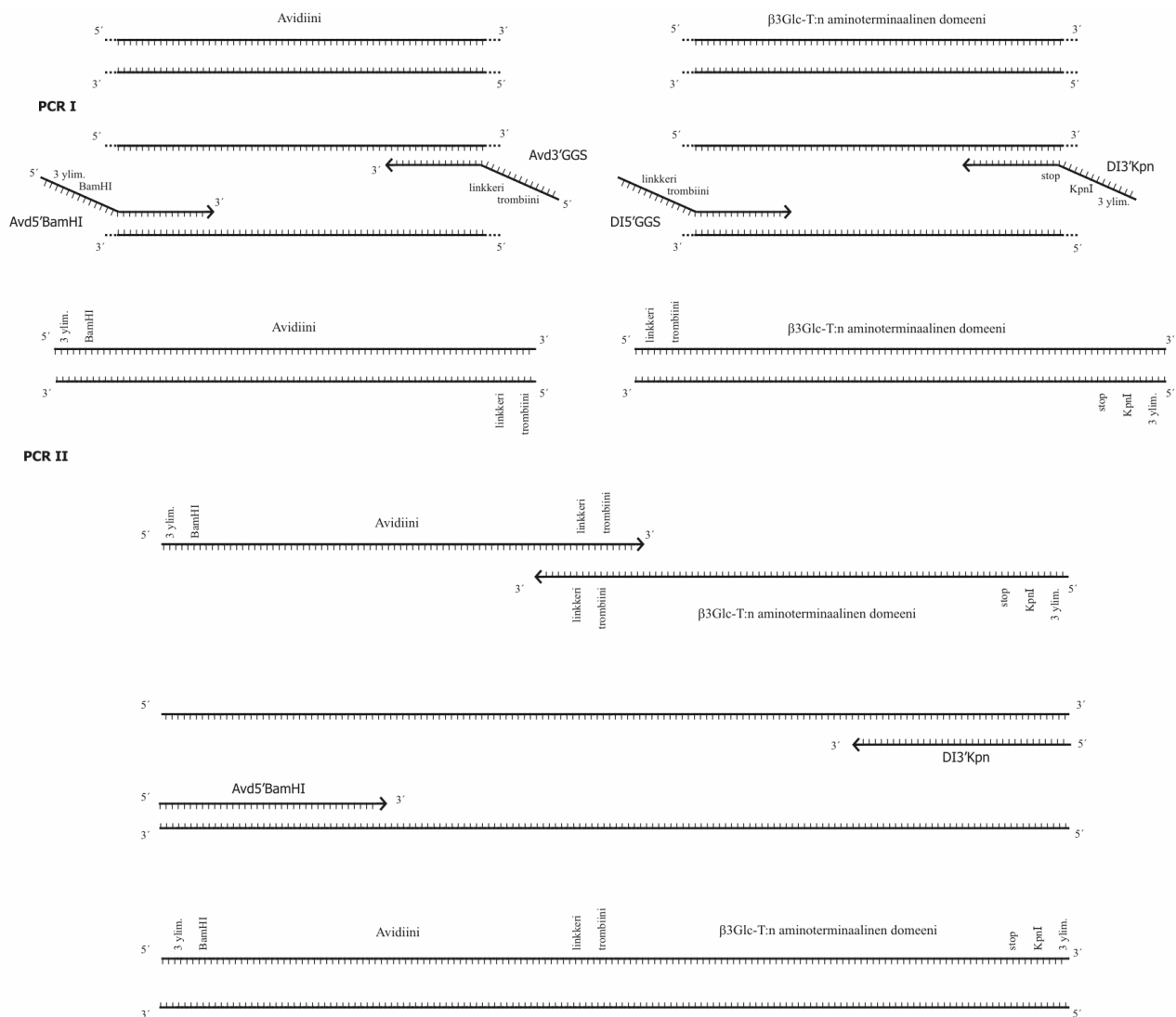
signaalin. Avidiinin ja aminoterminaalisen domeenin väliin luotiin kuudesta pienestä aminohaposta koostuva linkkerialue, joka antaa avidiinille ja aminoterminaaliselle domeenille tilaa laskostua ja liikkua toisistaan välittämättä. Linkkerialueen lisäksi avidiinin ja aminoterminaalisen domeenin väliin suunniteltiin leikkauskohta trombiini-entsyymille. Tämä toimi samoin kuin His-insertissäkin eli trombiini-käsittelyn avulla avidiini voitiin leikata irti tuotetusta proteiinista. Insertin päihin suunniteltiin BamHI- ja KpnI-katkaisuentsyymien tunnistuskohdat. Liitteessä 2 on esitetty yhteenveto kaikista Avd-insertin osista, niiden sekvensseistä ja sijainnista insertissä.

Avd-insertin rakennustekniikaksi valittiin neljän alukkeen menetelmä. Tässä menetelmässä ensin monistettiin β 3Glc-T:n aminoterminaalista domeenia sekä avidiinia omissa PCR-reaktioissaan. Monistuksissa käytettyjen alukkeiden avulla avidiinin 3'-päähen muodostettiin sekvenssi, joka kykeni pariutumaan aminoterminaalisen domeenin 5'-päähen alukkeiden avulla muodostetun sekvenssin kanssa. Tämä monistusvaihe (PCR I) on esitetty kuvan 4.3 yläosassa. Seuraavaan PCR-reaktioon (PCR II) lisättiin kummankin edellä kuvatun PCR-reaktion puhdistettuja lopputuotteita, jolloin ne kykenivät hybridisoitumaan toistensa kanssa ja toimimaan sekä templaatteina että alukkeina ja näin muodostamaan sekä β 3Glc-T:n aminoterminaalisen domeenin että avidiinin sisältävän Avd-insertin. Templaattialukkeiden lisäksi PCR-reaktioseokseen lisättiin Avd5'BamHI- ja DI3'Kpn-alukkeet, jotka monistivat sekä templaattialukkeita että niiden muodostamaa täysimittaista Avd-insertiä. Tämä rakennusvaihe on esitetty kuvan 4.3 alaosassa.

Aminoterminaalisen domeenin monistuksessa templaattina käytettiin β 3Glc-T-geenin sisältävää 441-plasmidia. Avidiinin monistuksessa käytettiin avidiini-geenin sisältävää plasmidia, joka oli saatu Henri Nordlundilta (IMT, Tampere). Taulukossa 4.4 on esitetty Avd-insertin valmistuksessa käytettyjen PCR-reaktioiden templaatit, alukkeet, hybridisaatiolämpötilat sekä monistettavan alueen pituus. PCR-reaktioihin käytetyt reaktioseokset ja lämpösyklit olivat kappaleessa 4.1.1.1 esitetyn mukaiset.

Taulukko 4.4 Avd-insertin valmistukseen käytetyt PCR-reaktiot

PCR-reaktio	Templaatti	Forward-alue	Reverse-alue	Pituus	T _H / °C	T _H / °C
PCR I _{Avd}	p441	Avd5'BamHI	Avd3'GGS	687	+40	+58
PCR I _{AD}	pAvd	DI5'GGS	DI3'Kpn	492	+60	+60
PCR II	PCR I:n tuotteet	Avd5'BamHI	DI3'Kpn	1149	+55	+70



Kuva 4.3 Avd-insertin luonti neljän alukkeen menetelmällä käyttäen templaattina avidiini-geenin sisältävää plasmidia ja β3Glc-T-geenin sisältävää plasmidia.

PCR-reaktiossa muodostuneiden lopputuotteiden pituudet tarkistettiin ja PCR II:n lopputuotteen pitoisuus arvioitiin agarosigeelielektroforeesin avulla samoin kuin His-insertin yhteydessä on esitetty. Silmämääräisen arvion mukaan Avd-insertin pitoisuus oli noin 2,4 ng/μl.

4.1.1.2 Inserttien liittäminen FastBacTM1-siirtovektoriin

FastBacTM1-plasmidi sekä Avd- ja His-insertit pilkottiin BamHI- ja KpnI –katkaisuentsyymeillä (Fermentas) valmistajan suositusten mukaisesti. Pilkkoutuneet plasmidit käsiteltiin valmistajan ohjeiden mukaisesti vasikan ohutsuolen alkaalisella fosfaasilla (CIAP) (Fermentas), jotta plasmidi ei enää yhdistyisi itsensä kanssa. Avd- ja His-insertiliuoksien sekä pFastBacTM1-plasmidiliuoksen tilavuudet pienennettiin ja edellisten vaiheiden puskurit poistettiin puskurien vaihdon avulla, joka tehtiin QIAquick PCR Purification –kitin (Qiagen) ohjeiden mukaisesti. Insertit liitettiin pFastBacTM1-plasmideihin Quick T4 DNA -ligaasin (New England Biolabs) avulla.

4.1.1.3 Siirtovektorin transformointi soluun ja virheettömien kloonien valinta

FastBacTM1-siirtovektorit transformoitiin One Shot[®]TOP10 –bakteereihin (Invitrogen) Invitrogenin ohjeiden mukaisesti. His-insertin ja Avd-insertin sisältämät transformoidut bakteerit maljattiin kumpikin omalle ampicilliinia sisältävälle LB agar –maljalle (10 g/l tryptoni, 5 g/l hiivauute, 10 g/l NaCl, 15 g/l bacto-agar, 100 mg/l ampicilliini) ja annettiin kasvaa yön yli +37 °C lämpötilassa. Seuraavana päivänä kummaltakin transformaatiomaljalta poimittiin yksittäisiä bakteeripesäkkeitä puhtasviljelmiksi uusille ampicilliinia sisältäville LB agar –maljoille.

Alustava etsintä oikean insertin sisältävistä bakteeripesäkkeistä tehtiin pesäke-PCR-menetelmän avulla. Edellä muodostetuista puhtasviljelmistä poimittiin 15 Avd-insertin ja 15 His-insertin oletettavasti sisältävää pesäkettä, joista vedettiin viiva ampicilliinia sisältävälle LB-maljalle. Positiivisena kontrollina käytettiin bakteeripesäkettä, joka sisälsi β3Glc-T-geenin p441-vektorissa. Viivasiirrostettujen bakteerien annettiin kasvaa yön yli +37 °C lämpötilassa. Seuraavana päivänä maljan jokaisesta viivasta poimittiin bakteereita ja ne sekoitettiin templaatiksi pesäke-PCR:n reaktioseokseen, joka koostui 1 μM Forward-alukkeesta, 1 μM Reverse-alukkeesta, 10×puskurista DyNazyme DNA polymeraasille (Finnzymes) ja 0,2 mM dNTP sekoituksesta (Fermentas).

Forward-alukkeena Avd-insertin tunnistamiseen käytettiin Avd5'BamHI-aluketta ja His-insertin tunnistamiseen DIHisI_5'-aluketta. Reverse-alukkeena käytettiin molemmille DI3'Kpn-aluketta. Bakteerit hajotettiin kuumentamalla reaktioseosta +99 °C:n lämpötilassa 10 minuuttia. Lopullinen reaktioseos sisälsi 0,4 U/μl:ssa DyNAzymeTM II DNA polymeraasia (Finnzymes), joka lisättiin reaktioliuokseen juuri ennen PCR-lämpösyklin aloittamista. PCR-ohjelma oli syklien lukumäärää ja hybridisaatiovaiheen lämpötilaa sekä kestoaikaa lukuunottamatta sama kuin taulukossa 4.1 on esitetty. Syklien lukumääränä pesäke-PCR-ohjelmassa oli 30, hybridisaatiovaiheen kestonä kaksi minuuttia ja hybridisaatiolämpötilana +55 °C:ta. PCR-reaktioissa muodostuneet tuotteet tarkistettiin agarosigeelielektroforeesin avulla.

Insertin sisältävien plasmidien monistusta varten insertin sisältävistä bakteeripesäkkeistä tehtiin 5 ml:n kasvatukset ampicilliinia sisältävässä LB-elatusliuoksessa (10 g/l tryptoni, 5 g/l hiivauute, 10 g/l NaCl, 100 mg/l ampicilliini). Bakteeriviljelmistä plasmidit eristettiin QIAprep Spin miniprep -kitin (Qiagen) ohjeiden mukaisesti.

Inserttien sekvenssien virheettömyys tarkastettiin 16-kapillaarisella ABI PRISM 3100 – sekvensaattorilla (Applied Biosystems) käyttäen Big Dye Terminator v3.1 Cycle sequencing –kittiä (Applied Biosystems). Syklinen sekvensointi tehtiin Applied Biosystems ohjeiden mukaisesti. Muodostunut DNA puhdistettiin ja saostettiin etanoli/natriumasetaattisaostuksella, jonka jälkeen natriumasetaattisuola poistettiin pelleteistä pesemällä ne 70-prosenttisella etanolilla. Puhdistettu DNA liuotettiin 12,5 µl:aan formamidia (Applied Biosystems) ja ennen sekvensointia kuumennettiin viisi minuuttia +96 °C lämpötilassa. Sekvensointiin käytettiin kahta pFastBacTM1-vektorin kanssa pariutuvaa aluketta, joiden perusteella voitiin todeta oliko insertti liittynyt pFastBacTM1:een oikein. Näiden lisäksi sekvensointiin käytettiin useita aminoterminaaliseen domeeniin sitoutuvia alukkeita, jotta koko insertti saatiin sekvensoitua.

Oikean insertin sekvensoinnin mukaan sisältävistä bakteeripesäkkeistä tehtiin kaksi 5 ml:n LB-elatusliuosviljelmää, joista toisen bakteereista muodostettiin glyserolivarasto liuottamalla bakteerit 50 % glyseroli – 50 % NaCl –liuokseen ja varastoimalla ne –70 °C lämpötilaan. Toisen viljelmän bakteereista eristettiin bakulovirusluontimenetelmän seuraavassa vaiheessa siirtovektoreina käytettävät FastBacTM1-plasmidit QIAprep Spin miniprep-kitin (Qiagen) ohjeiden mukaisesti.

4.1.2 Siirtovektorin transformointi DH10BacTM-bakteereihin

Bac-to-Bac[®] -bakulovirusluontimenetelmässä siirtovektorit transformoitiin kompetentteihin DH10BacTM *E. coli* -bakteereihin, jotka sisälsivät muokatun bakuloviruksen genomien sukkulavektorina eli bacmidina. DH10BacTM-bakteereissa siirtovektorin mini-Tn7-transposoni siirtyi avustajaplasmidien tuottamien entsyymien avulla bacmidiin.

Transformaatiovaihetta varten DH10BacTM-bakteereja siirrostettiin glyserolivarastosta tetrasykliiniä ja kanamysiiniä sisältävälle LB-maljalle ja kasvatettiin +37 °C lämpötilassa yön yli. Antibioottivalinnan perusteella maljalla kykenivät kasvamaan vain ne bakteerit, jotka sisälsivät vastustuskyvyn tetrasykliinille antavan geenin avustajaplasmideissa sekä kanamysiinille vastustuskyvyn antavan geenin bacmidissa. Seuraavana päivänä bakteereille tehtiin kalsiumkloridiin perustuva transformatio. Bakteerit maljattiin kanamysiiniä, tetrasykliiniä ja gentamysiiniä sisältäville maljoille, joihin lisättiin Bluo-gal-väriainetta ja IPTG:ta. Pystyäkseen kasvamaan näitä antibiootteja sisältävällä maljalla DH10Bac-bakteerien tuli sisältää sukkulavektorin ja avustajaplasmidien lisäksi myös siirtovektori, joka sisälsi gentamysiinille vastustuskyvyn antavan geenin. Bakteerien annettiin kasvaa maljalla +37 °C lämpötilassa yön yli. Seuraavana päivänä maljat siirrettiin +4 °C:n lämpötilaan, jotta β-galaktosidaasin Bluo-Gal:sta

tuottamaa sinistä väriä ehtisi muodostua. Jatkokasvatukseen valittiin ne pesäkkeet, jotka eivät olleet kehittäneet sinistä väriä, sillä niissä transpositio siirtovektorista sukkulavektoriin oli tapahtunut ja aiheuttanut LacZ α -geenin lukukehyksen häiriintymisen ja β -galaktosidaasin toimimattomuuden.

Valkoisia pesäkkeitä viivasiirrostettiin uudelle kanamysiini-, gentamysiini- ja tetrasykliini-antibiootilla sekä IPTG:tä ja Bluo-gal:a sisältävälle maljalle, jotta voitiin varmistaa poimitun pesäkkeen olevan valkoinen. Maljalle siirrostettiin myös kontrolliksi yksi sininen pesäke. Bakteerien annettiin kasvaa yön yli +37 °C:n lämpötilassa sekä kaksi päivää +4 °C:n lämpötilassa. Valkoisiksi osoittautuneista bakteereita tehtiin 5 ml:n liemiviljelmät antibiootteja sisältävässä LB-elatusliuoksessa, josta 1 ml käytettiin bacmidin eristämistä varten ja lopuista 4 ml:sta muodostettiin glyserolivarastot lisäämällä 4 ml steriloitua glyserolia putkiin ja varastoimalla putket -20 °C lämpötilaan.

4.1.3 Bacmidin eristäminen ja hyönteissolujen transfektio

Bacmidit eristettiin käyttäen suurten plasmidien eristämiseen kehitellyn menetelmän bacmideille soveltuvaa muunnelmaa Invitrogenin Bac-to-Bac[®] Baculovirus Expression System -oppaan (Invitrogen, 2004) ohjeiden mukaisesti. Transfektiot tehtiin kuusikuoppalevyillä solutiheydellä miljoona solua ml:ssa kasvavilla Sf9-hyönteissoluilla. Transfektioon käytettiin yhtä kuoppaa kohden 10 μ l eristettyjä bacmideita. Bacmidit sekoitettiin 9 μ l:an Invitrogenin Cellfectin[®]-reagenssia, jonka muodostamiin kationisiin lipidirakenteisiin bacmidit pystyivät sitoutumaan ja näin Cellfectin[®]-reagenssin mukana kulkeutumaan soluun. Cellfectin[®]-bacmid-liuosta inkuboitiin puoli tuntia laminaarissa, jonka jälkeen liuokseen lisättiin 0,8 ml SFX-Insect[™]-elatusliuosta (HyClone).

Sf9-soluja sisältävistä kuopista poistettiin elatusliuos ja tilalle laitettiin Cellfectin[®]-bacmid-liuos, jonka annettiin vaikuttaa soluihin 5 tunnin ajan +28 °C lämpötilassa. Tämän jälkeen kuopista poistettiin Cellfectin[®]-bacmid-liuos ja 2 ml SFX-Insect[™]-elatusliuosta lisättiin jokaiseen kuoppaan. Virusten annettiin monistua kolme vuorokautta, minkä jälkeen solut irrotettiin kuopista ja muodostuneet suspensiot siirrettiin Eppendorf-putkiin, joita sentrifugoitiin 5 minuutin ajan 100 \times g voimalla. Sentrifugoinnissa solut pellettoituivat, mutta solun ulkopuolelle silmikoituneet virukset jäivät supernatanttiin. Uuteen putkeen siirretty supernatantti muodosti valmistetun viruksen primaarivaraston.

4.2 Proteiinin tuottoon käytetyt solut ja niiden viljely

Työssä käytettiin kahta hyönteissolulinjaa: Sf9-solulinjaa, joka oli saatu Christian Oker-Blomilta (Jyväskylän yliopisto) sekä High FiveTM -solulinjaa (Invitrogen). High FiveTM -soluja viljeltiin lähinnä vierasproteiinin tuottoa varten, kun taas Sf9-soluja käytettiin tuoton lisäksi myös muihin tarkoituksiin, kuten viruksen monistukseen ja plakkimäärytyksiin.

4.2.1 Kasvatusolosuhteet

Molempien solulinjojen solut kykenivät kasvamaan sekä kiinnittyneinä alustaan (adherenttiviljely) että vapaana solususpensiossa. Proteiinituottoihin käytettiin molemmin tavoin kasvavia soluviljelmiä. Adherenttiviljelmiä kasvatettiin 50 ml:n (kiinnittymispinta-ala 25 cm²) ja 250 ml:n (kiinnittymispinta-ala 75 cm²) soluviljelypulloissa (DB Falcon). Joitakin kokeita tehtiin myös kuusikuoppalevyillä (DB Falcon), joissa yhden kuopan sitoutumispinta-ala oli 9,6 cm². Kasvatukset tehtiin +28 °C lämpötilassa Sanyo MCO-17AIC inkubaattorissa.

Solususpensioviljelyä tehtiin kahdella eri järjestelmällä. Toinen perustui sekoittavaan inkubaattoriin, jonka lämpötilaa ja sekoitusnopeutta voitiin säädellä. Inkubaattorissa soluja voitiin kasvatuttaa tavallisissa Erlenmeyer-pulloissa. Toisessa solususpensioviljelyjärjestelmässä soluja viljeltiin tavallisessa inkubaattorissa, mutta erityisesti kasvatusta varten suunnitelluissa spinneripulloissa. Liuoksen liikkuvuus, ja näin suspension säilyvyys, saatiin näissä pulloissa aikaan soluliuosta sekoittavalla magneettisella propellilla. Tämän pyörimisnopeutta säädeltiin spinneripullon alle asetetun magneettisekoittajan avulla. Pyörimisnopeutena spinnerikasvatuksissa käytettiin 800 kierrosta minuutissa. Tässä nopeudessa koko solususpensio pysyi liikkeessä, mutta ei aiheuttanut vielä solususpension vaahtoutumista. Sekoittavalla inkubaattorilla oli mahdollista tehdä useita kasvatuksia yhtä aikaa, spinneripullomenetelmässä sen sijaan inkubaattorin pienen koon vuoksi vain yhden tuoton kerrallaan tekeminen oli mahdollista.

Kasvatukseen käytettiin seerumia sisältämätöntä SFX-InsectTM-elatusliuosta (HyClone), paitsi avidiinikahvaan sitoutuneen proteiinin tuoton aikana, jolloin normaalisti biotiiniä sisältävä SFX-InsectTM-elatusliuos vaihdettiin biotiinittomaksi SFX-InsectTM-elatusliuokseksi (HyClone).

4.2.2 Soluviljelmän ylläpito

High FiveTM- ja Sf9-solulinjan soluja oli aiemmin pakastettu nestetyypeen 10-prosenttisessä dimetyylisulfoksidissa (DMSO). Solut sulatettiin +28 °C:een lämmitetyssä vesihauteessa ja

siirrettiin 50 ml:n soluviljelypulloon, joka sisälsi 5 ml +28 °C:een lämmitettyä elatusliuosta. Solujen annettiin kiinnittyä soluviljelypullon pohjalle 45 minuutin ajan +28 °C lämpötilassa. Solujen kiinnittymisen jälkeen DMSO:ta sisältävä elatusliuos vaihdettiin uuteen +28 °C:n lämpöiseen elatusliuokseen. Vuorokauden kuluttua elatusliuos vaihdettiin vielä kerran.

Soluviljelmää ylläpidettiin 50 ml soluviljelypulloissa. Soluviljelmän kasvettua konfluentiksi se jaettiin uusiin soluviljelypulloihin. Yleensä käytettiin jakosuhdetta 1:2, jolloin uuteen pulloon siirrettiin 2 ml soluja ja 4 ml elatusliuosta, mutta käyttötarpeiden mukaan jakosuhteita muuteltiin. Soluja käytettiin korkeintaan 30:n jaon ajan.

Solujen lukumäärä viljelmässä selvitetiin valomikroskoopin ja laskukammion eli hemosytometrin avulla. Solujen laskentaa varten tarvittava näyte voitiin ottaa suoraan elatusliuoksesta suspensioviljelmissä. Adherenttiviljelmissä näytteenottoa edelsi solujen irroitus alustastaan. Näytteet värjättiin Trypan Blue –väriaineliuoksella (Sigma-Aldrich), jolloin liuos ja kuolleet solut värjäytyivät siniseksi, mutta ehjät solut jäivät vaaleiksi. Trypan Blue -väriaineliuoksen ja solususpension sekoitussuhde valittiin arvioidun solutiheyden perusteella. Tavoitteena oli saada laskettavaan liuokseen sopiva solutiheys eli noin 20-50 solua yhtä laskentaruutua eli 100 nl kohti. Ruutuja laskettiin vähintään kymmenen ja tutkittavan näytteen solutiheys määriteltiin laskettujen ruutujen solumäärien keskiarvona.

4.3 Viruksen monistus ja tiitterin tarkistus

4.3.1 Viruksen monistus

Uusien luotujen viruskantojen primarivarasto sisälsi vain 2 ml virusta, joten ennen isompien proteiinituottojen tekemistä piti luotua virusta monistaa. Virusten monistuksessa isäntäsoluina käytettiin Sf9-soluja. Soluviljelämä infektoidiin vähäisellä määrällä viruksia, jotta virusinfektio levisi hitaasti, ja näin elatusliuokseen ehti silmikoitua soluista enemmän viruksia. Virusten monistuksessa MOI-arvona (Multiplicity of infection) käytettiin 0,1:tä, eli infektiotokella kymmentä hyönteissolua kohti oli liuoksessa yksi virus.

Virusten monistusta tehtiin sekä solususpensio- että adherenttiviljelmissä. Solut kasvatettiin logaritmisin kasvun vaiheeseen, jossa solutiheys määritettiin ja viljelämä infektoidiin. Infektointiin käytettävän virusliuoksen tilavuus valittiin infektoidavien solujen määrän, valitun MOI-arvon ja

käytetyn virusliuoksen tiitterin perusteella. Aminoterminaalista domeenia tuottavilla viruksilla infektoiduja soluja kasvatettiin inkubaattorissa kolme vuorokautta ja β 3Glc-T:a tuottavia kuusi vuorokautta johtuen eri tutkimusryhmien erilaisista käytännöistä.

Inkubaation jälkeen solususpensio tai adherenttiviljelmissä elatusliuos kerättiin putkiin. β 3Glc-T:a tuottaneilla viruksilla nämä putket toimivat suoraan virusvarastona, eli ne siirrettiin +4 °C:n lämpötilaan odottamaan plakkimääritystä. Aminoterminaalista domeenia tuottavien virusten monistustuotosta kerättyjä putkia sentrifugoitiin 10 minuuttia $800 \times g$ voimalla ja muodostunut supernatantti siirrettiin virusvarastoksi +4 °C:n lämpötilaan.

4.3.2 Plakkimääritys

Plakkimäärityksen (plaque assay) avulla määritettiin virusliuoksen tiitteri. Plakkimäärityksessä virussuspensiosta tehtiin laimennussarja, jonka eri viruspitoisuuksilla maljalla kasvavia hyönteissoluja infektoidiin. Solujen ja virusten liikkuvuutta maljalla rajoitettiin valamalla agarosigeeli niiden päälle. Yhdestä viruksesta alkanut virusinfektio näkyi maljalla muutaman viikon päästä plakkina eli vaaleana alueena, jossa oli hajonneita soluja. Viruksen tiitteri voitiin laskea maljojen plakkien lukumäärästä, kun tiedettiin millä virusliuoksen laimennoksella kyseiset maljat oli infektoidu.

Tutkittavasta virussuspensiosta tehdystä laimennossarjasta käytettiin yleensä 10^{-5} , 10^{-6} ja 10^{-7} laimennoksia, sillä viruksen tiitterin oletettiin olevan noin 10^6 virusta/ml. Plakkimääritykset tehtiin 40–prosenttisesti konfluenteina viljelminä kasvavilla Sf9-soluilla, joita viljeltiin pohjapinta-alaltaan 21 cm^2 kokoisilla maljoilla (Cellstar). Maljojen elatusliuos korvattiin 1 ml:lla laimennossarjan virusliuosta, jonka annettiin vaikuttaa soluihin tunnin ajan keinuttajalla. Tämän jälkeen virusliuos poistettiin ja maljalle valettiin 1,25-prosenttinen agarosiliuos, joka oli valmistettu lisäämällä 2,5-prosenttiseen SeaPlaque[®]-agarosiliukseen (Cambrex Bio Science Rockland, Inc.) 1:1 elatusliuosta. Maljojen annettiin jähmettyä laminaarissa noin puoli tuntia, jonka jälkeen ne siirrettiin + 28 °C lämpötilaan.

Noin kahden viikon päästä plakit yleensä erottuivat maljoilta, mutta laskenta suoritettiin usein vasta kuukaudenkin kuluttua, jotta kaikki plakit ehtivät kehittyä. Maljoilta laskettiin, kuinka monta infektioivaa virusyksikköä kyseisessä laimennoksessa oli ollut, eli montako plakkia ne olivat maljalle tuottaneet. Yleensä samoilla viruslaimennospitoisuuksilla infektoidiin useampia maljoja ja

lopullinen tiitteri laskettiin niiden keskiarvona. Negatiivisena kontrollina käytettiin maljaa, joka infektoitiin viruslaimennoksen sijaan vedellä. Positiivisena kontrollina toimi jonkin virusliuoksen laimennos, jonka tiitteri jo tiedettiin.

4.4 Proteiinintuotto ja tunnistus

4.4.1 Proteiinin tuotto

Proteiinin tuottoon käytettiin sekä adherenteissa että suspensioviljelmissä kasvavia Sf9- ja High FiveTM-soluja. Proteiinin tuotto käynnistettiin infektoimalla logaritmissen kasvun vaiheessa olevat solut. Erilaisia MOI-arvoja testattiin, mutta yleensä solut infektoitiin MOI-arvolla viisi, jolloin virusten määrä oli siis viisinkertainen infektoitavien solujen määrään nähden. Suurta virusmäärää käyttämällä pyrittiin infektoimaan kaikki solut samaan aikaan, jotta myös proteiinin tuotto käynnistyisi suunnilleen yhtäaikaisesti kaikissa viljelmän soluissa. Proteiinin tuotto soluissa käynnistyi bakuloviruksen *polh*-promootorin aktivoitua noin vuorokauden kuluttua infektiosta. Tämän jälkeen tuotettu proteiini voitiin kerätä sopivaksi katsottuna päivänä.

Suspensioviljelmien keräyksessä solut ja elatusliuos eroteltiin sentrifugoimalla $800 \times g$ voimalla 10 minuuttia. Supernatantit säilöttiin joko $-20 \text{ }^\circ\text{C}$:n lämpötilaan, mikäli niistä oli tarkoitus puhdistaa tuotettua proteiinia tai $+4 \text{ }^\circ\text{C}$:en lämpötilaan, mikäli niitä käytettiin virusvarastona. Sentrifugoinnissa muodostuneet pelletit varastoitiin $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ lämpötilaan tuotetun proteiinin puhdistusta varten. Ennen sentrifugointia solususpensioista otettiin 0,5 ml näytteet, jotka myös sentrifugoitiin $800 \times g$ voimalla 10 minuutin ajan. Näistä näytteistä voitiin analysoida, kuinka hyvin proteiinin tuotto oli onnistunut

Adherenttiviljelmistä kerättiin vain elatusliuokset, joita sentrifugoitiin $800 \times g$ voimalla 10 minuuttia. Supernatantit säilöttiin $+4 \text{ }^\circ\text{C}$:n tai $-20 \text{ }^\circ\text{C}$:n lämpötilaan käyttötarkoituksen mukaisesti. Ennen supernatanttiputken pakastusta siitä otettiin 0,5 ml näyte elatusliuokseen eritetyn proteiinin määrän arviointia varten.

4.4.2 Tuoton analysointi

Näytteiden sisältämät proteiinit eroteltiin ensin kokonsa perusteella SDS-PAGE:n (natriumdodekyylisulfaattipolyakryyliamidigeelielektroforeesi) avulla, jonka jälkeen tuotettu

proteiini tunnistettiin ja tuoton määrä arvioitiin vasta-ainetunnistukseen perustuvan immunoblottauksen avulla.

SDS-PAGE tehtiin Xcell SureLock™ Mini-Cell –ajolaitteessa (Invitrogen) käyttäen 10-prosenttista Novex® tris-glysiini-valmisgeelejä (Invitrogen). Puskureina käytettiin Tris-glysiini-ajopuskuria (25 mM Tris-emäs, 192 mM glysiini, 0,1% SDS, pH 8,3) ja Tris-glysiini-näytepuskuria (63 mM Tris HCL, 10 % glyseroli, 2 % SDS, 0,0025 % Bromofenolisininen, pH 6,8). Molekyylistandardeina käytettiin värjäämätöntä Precision Protein™ -standardia (Bio-Rad), värjättyä Kaleidoscope-standardia (Bio-Rad) ja värjättyä PageRuler™ –standardia (Fermentas). SDS-PAGE tehtiin Xcell SureLock™ Mini-Cell –ajolaitteen ohjeiden mukaisesti.

Immunoblottauksessa proteiinit siirrettiin Xcell II™ Blot Module–siirtolaitteen (Invitrogen) ohjeiden mukaisesti geeliltä Hybond™ –C Extra nitroselluloosakalvolle (GE healthcare Life Sciences). Siirtopuskurina käytettiin Tris-glysiini-siirtopuskuria (12 mM Tris-emäs, 96 mM glysiini, 20 % metanoli, pH 8,3), siirtoaikana 1,5 tuntia ja siirtojännitteenä 25 V.

Ennen vasta-aineisiin perustuvaa proteiinin tunnistusta kalvolla olevat vapaat sitoutumiskohdat täytettiin (blokattiin) 5-prosenttisellä maitoliuoksella, joka oli valmistettu PBST:hen (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, 0,005% Tween-20). Kalvon annettiin blokkautua maitoliuoksessa sekoittajalla +4 °C:n lämpötilassa vähintään tunnin, mutta usein yön yli. Blokkauksen jälkeen kalvoa pestiin kahdella kymmenen minuutin PBST- tai TBST-pesulla (20mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 0,005% Tween-20).

4.4.2.1 Histidiinipuhdistuskahvan tunnistus

Primaarisena vasta-aineena histidiinipuhdistuskahvan sisältäville proteiineille käytettiin kanissa ztuotettua polyklonaalista His-probe-vasta-ainetta (H-15) (Santa Cruz), joka laimennettiin 1:200 5-prosenttiseen PBST-maitoon. Primaarisen vasta-aineen annettiin sitoutua +4 °C lämpötilassa vähintään kahden tunnin ajan, jonka jälkeen primaarinen vasta-aine pestiin pois kahdella kymmenen minuutin PBST-pesulla. Sekundaarisena vasta-aineena käytettiin siassa tuotettua HRP:llä (horseradish peroxidase) leimattua AntiRabbit-vasta-ainetta (DAKO), jota laimennettiin 5-prosenttiseen PBST-maitoon 1:3000. Kalvoa inkuboitiin tässä vasta-aineliuoksessa +4 °C:n lämpötilassa sekoittajalla noin kaksi tuntia, jonka jälkeen sitoutumaton sekundaarinen vasta-aine huuhdeltiin kalvolta kahdella kymmenen minuutin PBST-pesulla.

Immunoblottauksen visualisointiin käytettiin Amersham ECL PlusTM -tunnistusreagensseja (Amersham Bioscience). Tämä visualisointimenetelmä perustui sekundaariseen vasta-aineeseen liitettyyn HRP-leimaan, joka tunnistusreagensseista tehdyn kehitysliuoksen sisältämien peroksidien kanssa kykeni muuttamaan kehitysliuoksessa olevia Lumigen PS-3 Acridan -molekyylejä niin, että ne lähettivät valoa, joka voitiin tallentaa filmille. Filmin annettiin valottua kehitysyksikössä oletetun proteiinin tuottotason mukaan minuutista 15 minuuttiin. Tämän jälkeen filmi kehitettiin SRX-101A-kehityslaitteessa (Konica Minolta).

4.4.2.2 Avidiinipuhdistuskahvan tunnistus

Avidiinipuhdistuskahvan tunnistamisessa primaarisena vasta-aineena käytettiin kanissa tuotettua polyklonaalista anti-avidiniä (DAKO). Anti-avidini laimennettiin 1:6000 5-prosenttiseen TBST-maitoon. Kalvoa inkuboitiin vasta-aineliuoksessa keinuttajalla +22 °C:n lämpötilassa noin tunti, jonka jälkeen kalvoa pestiin neljällä viiden minuutin TBST-pesulla. Sekundaarisena vasta-aineena käytettiin GAR-AP:ta (goat anti-rabbit alkaline phosphatase) (Bio-Rad), jota laimennettiin 1:2000 5-prosenttiseen TBST-maitoon. Myös tämän vasta-aineen annettiin sitoutua tunti huoneenlämmössä keinuttajalla, jonka jälkeen kalvoa pestiin neljällä viiden minuutin TBST-pesulla.

Avidiinipuhdistuskahvan tunnistukseen ja visualisointiin käytettiin menetelmää, jossa sekundaariseen vasta-aineeseen liitetty alkaalinen fosfataasi hydrolysoi sille värjäysliuoksen avulla substraatiksi tarjottuja BCIP-molekyylejä (5-bromo-4-kloro-3-indolyylifosfaatti), poistaen niistä fosfaattiryhmän. Tämän jälkeen värjäysliuoksen toinen molekyyli NBT (Nitro-Blue-Tetrazolium) kykenee liittämään kaksi BCIP:n fosfaatitonta muotoa yhteen, jolloin tuloksena kalvolle muodostuu violetinsininen sakka. Ennen tunnistusta kalvon annettiin tasapainottua viisi minuuttia APA-puskurissa (0,1 M NaHCO₃, 1 mM MgCl₂·6H₂O). Värireaktio saatiin käynnistymään kaatamalla kalvon päälle APA-puskuria, joka sisälsi 300 µg/ml NBT:tä (Sigma) ja 150 µg/ml BCIP:ä (Sigma). Värireaktio pysäytettiin tislattulla vedellä.

4.4.3 Tuotetun proteiinin puhdistus

Tuotetut proteiinit puhdistettiin affiniteettikromatografiamenetelmillä niiden puhdistuskahvojen avulla. Puhdistuksen jälkeen tuotetun proteiinin saantoa ja puhtautta arvioitiin immunoblottauksen sekä Coomassie- ja hopeavärjäysten avulla.

4.4.3.1 Histidiinikahvaisten proteiinien puhdistus

Histidiinikahvaisten proteiinien puhdistus tapahtui Invitrogenin ProBondTM -puhdistusjärjestelmällä. Puhdistusjärjestelmä oli optimoitu puhdistamaan solun sisälle tuotettua proteiinia, ja tämän vuoksi ProBondTM-puhdistusjärjestelmän ohjeiden mukaisesti resiiniin voitiin kerrallaan sitouttaa vain 8 ml proteiiniliuosta. Hyönteissolutuotossa proteiini oli kuitenkin tarkoitus erittää soluliuokseen, jolloin kerätyn proteiiniliuoksen tilavuus oli huomattavasti 8 ml:a suurempi. Tämän vuoksi kerätyn liuoksen tilavuutta pienennettiin ammoniumsulfaattisaostuksen avulla.

Ammoniumsulfaatin kylläisyysprosentiksi saostuksessa valittiin 75 %. Tämän kylläisyystason saavuttamiseksi tarvittava määrä kiinteää ammoniumsulfaattia lisättiin elatusliuokseen hitaasti koko ajan liuosta sekoittaen. Sakkautumisen annettiin tapahtua yön yli +4 °C:n lämpötilassa. Saostuneet proteiinit eroteltiin sentrifugoimalla 30 minuuttia 5000 × g:n voimalla. Muodostuneiden pellettien annettiin liueta tunnin ajan jäällä 1 ml:an ProBondTM-puhdistusjärjestelmän sitoutumispuskuria.

Proteiinia puhdistettiin myös solun sisältä, jolloin ProBondTM-puhdistusjärjestelmää edelsi hyönteissolujen hajotus, joka tehtiin ProBondTM-puhdistusjärjestelmän ohjeiden mukaisesti. Sekä solujen hajottamisen että ammoniumsulfaattisaostuksen lopputuloksena muodostuneet tuotettua proteiinia sisältävät liuokset puhdistettiin liikkumattoman metallin affiniteettikromatografiaan perustuvan ProBondTM-puhdistusjärjestelmän ohjeiden mukaisesti. Puhdistuksessa muodostuneet fraktiot säilöttiin -20 °C lämpötilaan.

4.4.3.2 Avidiinikahvaisten proteiinien puhdistus

Avidiinikahvaisten proteiinien puhdistus perustui avidiinin spesifiseen, mutta pH-riippuvaiseen sitoutumiseen 2-iminobiotiiniin. Avidiini sitoutuu 2-iminobiotiiniin vahvasti pH:n ollessa 9-11, mutta pH:n aleneminen neljään muutti 2-iminobiotiinin rakenteen niin, että avidiini irtosi 2-iminobiotiinista. Tässä työssä puhdistusresiininä käytettiin agarosiin sidottua 2-iminobiotiinia.

Tuotetut avidiinikahvan sisältävät proteiinit puhdistettiin ainoastaan solun sisästä. Puhdistus aloitettiin liuottamalla tuottoviljelmästä kolmantena päivänä kerätyistä soluista sentrifugoinnin avulla muodostettu pelletti 60 ml HilloI-puskuria (50 mM Tris-HCL, 150 mM NaCl, 1 % Triton-X100 ja 2 mM EDTA). Tämän puskurin annettiin hajottaa soluja jäällä noin puoli tuntia, jonka jälkeen soluja sonikoitiin Sonics WibraVellTM -laitteella kaksi kertaa 134 s:n ajan 40 %:n amplitudilla ”1 s on /1 s off” -ohjelmalla.

Soluripheet pelletoitettiin sentrifugoimalla 15 minuuttia $15000 \times g$:n voimalla $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ lämpötilassa. Muodostunut sakka liuotettiin 30 ml:aan pH11-puskuria (50 mM Na_2CO_3 , 1 M NaCl) ja liuoksesta otettiin analyysia varten näyte. Myös supernatantista otettiin näyte ennen kuin siihen lisättiin 60 ml pH11-puskuria. Liuoksen pH säädettiin 1 M NaOH:n avulla noin 11:sta. Liuokseen siirrettiin 2 ml pH11-liuoksessa tasapainotettua 2-iminobiotiiniresiiniä (Affiland 2-iminobiotin-Sepharose[®] 4 Fast Flow), ja avidiinikahvaisten proteiinien annettiin sitoutua siihen tunnin ajan $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ lämpötilassa keinuttajalla. Tämän jälkeen 2-iminobiotiini ja siihen sitoutuneet proteiinit pelletoitettiin sentrifugoimalla viisi minuuttia $1500 \times g$ voimalla. Muodostuneesta supernatantista otettiin näyte analyysia varten. Resiiniä pestiin pH11-puskurilla kolme kertaa kaatamalla putket täyteet puskuria, sentrifugoimalla 5 minuuttia $15000 \times g$:n voimalla ja tämän jälkeen kaatamalla supernatantit pois. Viimeisellä kerralla putkiin jätettiin jonkin verran puskuria, jotta resiini saatiin siirrettyä pylvääseen.

Pylvääseen siirron jälkeen pH11-puskurin annettiin valua pois pylväästä. Proteiinin eluointi aloitettiin lisäämällä pylvään yläosaan 1 ml pH4-puskuria (50 mM NH_4COOH_3 , pH 4) ja keräämällä pylvään alaosasta 1 ml:n fraktio. Tätä toistettiin kunnes 10 fraktiota oli kerätty. Jokaisesta fraktiosta otettiin 20 μl näytteet SDS-PAGE-analyysia varten. Fraktioiden proteiinipitoisuus mitattiin NanoDropin ND-1000-spektrofotometrillä.

4.4.3.3 Puhdistuksen analyysit

Puhdistuksista saadut fraktiot analysoitiin immunoblottauksen avulla. Puhdistuksen vaiheista otetuista näytteistä voitiin immunoblottauskuvan perusteella arvioida, paljonko tuotettua proteiinia oli menetetty puhdistuksen eri vaiheissa. Värjäyksiä käytettiin määrittelemään kuinka puhdas tuote oli, eli kuinka paljon puhdistetussa fraktiossa oli muita kuin tuotettua proteiinia. Värjäysmenetelminä käytettiin Coomassie-väriaineeseen perustuvaa menetelmää, jossa SDS-PAGE-geeli värjättiin metanolista, jäätikkahaposta ja vedestä tilavuussuhteissa 45:10:45 sekä 0,1-prosenttisesta Coomassie Brilliant Blue R-250 -väriaineesta koostuvalla liuoksella ja väri poistettiin värinpoistoliuoksella, joka sisälsi metanolia, jäätikkahappoa ja vettä tilavuussuhteissa 10:10:80. Coomassie-värjäyksen lisäksi käytettiin herkempää hopeavärjäystä, jossa SDS-PAGE-geeli värjättiin Silver Stain Plus -hopeavärjäyskitin (Bio-Radin) ohjeiden mukaisesti.

5 Tulokset

5.1 Täysimittaisen β 3Glc-T:n tuoton optimointi

β 3Glc-T-projektissa pyrittiin tuottamaan ja puhdistamaan β 3Glc-T:a. Tuotetusta β 3Glc-T:sta oli kuitenkin ensimmäiset 28 aminohappoa jätetty pois, sillä näiden oletettiin sekundaarirakennesteiden perusteella muodostavan proteiinin elatusliuokseen erittymistä mahdollisesti haittaavan transmembraanidomeenin. Työn aikana julkaistuissa artikkeleissa tämä ennuste kuitenkin osoitettiin vääräksi ja nykyisin N-terminaalisen pään oletetaan toimivan solulimakalvostoon ohjaavana signaalisekvenssinä, joka solulimakalvostolla leikkaantuu lopullisesta proteiinista pois. Tämän perusteella tuotettu β 3Glc-T siis sisälsi kaikki muokatun β 3Glc-T:n aminohapot.

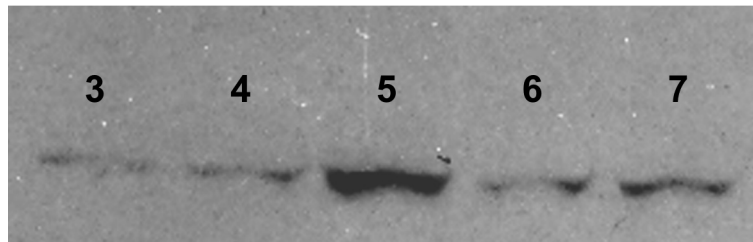
Tuottoisäntinä käytettiin Sf9- ja High FiveTM -hyönteissoluja, jotka infektoitiin polyhedriinipromootorin säätelyn alaisen β 3Glc-T-geenin sisältävillä bakulovirusilla. Tuotettava polypeptidi sisälsi β 3Glc-T:n aminohappojen lisäksi proteiinin erityisreitille ohjaavan melittiini-signaalisekvenssin ja Xpress- sekä 6 \times His-puhdistuskahvat. Sopivia arvoja β 3Glc-T:n tuottoon liittyville muuttujille kuten lämpötilalle ja infektointihetken solutiheydelle määritettiin ensin adherenttiljelmissä, sillä näissä kokeiden teko oli solususpensiota edullisempaa ja niitä oli helpompi toteuttaa. Lisäksi kokeita voitiin tehdä useampi yhtäaikaan, mikä mahdollisti tietyn muuttujan vaikutuksen tutkimisen muiden muuttujien arvojen säilyessä samoina. Adherenttiljelmissä optimoinnin jälkeen siirryttiin testaamaan optimoitujen arvojen sopivuutta suspensioviljelmiin. Muuttujien erilaisten arvojen vaikutusta β 3Glc-T:n tuottoon arvioitiin immunoblottauksen avulla, jossa β 3Glc-T:n His-puhdistuskahvan tunnistavana vasta-aineena käytettiin H-15:tä. Vasta-aineena testattiin myös antiXpress-vasta-ainetta (Invitrogen). Tätä vasta-ainetta ei kuitenkaan käytetty, sillä se toimi immunoblottauksessa epäspesifisemmin kuin H-15.

5.1.1 Optimointi adherenttiljelmissä

5.1.1.1 β 3Glc-T:n keräyspäivän valinta

Tuotettu proteiini pyrittiin keräämään elatusliuoksesta silloin, kun sen määrä oli suurimmillaan. Solut tuottivat elatusliuokseen lisää β 3Glc-T:a hyönteissoluiinfektion edetessä, mutta samalla solujen kunto huononi ja proteiinia pilkkovia proteaaseja vapautui enemmän elatusliuokseen, mikä puolestaan vähensi proteiinin määrää liuoksessa. Parhaan keräyspäivän valitsemiseksi tehtiin koetuoitoja, joissa immunoblottauksen avulla analysoitiin päivittäin elatusliuoksesta kerätyt

näytteet. Päivänä nolla otettua näytettä käytettiin negatiivisena kontrollina, ja positiivisena kontrollina toimi β 3Glc-T:a sisältävä näyte.



Kuva 5.1 Immunoblotti β 3Glc-T:n määrän muutoksista elatusliuoksessa kolmannaasta seitsemänteen päivään infektion jälkeen adherentissa High FiveTM -soluviljelmässä, joka oli infektoitu MOI-arvolla viisi solutiheyden ollessa 1 milj. solua/ml. Kuvaan on merkitty vyöhykkeiden yläpuolelle näytteenottopäivän numero. Infektointipäivä on määritelty päiväksi nolla.

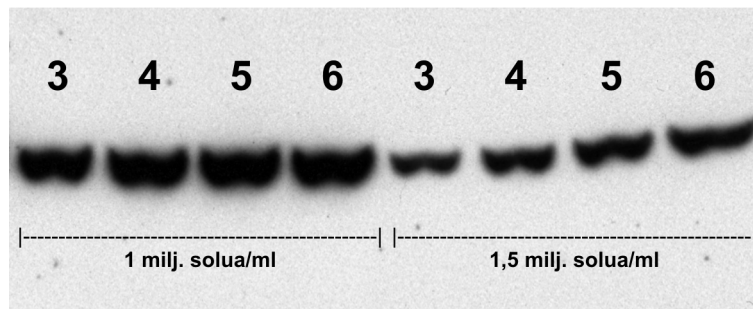
Vyöhykkeiden paksuutta kuvasta 5.1 vertailemalla voidaan suurimman määrän β 3Glc-T:a todeta elatusliuoksessa olevan viidentenä päivänä infektion jälkeen. Tätä tulosta vahvistaa kuva 5.2, jossa kahden eri tuottokokeen tulosten perusteella voidaan tuoton havaita olevan suurimmillaan neljännestä kuudenteen päivään. Näiden kokeiden tulosten perusteella viidettä päivää infektion jälkeen voitiin pitää suotuisimpana päivänä kerätä elatusliuos adherenttiviljelmästä.

5.1.1.2 Optimaalisin infektointihetken solutiheys

Suurimman tuoton aiheuttavaa infektointihetken solutiheyttä etsittiin infektoimalla samalla MOI-arvolla eri solutiheyksissä kasvavia High FiveTM -soluviljelmiä. Infektointihetken vertailutiheyksinä käytettiin 0,5 miljoonaa, 1 miljoonaa ja 1,5 miljoonaa solua millilitrassa elatusliuosta. Kuvassa 5.2 on päivittäin kerätyt näytteet solutiheydellä 1,0 ja 1,5 milj. solua/ml infektoiduista soluviljelmistä. Kuvasta voidaan havaita matalammassa solutiheydessä infektoidun soluviljelmän tuottaneen huomattavasti enemmän proteiinia kuin korkeammassa solutiheydessä infektoidun viljelmän. Samanlainen vertailu infektointihetken solutiheyksien 0,5 milj. solua/ml ja 1 milj. solua/ml välillä osoitti solutiheydellä 1 milj. solua/ml infektoidun viljelmän tuottavan enemmän β 3Glc-T:a.

Kaikilla kolmella vertailtavalla solutiheydellä infektoitujen soluviljelmien tuottaman β 3Glc-T:n määrä kolmantena päivänä infektion jälkeen on esitetty kuvassa 5.3. Kuvasta voidaan havaita solutiheydellä 1 milj. solua/ml infektoidun soluviljelmän tuottaneen eniten β 3Glc-T:a kaikkiin kuvassa esitettyihin fraktioihin. Tätä havaintoa vahvistaa myös kuvassa 5.4 esitetyn tuottokokeen tulokset. Vertailluista kolmesta infektointihetken solutiheydestä voitiin adherenttiviljelmissä

optimointikokeiden tulosten perusteella pitää ihanteellisimpana 1 milj. solua/ml. Ero solutiheydellä 0,5 milj. solua/ml infektoituun soluviljelmään ei ollut kuitenkaan suuri.

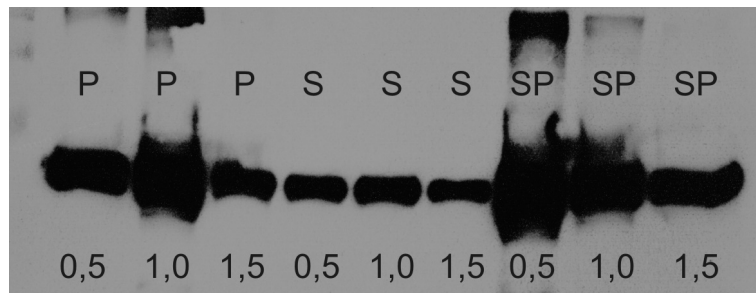


Kuva 5.2. Immunoblotti β 3Glc-T:n määrän muutoksista elatusliuoksessa adherenttilajelmänä kasvaneissa High FiveTM -hyönteissoluissa, jotka on infektoitu MOI-arvolla 10. Viljelmien solutiheys infektointihetkellä on ollut 1 milj. solua/ml tai 1,5 milj. solua/ml. Kuvaan on vyöhykkeiden yläpuolelle merkitty näytteenottopäivän numero (infektointipäivä = 0) ja vyöhykkeiden alapuolelle soluviljelmän infektointihetken solutiheys.

5.1.1.3 Tuotetun β 3Glc-T:n sijainti soluviljelmässä

Tuotettavaan β 3Glc-T:in oli liitetty melittiini-signaali, jonka avulla β 3Glc-T ohjattiin hyönteissolussa eritysureitille, jotta translaation jälkeiset muokkaukset tapahtuisivat mahdollisimman oikein. Tämän vuoksi suurimman osan tuotetusta proteiinista oletettiin kulkeutuvan solun ulkopuolelle. Suspensiotuotoissa, joiden tuloksia käsitellään myöhemmin, havaittiin suuren osan β 3Glc-T:sta kuitenkin jäävän solun sisälle. Tämän havainnon jälkeen adherenttilajelmien avulla tutkittiin β 3Glc-T:n sijaintia soluviljelmässä käyttäen eri solulinjoja, lämpötiloja ja infektointihetken solutiheyksiä.

β 3Glc-T:n sijainnin tutkimista varten infektoiduista soluviljelmistä muodostettiin keräyspäivänä kolme fraktiota: supernatantti, supernatantin pelletti ja pelletti. Supernatantiksi nimetty fraktio sisälsi kaiken β 3Glc-T:n, joka oli eritetty ulos solusta. Fraktio oli saatu keräämällä elatusliuoksen sentrifugoinnissa muodostunut supernatantti omaksi fraktiokseen. Supernatantin pelletti -näyte kuvasi β 3Glc-T:n määrää soluviljelmän pohjalta irronneissa soluissa. Supernatantin pelletti muodostettiin liuottamalla elatusliuoksen sentrifugoinnin yhteydessä muodostunut pelletti samaan tilavuuteen, kuin mitä elatusliuosta alunperin oli ollut. Näin supernatantin pelletin β 3Glc-T:n määrä saatiin analyysissa vertailukelpoiseksi supernatantin β 3Glc-T:n määrän kanssa. Pelletiksi puolestaan kutsuttiin fraktiota, joka muodostui kun elatusliuoksen keräyksen jälkeen pohjaan jääneet solut irrotettiin samaan tilavuuteen elatusliuosta kuin supernatanttifraktion tilavuus oli. Tästä fraktiosta voitiin todeta β 3Glc-T:n määrä solujen sisällä.



Kuva 5.3 Immunoblotti tuotetun β 3Glc-T:n sijainnista adhereenteissa High FiveTM-soluviljelmissä kolmantena päivänä infektion jälkeen, kun solutiheydellä 0,5 milj. solua/ml, 1,0 milj. solua/ml ja 1,5 milj. solua/ml kasvavia viljelmiä oli infektoitu MOI-arvolla 5. Jokaisesta näytteestä on erikseen analysoitu elatusliuoksessa oleva β 3Glc-T:n määrä (supernatantti), kiinnittyneiden solujen sisältämä β 3Glc-T:n määrä (pelletti) sekä maljan pohjalta irronneiden solujen sisältämä β 3Glc-T:n määrä (supernatantin pelletti). Kuvaan on vyöhykkeiden yläpuolelle merkitty, mistä soluviljelmän osasta kyseisen kaivon näyte on peräisin (S = supernatantti, P = pelletti ja SP = supernatantin pelletti). Vyöhykkeiden alapuolelle on merkitty infektointihetken solutiheys, eli kuinka monta miljoonaa solua millilitrassa soluviljelmä on sisältänyt infektointihetkellä.

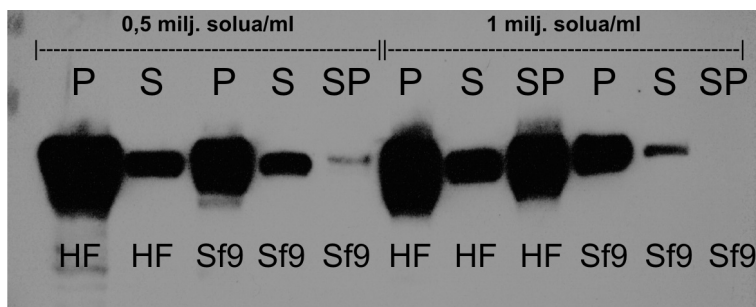
Kuvissa 5.3, 5.4 ja 5.5 on analysoitu tuotetun proteiinin sijaintia kuusikuoppalevyviljelmissä infektion jälkeen kolmantena päivänä kerätyistä näytteistä. Tulosten perusteella suurimman osan tuotetusta β 3Glc-T:n määrästä voidaan todeta sijaitsevan solun sisällä, toiseksi suurimman osuuden supernatantti-fraktiossa ja pienimmän supernatantin pelletti-fraktiossa. Tällainen jakautuminen on selvästi havaittavissa kuvissa 5.4 ja 5.5. Kuvassa 5.3 supernatantin pelletin fraktiossa on lähes yhtä paljon β 3Glc-T:a kuin solun sisäisessäkin fraktiossa. Tämä johtuu todennäköisesti soluviljelymaljan käsittelystä, sillä High FiveTM-solut irtosivat hyvin helposti alustastaan. Tällöin pienempikin tärähdyks viljelmässä lisäsi solujen määrää elatusliuoksessa ja täten pienensi pelletin ja samalla kasvatti supernatantin pelletin β 3Glc-T:n määrää analyysissä.

5.1.1.4 Tuottosolulinjan vertailu

Tuotetun proteiinin määrä eri solulinjoissa vaihtelee tuotettavan proteiinin mukaan, joten paremmin β 3Glc-T:lle soveltuvan tuottosolulinjan valitsemiseksi vertailtiin yleisimmin hyönteissolutuotossa käytettyjen Sf9- ja High FiveTM-solulinjojen β 3Glc-T:n tuottoa kuusikuoppalevyviljelmissä.

Yhden solulinjavertailukokeen tulos on esitetty kuvassa 5.4. Kuvasta voidaan havaita +28 °C lämpötilassa solutiheydellä 0,5 milj. solua/ml infektoitujen Sf9- ja High FiveTM-soluviljelmien elatusliuokseen erittyneen suunnilleen yhtäpaljon β 3Glc-T:a. Solujen sisäisessä fraktiossa β 3Glc-T:a on kuitenkin tuottanut enemmän High FiveTM-soluviljelmässä. Solutiheydellä 1 milj. solua/ml infektoiduissa soluviljelmissä havaitaan High FiveTM-solujen tuottaneen sekä erittäneen β 3Glc-T:a

elatusliuokseen huomattavasti Sf9-soluja enemmän. Tässä kokeessa solutiheydellä 1 milj. solua/ml infektoitujen Sf9-solujen β 3Glc-T:n tuotto oli kuitenkin normaalisti havaittua vähäisempää, joten solulinjojen vertailu kyseisellä solutiheydellä tämän kokeen perusteella ei anna oikeaa kuvaa solulinjojen β 3Glc-T:n tuottotehokkuuden eroista.



Kuva. 5.4 Immunoblotti adherenteissa Sf9- ja High FiveTM -soluviljelmissä tuotetusta β 3Glc-T:n määrästä kolmantena päivänä infektion jälkeen, kun solutiheydellä 0,5 milj. solua/ml ja 1,0 milj. solua/ml kasvavat viljelmät on infektoitu MOI-arvolla viisi. Jokaisesta näytteestä on erikseen analysoitu elatusliuoksessa oleva β 3Glc-T:n määrä (supernatantti), kiinnittyneiden solujen sisältämä β 3Glc-T:t määrä (pelletti) ja maljan pohjalta irronneiden solujen sisältämä β 3Glc-T:t määrä (supernatantin pelletti). Kuvaan on vyöhykkeiden yläpuolelle merkitty mistä soluviljelmän osasta kyseisen kaivon näyte on peräisin (S = supernatantti, P = pelletti ja SP = supernatantin pelletti). Näiden kirjainten yläpuolelle on merkitty infektointihetken solutiheys ja alapuolelle, mistä solulinjasta kyseinen näyte on peräisin.

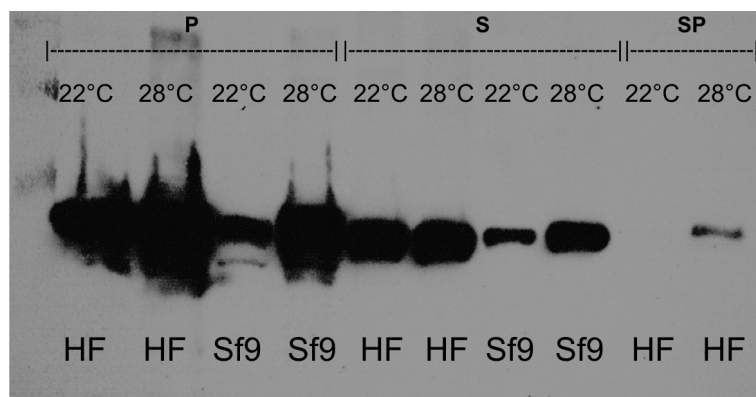
Edellä kuvattua koetta tyypillisemmät tulokset solutiheydessä 1 milj. solua/ml infektoitujen Sf9- ja High FiveTM -soluviljelmien β 3Glc-T:n tuotosta on esitetty kuvassa 5.5. Kun kuvasta tarkastellaan +28 °C:n lämpötilassa tehtyjen tuottokokeiden tuloksia, havaitaan High FiveTM-solujen tuottavan Sf9-soluja enemmän β 3Glc-T:a jokaiseen tutkittuun fraktioon, mutta ero ei kuitenkaan ole niin suuri kuin kuvassa 5.4. Kuvan 5.5 mukainen ero oli havaittavissa useammissa kokeissa, joten näiden perusteella voitiin High FiveTM -solujen todeta tuottavan ja erittävän solun ulkopuolelle enemmän β 3Glc-T:a kaikissa tutkituissa lämpötiloissa sekä infektointihetken solutiheyksissä kuin Sf9-solujen.

5.1.1.5 Kasvatuslämpötilan vertailu

Lämpötilan vaikutusta proteiinin tuottoon testattiin kuusikuoppalevyillä kasvavilla Sf9- ja High FiveTM -soluviljelmillä. Molempien solulinjojen kasvatuslämpötilaksi suositeltiin +28 °C:sta. Proteiinin tuottoa alemmassa lämpötilassa haluttiin kuitenkin kokeilla, sillä solujen kasvattaminen huoneenlämmössä olisi mahdollistanut useamman spinneripullokasvatuksen kerrallaan. Tämän lisäksi lämpötilan laskun ajateltiin hidastavan solujen toimintaa, jolloin β 3Glc-T:n muokkaukselle ja erittämiseksi ulos solusta jäisi enemmän aikaa. Tämän perusteella solusta uloserittyneen β 3Glc-

T:n määrän ajateltiin kasvavan solun sisälle jäävään osuuteen verrattuna. Kuvasta 5.5 kuitenkin havaitaan solun sisäisen ja ulkoisen β 3Glc-T:n suhteellisten osuuksien säilyvän lähes samanlaisina +28 °C:n lämpötilassa kuin +22 °C:n lämpötilassakin. Solunsisäisen β 3Glc-T:n määrää on immunobloteista hieman vaikea tarkasti määrittää, koska fraktion näytteistä ajautunut vyöhyke ei ole kovin tarkkarajainen.

β 3Glc-T:n tuottomäärien osalta koe osoitti, että High FiveTM -solut tuottivat β 3Glc-T:a molemmissa testatuissa lämpötiloissa yhtä hyvin. Sf9-soluilla sen sijaan +22 °C:n lämpötilassa kasvavat solut tuottivat huomattavasti vähemmän β 3Glc-T:a kuin +28 °C:n lämpötilassa kasvavat solut.



Kuva 5.5 Immunoblotti adhereenteissa +28 °C:n tai +22 °C:n lämpötiloissa kasvatetuissa Sf9- tai High FiveTM -soluviljelmissä tuotetusta β 3Glc-T:n määrästä kolmantena päivänä infektion jälkeen, kun solutiheydellä 1,0 milj. solua/ml oleva soluviljelmä on infektoitu MOI-arvolla 5. Jokaisesta näytteestä on erikseen analysoitu elatusliuoksessa oleva β 3Glc-T:n määrä (supernatantti), kiinnittyneiden solujen sisältämä β 3Glc-T:n määrä (pelletti) sekä maljan pohjalta irronneiden solujen sisältämä β 3Glc-T:n määrä (supernatantin pelletti). Kuvaan on vyöhykkeiden yläpuolelle merkitty kasvatuslämpötilat ja niiden yläpuolelle, mistä soluviljelmän fraktiosta on kyse (S = supernatantti, P = pelletti ja SP = supernatantin pelletti). Vyöhykkeiden alapuolelle on merkitty mistä solulinjasta kyseinen näyte on peräisin.

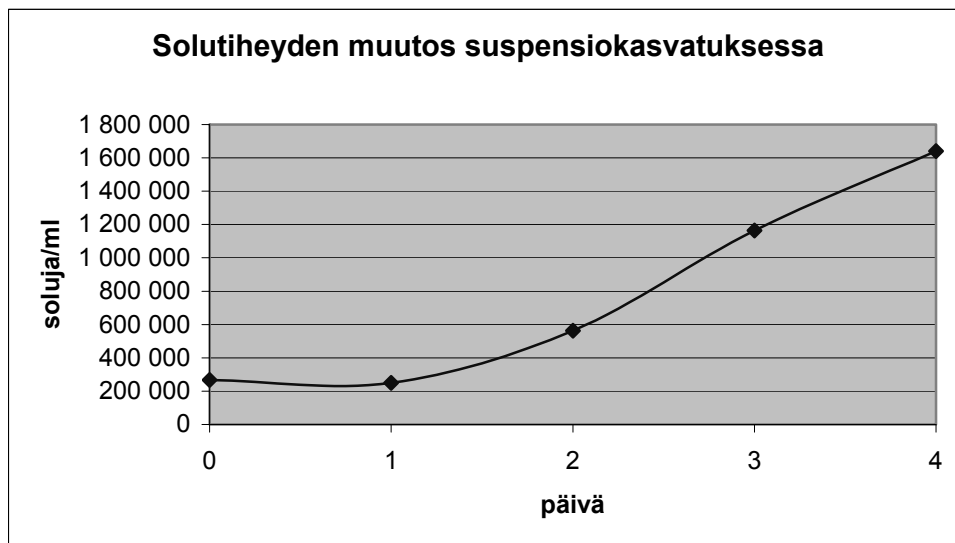
5.1.2 β 3Glc-T:n tuotto suspensioviljelmissä

5.1.2.1 High FiveTM -solujen kasvatus suspensiossa

Adherenttiviljelmäkokeiden perusteella lämpötilan lasku optimaalisesta +28 °C:sta +22 °C:een ei vaikuttanut High FiveTM-solujen tuottamaan β 3Glc-T:n määrään. Tämän tuloksen perusteella ensimmäisiä spinnerikasvatuskokeiluja tehtiin sekä +22 °C:n että +28 °C:n lämpötilassa. Näiden

kasvatusten aikana tarkkailtiin silmämääräisesti mahdollisia muutoksia solususpensiossa ja otettiin päivittäin näytteitä, joista laskettiin solutiheys sekä jakautuvien solujen määrä.

Ensimmäisiä suspensioviljelyjä varten High Five™ -soluja kasvatettiin kahdessa isossa (75 mm²) soluviljelypulloissa, joista ne siirrettiin 100 ml elatusliuosta sisältävään spinneripulloon. Aloitussolutiheydeksi tuli tällöin noin 300 000 solua/ml. Kuvassa 5.6 on tyypillinen kasvukäyrä solususpensioon alle 500 000 solua/ml alkusolutiheydellä siirretyillä High Five™-soluilla. Sekä +28 °C:n että +22°C:n lämpötiloissa kasvatetuissa solususpensioissa havaittiin vuorokauden kestävä viivevaihe (lag-vaihe) ennen kuin adherentista viljelmästä siirretyt solut alkoivat jakaantua suspensioviljelmässä. Viivevaiheen jälkeen solujen määrän havaittiin kaksinkertaistuvan vuorokaudessa noin kolmen vuorokauden ajan, kunnes jakaantuminen taas hidastui. Jakaantumisnopeus oli hieman alhaisempi +22 °C lämpötilassa kasvatetussa solususpensiossa kuin +28 °C:een lämpötilassa kasvatetussa.



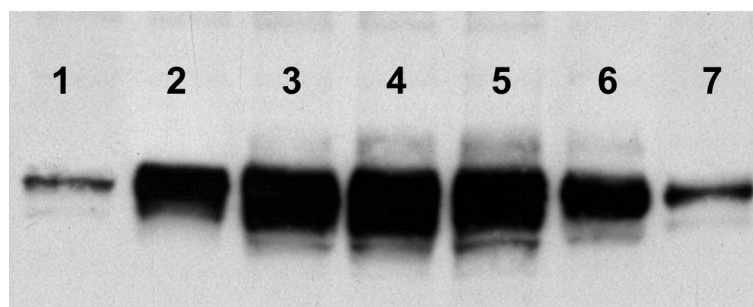
Kuva 5.6. Solutiheyden muutos solususpensiokasvatuksessa +22 °C:n lämpötilassa neljän vuorokauden aikana solujen siirrosta adherenttilijelmästä suspensioon.

Suspensiossa soluja voitiin ylläpitää siirtämällä vanhasta suspensiosta riittävästi soluja uuteen lämmitettyyn elatusliuokseen. Eri solusiirtomääriin perustuvien kokeiden perusteella havaittiin solujen lukumäärän kaksinkertaistuvan ilman viivevaihetta, mikäli uuden kasvatuksen lähtösolutiheys oli noin 700 000 solua/ml. Tätä voitiin pitää myös proteiinituottoon sopivana infektointihetken solutiheyden alarajana, sillä tällöin solut varmasti olivat logaritmisen kasvun vaiheessa.

Eri lämpötiloissa kasvatetut viljelmät poikkesivat toisistaan kasvunopeuden lisäksi myös jakautuvien solujen suhteellisessa määrässä, sillä +22 °C:n lämpötilassa kasvatetussa solususpensiossa jakautumisvaiheessa olevien solujen osuus kaikista soluista oli ensimmäisien päivien aikana lähes 50 % lasketuista soluista. Vastaavanlaista ilmiötä ei ollut havaittavissa +28 °C:n lämpötilassa kasvatetussa soluviljelmässä, vaan jakautuvien solujen määrä oli normaali, eli noin 20 % kaikista soluista. Jakautuvien solujen suuren osuuden epäiltiin aiheutuvan solun jakautumisen pysähtymisestä mitoosin loppuvaiheeseen, ei niinkään siitä, että jakautumista tapahtuisi enemmän. Näiden erojen lisäksi +22 °C:n lämpötilassa kasvatetussa viljelmässä havaittiin huomattavasti enemmän solukekoja, jotka sisälsivät kymmenistä satoihin kasaantuneita soluja. Näiden havaintojen perusteella proteiinin tuotto solususpensiossa päätettiin tehdä +28 °C lämpötilassa, sillä solut näyttivät jakautuvan ja kasvavan normaalimmin tässä lämpötilassa.

5.1.2.2 β 3Glc-T:n tuoton optimointi solususpensioviljelmässä

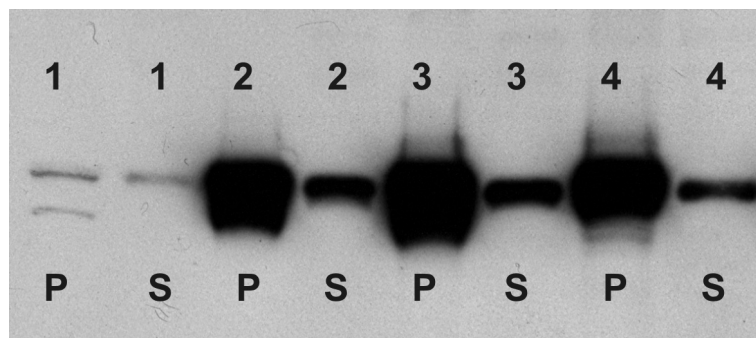
β 3Glc-T:n ihanteellisen keräyspäivän määrittämistä varten solutiheydellä 1,5 milj. solua /ml kasvava viljelelmä infektoitiin MOI-arvolla viisi. Nämä arvot oli valittu Invitrogenin soluviljelyohjeen suositusarvojen mukaisesti. Solususpensioista kerättiin näytteet infektoinnin jälkeen seitsemän päivän ajalta, ja ne analysoitiin immunoblottauksen avulla. Tuotettu proteiini kerättiin seitsemäntenä päivänä mahdollista puhdistusta varten. Kuvasta 5.7 voidaan havaita solususpension sisältäneen eniten proteiinia neljäntenä ja viidentenä päivänä, joten tämän kokeen perusteella myös solususpensioviljelmissä kuten adherenttililjelmissäkin viides päivä vaikutti sopivalta keräyspäivältä.



Kuva 5.7 Immunoblotti High FiveTM -solususpension β 3Glc-T:n määrästä seitsemäntenä päivänä infektion jälkeen. Kasvatuslämpötilana kokeessa käytettiin +28 °C, infektiotilanteen solutiheydenä 1,5 milj. solua/ml ja MOI-arvona viittä. Kuvaan on vyöhykkeiden yläpuolelle merkitty näytteenottopäivän numero (infektointipäivä = 0).

Seuraavasta suspensioviljelmästä proteiinit kerättiin edellisen tuloksen perusteella viidentenä päivänä. Solususpensio sentrifugoitiin ammoniumsulfaattisaostusta varten, ja saostettavaksi aiotusta

supernatantista otettiin näyte. Näytteen β 3Glc-T:n pitoisuus tarkistettiin immunoblottauksella, joka paljasti, ettei tutkittu näyte sisältänyt havaittavaa määrää β 3Glc-T:a, vaan tuotettu proteiini oli sentrifugoinnin yhteydessä todennäköisesti jäänyt pellettiin. Tätä oletusta testattiin adherenteissa kuusikuoppalevyviljelmissä, joiden tulokset on esitelty adherenttituottojen yhteydessä kappaleessa 5.1.1.3. Näiden kokeiden lisäksi β 3Glc-T:n sijaintia tutkittiin myös suspensioviljelmässä. Tässä kokeessa solutiheydellä 1,5 milj. solua/ml kasvava suspensioviljelmä infektoitiin MOI-arvolla viisi. Infektion jälkeen viljelmästä kerättiin päivittäin näytteet, jotka käsiteltiin sentrifugoimalla solut pohjaan. Sentrifugoinnissa muodostuneet supernatantit siirrettiin omaksi fraktioikseen, jotka siis sisälsivät soluliukseen eritetyn β 3Glc-T:n. Toisen fraktion muodostivat sentrifugoinnissa pelletoituneet solususpension solut, jotka liuotettiin supernatanttifraktion suuruiseen tilavuuteen elatusliuosta. Kuvassa 5.8 on tulokset tästä tuottokokeesta, jotka vahvistavat adherenttituotoista saatua havaintoa eli suurin osa tuotetun β 3Glc-T:n määrästä jää solujen sisälle. Kuvasta voidaan myös havaita supernatantinäytteiden β 3Glc-T:n määrän laskeneen jo neljäntenä päivänä, joten elatusliuksesta kerätylle β 3Glc-T:lle otollisempi keräyspäivä tämän kokeen perusteella on kolmas tai jopa toinen päivä.

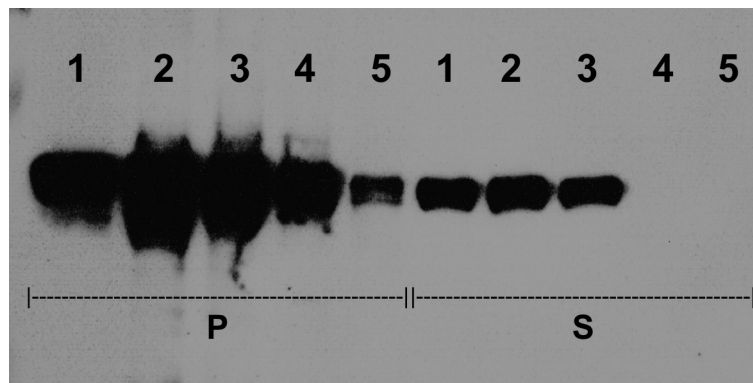


Kuva. 5.8 Immunoblotti High FiveTM -solususpension β 3Glc-T:n määrästä neljänä päivänä infektion jälkeen. Jokaisesta näytteestä on erikseen analysoitu elatusliuoksessa olevan β 3Glc-T:n määrä (supernatantti) ja solujen sisältämä β 3Glc-T:n määrä (pelletti). Kasvatustilana kokeessa on käytetty +28 °C, solutiheytenä infektiotilalla 1,5 milj. solua/ml sekä MOI-arvona viittä. Kuvaan on vyöhykkeiden yläpuolelle merkitty näytteenottopäivän numero (infektointipäivä = 0) ja vyöhykkeiden alapuolelle fraktio, josta näyte on peräisin (S = supernatantti ja P = pelletti).

Soluviljelmän infektointia eri solutiheyksillä kokeiltiin myös solususpensioviljelmissä. Ensimmäiset suspensioviljelmät infektoitiin solutiheydellä 1,5 milj. solua/ml. Adherenttiviljelmäkokeet olivat kuitenkin osoittaneet tuottavimman infektointihetken solutiheyden olevan noin 1 milj. solua/ml. Tämän perusteella suspensioviljelmä kokeiltiin infektoida solutiheydellä 700 000 solua/ml. Suspensiosta otettiin joka päivä näyte, josta sentrifugoinnilla erotettiin solut ja elatusliuos omiksi fraktioikseen. Immunoblottauksen tulokset näistä fraktioista on

esitetty kuvassa 5.9. Kuvasta voidaan havaita β 3Glc-T:n määrän tässä kokeessa olleen suurimmillaan jo toisen päivän kohdalla ja neljänteen päivään mennessä vähenevän huomattavasti.

Kuvan 5.9 fraktioita voidaan verrata kuvassa 5.8 esitettyihin korkeammalla solutiheydellä infektoidun soluviljelmän fraktioihin. Tämän vertailun tuloksena voitaisiin alemmalla solutiheydellä infektoituneen todeta tuottaneen β 3Glc-T:a enemmän infektion ensimmäisinä päivinä. Vertailu kahden immunoblotin välillä ei kuitenkaan ole kovin luotettavaa, vaikka immunoblotit on tehty samalla tekniikalla ja näytetilavuuksilla. Tuottavimman infektointihetken solutiheyden luotettavampi määrittäminen vaatinut useampia tuottoja eri solutiheyksillä. Näiden kokeiden tulosten perusteella noin 1 milj. solua/ml oleva solutiheys infektointihetkellä olisi tuoton kannalta ihanteellinen myös suspensioviljelmissä.



Kuva. 5.9 Immunoblotti High FiveTM -solususpension β 3Glc-T:n määrästä viitenä päivänä infektion jälkeen. Jokaisesta näytteestä on erikseen analysoitu elatusliuoksessa oleva β 3Glc-T:n määrä (supernatantti) ja solujen sisältämä β 3Glc-T:n määrä (pelletti). Kasvatustilana kokeessa on käytetty +28 °C, solutiheytenä infektiotahalla 0,7 milj. solua/ml sekä MOI-arvona viittä. Kuvaan on vyöhykkeiden yläpuolelle merkitty näytteenottopäivän numero (infektiopäivä = 0) ja vyöhykkeiden alapuolelle fraktio, josta näyte on peräisin (S = supernatantti ja P = pelletti).

Suspensioviljelyn optimoinnin teki ongelmalliseksi tulosten vaihtelevuus, sillä vaikka tuotot pyrittiin tekemään samalla tavoin, tuottomäärät saattoivat olla vaihtelevan suuruisia. Eräänä syynä tähän saattoi olla käytettyjen solujen eri ylläpitoajat, eli montako jakoa niille oli tehty. Myös solujen eri pakastuserien välillä mahdollisesti oli vaihtelua. Todennäköisin syy eroille saattoi aiheutua käytetyistä virusvarastoista, sillä tuottoihin käytettiin useasta eri virusmonistuksesta peräisin olevia virusliuoksia. Näiden virusliuosten tiitterit vaihtelivat, jolloin virusliuosta jouduttiin kasvatukseen lisäämään eri tilavuuksia.

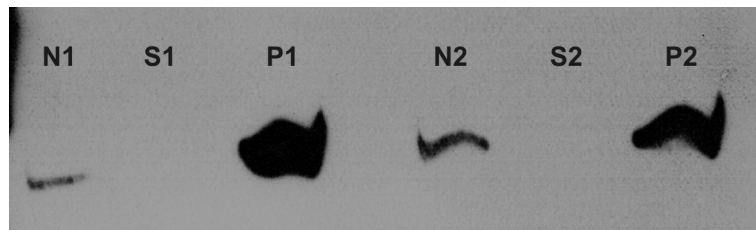
5.2 β 3Glc-T:n puhdistus

Suurimman osan tuotetusta β 3Glc-T:sta tiedettiin optimointikokeiden tulosten perusteella sijaitsevan keräyshetkellä solujen sisällä ja vain noin neljäsosan tästä määrästä erittyvän elatusliuokseen. Tästä huolimatta β 3Glc-T päätettiin puhdistaa elatusliuoksesta, sillä näin haluttiin varmistaa, että tuotettu proteiini oli kulkenut proteiinin muokkauskoneiston läpi ja tämän ansiosta saavuttanut mahdollisimman oikean, aktiivisen muotonsa. Solun sisältä eristetystä β 3Glc-T:sta samaa ei voitu varmuudella sanoa, sillä todennäköisesti kyseinen fraktio sisälsi useassa eri muokausvaiheessa olevia, sekä kokonaan muokkaamattomia β 3Glc-T-molekyylejä. Kaikki erilaiset β 3Glc-T:n muodot kuitenkin puhdistuivat nikkelpylyväeseen perustuvassa puhdistuksessa ja niiden läsnäolo olisi saattanut vaikeuttaa rakenteenmäärittystä.

Solun sisällä olevien sokeroimattomien β 3Glc-T-muotojen olemassa oloa vahvistivat immunoblottauskuvat, joissa pelleteistä otetuista näytteistä havaittiin oikean kokoisen β 3Glc-T -vyöhykkeen alapuolella toinen vyöhyke. Tällainen vyöhyke erottuu selkeästi esimerkiksi kuvan 5.8 ensimmäisen päivän pelletistä otetussa näytteessä. Tätä kevyempää proteiinia ei ole havaittavissa yhdessäkään supernatantista analysoidussa näytteessä, eikä sitä myöskään ole infektiohetkellä otetuissa pelletinäytteissä. Näin voidaan olettaa, ettei kyseinen vyöhyke ole peräisin solun omista proteiineista, vaan todennäköisesti sisältää β 3Glc-T:n sokeroimatonta muotoa.

Elatusliuoksesta puhdistettaessa liuoksen tilavuus tuli pienentää ennen puhdistuspylyväeseen siirtoa. Elatusliuoksen konsentroidi tehtiin ammoniumsulfaattisaostuksella. Tämä vaihe osoittautui puhdistuksen ongelmallisimmaksi, sillä β 3Glc-T:n saanto väheni saostuksen aikana usein huomattavasti. Erityisesti solususpensioviljelmistä kerättyjen elatusliuosten β 3Glc-T:n hävikki oli saostuksen aikana erittäin suuri. Hävikin aiheuttajaksi epäiltiin proteaaseja, vaikka alunperin proteaasien ajateltiin menettävän toiminnallisen muotonsa ammoniumsulfaattisaostuksessa käytetyn korkean suolapitoisuuden vuoksi. β 3Glc-T:n hävikkiä pyrittiin vähentämään lyhentämällä inkubaatioaikaa sekä tekemällä saostus jäähauteella +4 °C:en lämpötilassa. Näiden lisäksi ammoniumsulfaatin sekoitusnopeutta liuokseen vaihdeltiin. Muutosten ei havaittu aiheuttavan suuria eroja saostuksen lopputulokseen ja hävikki jäi suspensiotuotoilla niin suureksi ettei ammoniumsulfaattisaostuksen jälkeen kannattanut jatkaa β 3Glc-T:n puhdistusta.

Adherenttiviljelmästä kerättyjen tuottojen puhdistuksessa ammoniumsulfaattisaostuksen todettiin toimivan suunnitellusti. Kahden adherenttiviljelmästä kerätyn elatusliuoksen ammoniumsulfaattisaostuksen tulokset ovat kuvassa 5.10. Kuvasta voidaan havaita suolasaostuksen toimineen, sillä supernatantinäytteissä ei ole havaittavissa β 3Glc-T:a, mutta pellettinäytteissä β 3Glc-T:a sen sijaan on alkuperäistä liuosta enemmän. Hävinneen β 3Glc-T:n määrää on kuvasta hieman vaikea arvioida. Jos häviötä ei olisi tapahtunut, tulisi P1- ja P2- näytteiden vyöhykkeiden olla noin 20 kertaa suurempia kuin näytevyöhykkeiden.

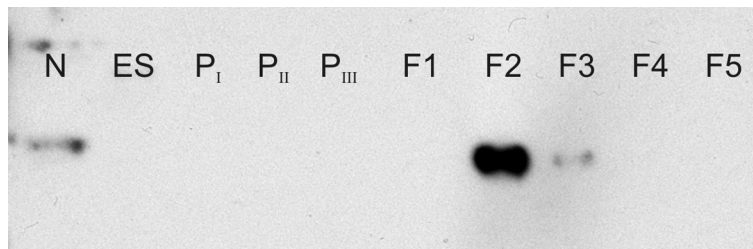


Kuva 5.10 Immunoblotti kahden adherenttiviljelmästä kerätyn tuoton ammoniumsulfaattisaostuksista. N1 ja N2 ovat kahdesta 20 ml:n adheesiotuoton elatusliuoksesta otetut näytteet ennen ammoniumsulfaattisaostusta. S1 ja S2 ovat ammoniumsulfaattisaostuksen jälkeisen sentrifugoinnin supernatanteista otetut näytteet. P1 ja P2 ovat näytteet ammoniumsulfaattisaostuksen jälkeisestä sentrifugoinnista muodostuneista pelleteistä, jotka on liuotettu 1 ml:an ProBondTM-pylvään sitouttamispuiskuria. Kaikki näytteet olivat tilavuudeltaan 100 μ l, ja näytetilavuus SDS-page geelillä oli 15 μ l. Vyöhykkeet eivät ajautuneet geelillä täysin samalle korkeudelle, koska geeli vääntyi ajon aikana näytteiden suuren suolapitoisuuden vuoksi.

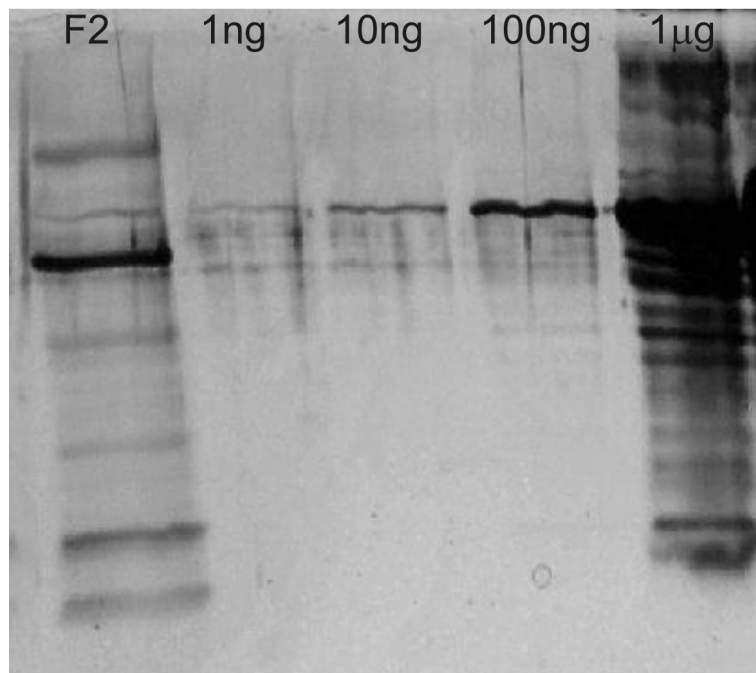
Ammoniumsulfaattisaostuksen jälkeen adherenttiviljelmistä peräisin olevan β 3Glc-T:a sisältävän liuoksen puhdistusta jatkettiin Invitrogenin ProBondTM-puhdistusjärjestelmällä. Nikkeliresiiniin sitoutumattomasta liuksesta sekä sitouttamisen jälkeen resiiniin tehdyistä pesuista otettiin näytteet. Kuvassa 5.11 on yhden puhdistuksen analysointia varten tehty immunoblotti. Kuvasta voidaan nähdä, että β 3Glc-T:a ei ole havaittavissa resiiniin sitoutumattomassa fraktiossa, eli pylvään voidaan olettaa sitoneen kaiken liuksessa olleen β 3Glc-T:n. Myöskään pesufraktioissa ei ole β 3Glc-T:a, mikä osoittaa tuotetun proteiinin pysyneen pylväessä kaikkien pesujen ajan. Puhdistuksen lopputuloksena muodostuneita fraktioita tarkastelemalla voidaan todeta suurimman osan β 3Glc-T:sta eluoituneen yhteen yhden millilitran fraktioon.

Puhdistuksen tehokkuutta arvioitiin Coomassie-värijäykseen avulla. Coomassie-väriaineella värjätyn geelin perusteella ProBondTM-järjestelmä näytti toimineen tehokkaasti, sillä liuksesta ennen puhdistusta otetussa näytteessä oli huomattavan paljon erikokoisia proteiineja samoin kuin resiiniin sitoutumattomassa fraktiossa ja ensimmäisestä pesuliuksesta otetuissa näytteissä. Puhdistetusta

fraktiosta 2 otetussa näytteessä oli sen sijaan havaittavissa vain yksi proteiini, joka molekyylipainon mukaan todennäköisesti sisälsi β 3Glc-T:a.



Kuva 5.11 Immunoblotti puhdistuksen vaiheista ProBondTM-puhdistusjärjestelmän avulla. Kuvaan on N:llä merkitty puhdistettava ammoniumsulfaattisaostuksesta tullut näyte, jonka tilavuus oli 3,1 ml. ES:llä on kuvaan merkitty näyte resiniin sitoutumattomasta fraktiosta. Fraktio siis kuvaa β 3Glc-T:n määrää, joka ei ole sitoutunut pylvääseen sitouttamisen aikana. PI, PII ja PIII ovat näytteet resiniin pesuliuksista pesujen jälkeen. FI - F5 ovat näytteet pylväästä eluoituneista 1 ml:n fraktioista.



Kuva 5.12 Hopeavärjäyskuva ProBondTM-puhdistusjärjestelmän tuloksena muodostuneesta puhdistetusta fraktiosta 2 sekä sen pitoisuuden määrittämistä varten laaditusta BSA-standardisuorasta. Kuvaan on F2:lla merkitty kaivo, johon 10 μ l puhdistettua näytettä on pipetoitu. BSA-standardisuoran kaivojen yläpuolelle on merkitty grammamäärät, paljonko kyseisessä kaivossa on BSA:ta.

Tarkempi arvio puhdistetun fraktion puhtaudesta tehtiin hopeavärjäyksen avulla. Samalla pyrittiin arvioimaan β 3Glc-T:n määrää puhdistetussa fraktiossa. Tätä varten BSA:sta (bovine serum albumin) tehtiin laimennossarja, jonka avulla hopeavärjättävälle geelille muodostettiin standardisuora. Puhdistetun β 3Glc-T:a sisältävän fraktion pitoisuus määritettiin vertaamalla

puhdistetun fraktion näytteestä muodostuneen vyöhykkeen paksuutta BSA-vyöhykkeiden paksuuteen. Kuvassa 5.12 on hopeavärjäyksen tulokset.

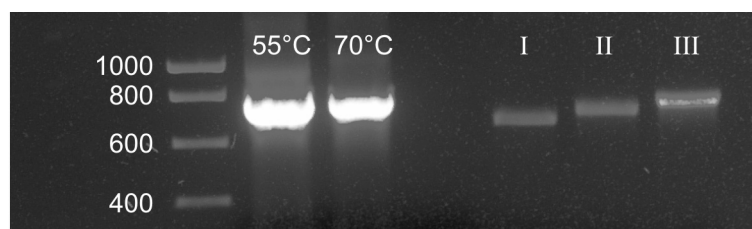
Standardisuoraan käytetty BSA ei ollut puhdasta, mikä hankaloittaa pitoisuuden arviointia. Kuvan perusteella voidaan puhdistetun β 3Glc-T:n määrän kaivossa F2 arvioida olevan vähintään 100 ng. Tämän arvion perusteella puhdistetussa 1 ml näytteessä oli noin 10 μ g β 3Glc-T:a. Tämä määrä oli saatu puhdistamalla β 3Glc-T kahdesta adherenttiviljelmästä, joiden elatusliuoksen tilavuus oli yhteensä 40 ml. Adherentissa soluviljelmässä oli siis keräyspäivänä ollut noin 250 ng/ml elatusliuokseen erittynyttä β 3Glc-T:a. Puhdistetun fraktion proteiineista kuvan 5.12 perusteella arvioitiin vähintään 70 %:n olevan β 3Glc-T:a.

5.3 β 3Glc-T:n aminotermiinalista domeenia tuottavien bakulovirusvektorien valmistus

Toisessa osaprojektissa valmistettiin kaksi uutta bakulovirusvektoria, joiden avulla oli mahdollista tuottaa β 3Glc-T:n aminotermiinalista domeenia. Toiseen tuotettavaan aminotermiinaliseen domeeniin lisättiin 8 \times His-puhdistuskahva ja toiseen avidiini-puhdistuskahva.

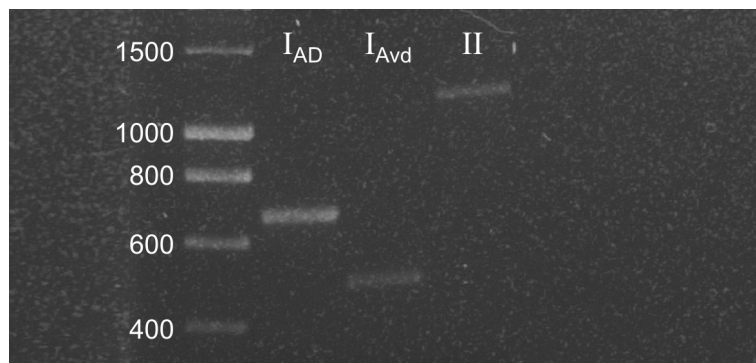
5.3.1 Inserttien rakennus

Insertit muodostettiin PCR-tekniikoiden avulla. His-puhdistuskahvan sisältävä insertti luotiin SES-PCR-tekniikan avulla. Tässä tekniikassa inserttiä pidennettiin useammassa PCR-reaktiossa alukkeiden avulla kunnes insertti sisälsi tavoitellun sekvenssin, kuten kappaleessa 4.1.1.1.1 on esitetty. Kuvassa 5.13 on näytteet kaikkien insertin muodostukseen käytettyjen PCR-reaktioiden puhdistetuista lopputuotteista. Kuvasta voidaan havaita oikean kokoisen insertin asteittainen pidentyminen joka PCR-reaktiossa.



Kuva 5.13 His-insertin luonti SES-PCR:n avulla. Geelillä on 5 μ l jokaisen inserttiä pidentäneen PCR-reaktion puhdistettua lopputuotetta. Kuvaan on näiden vyöhykkeiden yläpuolelle merkitty kunkin PCR-reaktion järjestysluku roomalaisin numeroin. Kuvassa on myös PCR III:n kahdessa eri hybridisaatiolämpötilassa tehdyn PCR-reaktion lopputuotteet ennen puhdistusta. Vyöhykkeiden yläpuolelle on merkitty kyseisessä PCR-reaktiossa käytetty hybridisaatiolämpötila.

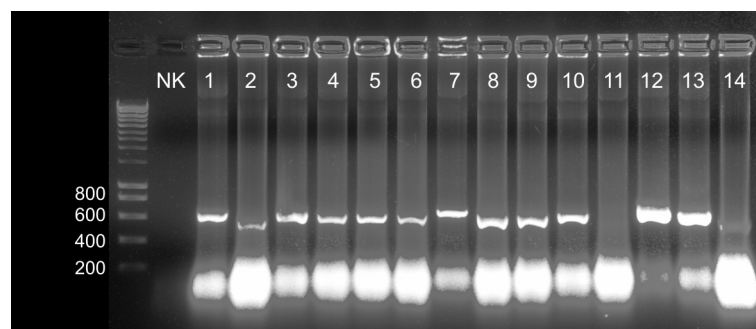
Avidiini-puhdistuskahvan sisältävä insertti luotiin neljän alukkeen menetelmällä, jonka kuvaus on kappaleessa 4.1.1.1.2. Kuvassa 5.14 on esitetty tämän insertin luomista varten tehtyjen PCR-reaktioiden puhdistetut PCR-tuotteet. Kuvasta voidaan havaita PCR II -reaktion lopputuotteen olevan suunnitelman mukaisesti kummassakin PCR I:ssä muodostuneiden lopputuotteiden pituuksien summan pituinen.



Kuva 5.14 Avd-insertin luonti neljän alukkeen menetelmällä. Kuvatulla geelillä on 5 µl kunkin Avd-insertin luontiin käytetyn PCR-reaktion puhdistettuja lopputuotteita. Kuvaan on I_{AD}:llä merkitty aminoterminaalista domeenia monistaneen PCR-reaktion puhdistettua lopputuotetta sisältävä kaivo ja I_{Avd}:llä avidiinia monistaneen PCR-reaktion puhdistettua lopputuotetta sisältävä kaivo. Roomalaisella numerolla II on kuvaan merkitty kaivo, jossa on näyte PCR II-reaktion puhdistetusta lopputuotteesta.

5.3.2 Bakulovirusten valmistus

Insertit liitettiin FastBacTM1-vektoreihin, jotka transformoitiin bakteereihin. Bakteeriviljelmistä jatkokasvatukseen valittiin muutama oikean insertin sisältänyt pesäke. Valinta tehtiin pesäke-PCR:n avulla. Avd-insertin sisältäville bakteereille tehdyn pesäke-PCR-reaktioiden tuloksena muodostuneiden DNA-tuotteiden geelijaon tulos on esitetty kuvassa 5.15. Vastaavanlainen tulos saatiin myös bakteeripesäkkeistä, jotka sisälsivät His-insertin. Tätä kuvaa ei ole esitetty.



5.15 Pesäke-PCR bakteeriviljelmästä. PCR on tehty käyttäen Avd-insertin alueelta monistavia alukkeita. Kuvaan on merkitty negatiivisen kontrollin kaivo NK:lla ja tarkistettujen pesäkkeiden kaivot numeroilla 1-14.

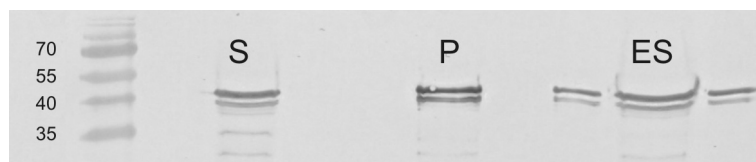
Kuvasta 5.15 voidaan todeta suurimman osan bakteeripesäkkeistä sisältäneen insertin. Ainoastaan pesäkkeistä 11 ja 14 insertti puuttui. Jatkokasvatukseen valittiin kolme pesäkettä, 7, 8 ja 12, joiden PCR-tuotteet olivat toisiinsa nähden ajautuneet hieman eri kohtaan geeliä. Sekvensoinnin tuloksena pesäkkeen 12 insertistä löydettiin häviämä (deleetio). Pesäkkeiden 7 ja 8 sisältämät insertit todettiin virheettömiksi. His-insertin sisältämistä bakteeripesäkkeistä viisi valittiin jatkoon. Sekvensoinnin tuloksena jatkoon valituista His-inserteistä kolmessa havaittiin pistemutaatio ja yhdessä deleetio. Uusien bakulovirusten luontiprosessia jatkettiin virheettömän insertin sisältävillä kolmella bakteerikannalla.

Virheettömän insertin sisältävien bakteerikantojen avulla muodostettiin uusien bakuloviruskantojen primaarivarastot, joiden tiitterit selvitettiin plakkimääritys avulla. Avidiini-puhdistuskahvaan liitettyä proteiinia tuottavan viruksen primaarivaraston tiitteri oli noin 1×10^7 . Histidiini-puhdistuskahvaan liitettyä proteiinia tuottavan viruksen primaarivaraston tiitteri oli huomattavasti alhaisempi, noin 1×10^6 .

5.4 Aminoterminaalisen domeenin tuotto ja puhdistus

5.4.1 Avidiini-puhdistuskahvaisen proteiinin tuotto ja puhdistus

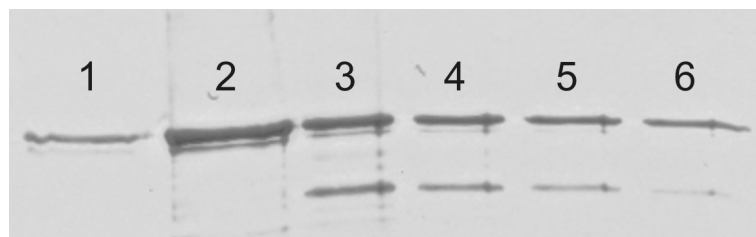
Avidiini-puhdistuskahvaisen aminoterminaalisen domeenin ensimmäinen isompi tuotto tehtiin 150 ml:n Sf9-soluviljelmässä, joka infektoitiin solutiheydellä 2 milj. solua/ml. Tuoton pääasiallisena tarkoituksena oli tuottaa lisää virusta. Tämän takia tuoton MOI-arvo pidettiin matalana noin 0,5:ssä. Tuotto kerättiin kolmantena päivänä infektiosta. Solususpensiosta sentrifugoimalla muodostunut supernatantti säilöttiin virusvarastoksi +4 °C:n lämpötilaan ja solupelletistä puhdistettiin proteiini 2-iminobiotiiniipylvään avulla. Kuvassa 5.16 on puhdistuksen eri vaiheista otetut näytteet.



Kuva 5.16 Avidiini-puhdistuskahvaisen aminoterminaalisen domeenin puhdistuksen vaiheet. Kuvaan on merkitty S:llä solujen hajotuksen jälkeisen sentrifugoinnin supernatantista otettu näyte. Sentrifugoinnissa muodostuneesta pelletistä otettu näyte, joka on liuotettu supernatantin kanssa vertailukelpoiseen tilavuuteen, on merkitty kuvaan tunnuksella P. Tunnuksella ES on merkitty näyte 2-iminobiotiiniipylvään sitoutumattomasta fraktiosta. Myös tämän näytteen tilavuus on vertailukelpoinen S ja P näytteiden kanssa.

Tuotettavan proteiinin molekyylipainoksi oli laskettu 39,5 kD:a. Kuvasta 5.16 voidaan havaita tuotetun proteiinin olevan suunnilleen tämän kokoinen. Kuvan avulla voidaan päätellä tuotetun proteiinin saannon pienentyneen puhdistuksen aikana huomattavasti, sillä yli puolet tuotetusta proteiinista on jäänyt puhdistuksen vaiheisiin. Sonikoinnin jälkeen tehdyn sentrifugoinnin pellettissä tuotettua proteiinia on yhtä paljon kuin liukoisessa fraktiossakin. Tämän perusteella voitiin olettaa solun sisälle tuottuneesta proteiinimäärästä 50 % jääneen solurippeiden sisään pellettiin ja näin pois lopullisesta puhtaan proteiinin saannosta. Kuvan 5.16 perusteella 2-iminobiotiiniin sitoutumattoman proteiinin määrän voidaan todeta olevan myös kohtalaisen suuri, minkä perusteella käytetyn 2-iminobiotiinin määrän oletettiin olleen liian pieni sitouttamaan kaikki tuotettu proteiini.

Puhdistuksen tuloksena muodostuneiden fraktioiden sisältämät β 3Glc-T:n aminoterminaalisen domeenin määrät on esitetty kuvassa 5.17. Kuvasta voidaan havaita toisen fraktion sisältävän eniten β 3Glc-T:n aminoterminaalista domeenia. Fraktioiden proteiinipitoisuus mitattiin myös NanoDrop-spektrofotometrillä, jonka tuloksien mukaan toinen fraktio sisälsi proteiinia 160 ng/ μ l. Tämän perusteella suspensioviljelmässä oli keräyspäivänä ollut noin 1 μ g/ml:ssa β 3Glc-T:a.



Kuva 5.17 Immunoblottokuva avidiinikahvaisen aminoterminaalisen domeenin puhdistuksen lopputuloksena muodostuneista fraktioista. Fraktiot ovat numeroitu eluotumisjärjestyksessä.

Fraktion kaksi sisältämän β 3Glc-T:n aminoterminaalisen domeenin määrää voitiin pitää varsin lupaavana tulevia tuottoja ajatellen, sillä kyseessä oli vasta viruksen monistustuotto, ja kuten kuvasta 5.16 havaitaan, osa tuotetusta proteiinista oli jäänyt puhdistusreitit varrelle. Fraktio 2 lähetettiin kiteytyskokeiluihin, vaikka se sisälsikin aminoterminaalisisessa domeenissa kiinni olevan avidiini-puhdistuskahvan, joka todennäköisesti häiritsevi kiteytystä. Tuotettua proteiinia ei kuitenkaan onnistuttu tästä näytteestä kiteyttämään.

Seuraavissa tuotoissa tilavuutta kasvatettiin noin 500 ml:an ja MOI-arvoa viiteen. Ensimmäisen tuoton perusteella solujen hajotusta tehostettiin ja 2-iminobiotiinin määrää lisättiin. Näistä parannuksista huolimatta lopullisen puhdistetun proteiinin määrä ei seuraavassa tuotossa kasvanut.

Isoja tuottoja tehtiin kaksi. Näiden tuottojen puhdistuksen vaiheista analysoidut näytteet osoittivat solujen hajotuksen toimivan yhä huonosti, sillä hajotuksen sentrifugoinnin jälkeisessä pelletissä oli edelleen lähes yhtä paljon β 3Glc-T:a kuin puhdistuspylvääseen sitoutettavassa supernatantissa. Tämän lisäksi 2-iminobiotiiniresiiniin sitoutumattomasta fraktiosta otetut näytteet osoittivat hyvin suuren määrän proteiinia jääneen sitoutumatta pylvääseen. Todellinen syy huonoihin tuottomääriin selvisi vasta projektin loppumisen jälkeen, sillä tällöin oli havaittu käytetyn eluutiopuskurin pH:n olevan huomattavasti arvoa 4 korkeampi. Koska 2-iminobiotiiniin sidotun avidiini-kahvaisen proteiinin eluointi pylväästä perustuu pH:n laskuun, ei kokeissa käytetty eluointipuskuri ollut irrotanut β 3Glc-T:n aminoterminaalista domeenia pylväästä.

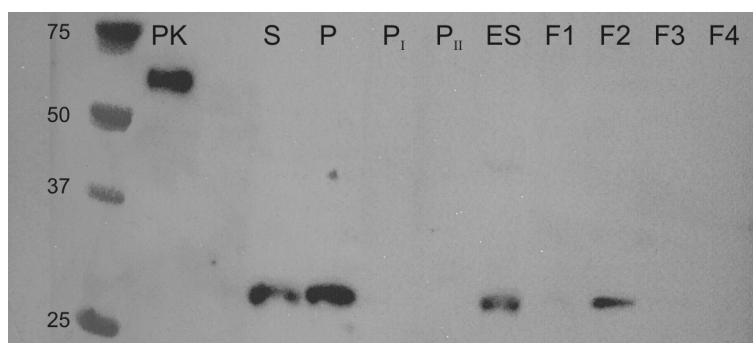
5.4.2 His-puhdistuskahvaisen proteiinin tuotto ja puhdistus

His-puhdistuskahvaista aminoterminaalista domeenia tuottavalla bakuloviruksella tehtiin yksi 50 ml:n monistustuotto. Hyönteissolut pyrittiin infektoimaan MOI-arvolla 0,1. Todellisuudessa MOI-arvo oli kuitenkin lähempänä 0,01, sillä plakkipuhdistuksen tulos myöhemmin osoitti viruksen tiitterin olleen oletettua alhaisempi. Proteiinin tuotosta otettiin päivittäin näytteet, joista sentrifugomalla eroteltiin solut ja elatusliuos tuottoanalyysiä varten. Solususpensio kerättiin kolmantena päivänä.

Kasvatuksen aikana otetuista näytteistä analysoitiin β 3Glc-T:n aminoterminaalisen domeenin määrä. Solunsisäisessä fraktiossa tuotettua proteiinia oli havaittavissa jokaisen kasvatuspäivän näytteessä, mutta verrattuna aiemmin esiteltyihin β 3Glc-T:n tuottoihin proteiinia oli tuottunut hyvin vähän. Elatusliuoksessa tuotettua proteiinia ei ollut havaittavissa yhtenäkkään päivänä.

Koska elatusliuos ei sisältänyt immunoblottauksessa havaittavia määriä tuotettua proteiinia, oli proteiinin puhdistus mahdollista ainoastaan solun sisään tuottuneesta proteiinista. Kuvasta 5.18 havaitaan hajotuksen toimineen heikosti, sillä yli puolet tuotetusta proteiinista on jäänyt solupellettiin hajotuksen jälkeen. Solujen hajotuksesta muodostunut supernatantti kuitenkin puhdistettiin Invitrogenin ProBondTM-puhdistusjärjestelmän mukaisesti. Kuvasta 5.18 voidaan nähdä sitouttamisen jälkeisessä näytteessä olevan huomattavan paljon sitoutumatonta β 3Glc-T:n aminoterminaalista domeenia. Vastaavaa ilmiötä ei ollut havaittavissa β 3Glc-T:n elatusliuoksesta tehdyissä puhdistuksissa. Tämän epäiltiin aiheutuvan pylvään vanhentumisesta, proteiinin puhdistamisesta solujen sisästä elatusliuoksen sijaan tai 8 \times His-puhdistuskahvan heikommasta sitoutumisesta pylvääseen verrattuna 6 \times His-puhdistuskahvaan, jota käytettiin β 3Glc-T:n puhdistuksessa. Oletukset olisivat kuitenkin vaatineet uuden puhdistuksen ennen kuin varmempia

johtopäätöksiä olisi voitu tehdä. Puhdistettu fraktio kuitenkin edelleen eluoiutui lähes kokonaan yhteen millilitran fraktioon.

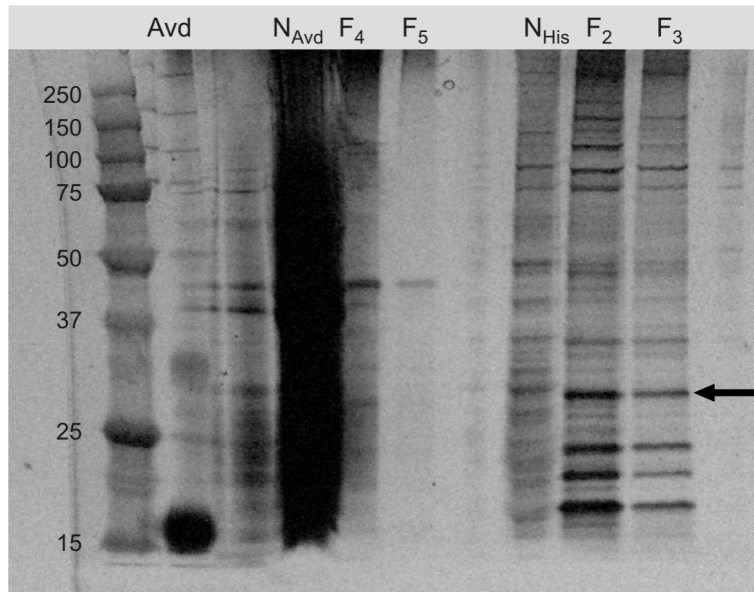


Kuva 5.18 Immunoblottauskuva histidiini-puhdistuskahvaisen aminoterminaalisen domeenin puhdistuksen vaiheista. Kuvaan on merkitty S:llä solujen hajotuksen jälkeisen sentrifugoinnin supernatantista otettu näyte. Sentrifugoinnissa muodostuneen pelletin näyte, joka on liuotettu supernatantin kanssa vertailukelpoiseen tilavuuteen, on merkitty kuvaan tunnuksella P. Tunnuksella ES on merkitty nikkeliresiiniin sitoutumattomasta fraktiosta otettu näyte, jonka tilavuus on myös vertailukelpoinen S- ja P-näytteiden kanssa. Näiden lisäksi kuvassa on nikkeliresiinin pesuista otetut näytteet PI ja PII sekä puhdistuksen lopputuloksena muodostuneista 1 ml fraktioista otetut näytteet F1-F4. Positiivisena kontrollina (PK) immunoblottaukselle on käytetty β 3Glc-T:n tuotoista peräisin olevaa näytettä.

Kuvasta voidaan kuitenkin todeta uuden viruskannan tuottaneen oikean kokoista proteiinia, sillä His-puhdistuskahvaan liitetyn aminoterminaalisen domeenin arvioitu molekyylipaino oli 33,5 kD. Positiivisena kontrollina kuvassa 5.18 on käytetty täysimittaista β 3Glc-T:n tuotoista ennen puhdistusta otettua näytettä. Tämän näytteen β 3Glc-T:n pitoisuus on kuvan mukaan suurempi kuin aminoterminaalisen domeenin puhdistuksen jälkeisen fraktion. Tämänkin vertailun perusteella tuottotaso on matala, mutta osasyynä tähän todennäköisesti oli viruksien vähyys infektiotokella.

5.4.3 Tuottojen ja puhdistusten vertailu

Kuvassa 5.19 on hopeavärjäysgeeli, jossa on näytteitä sekä avidiini- että histidiinikahvaisen proteiinin tuotosta ja puhdistetuista fraktioista. Menetelmien paremmuusvertailu puhdistetun proteiinin määrään perustuen ei ole kovin järkevää näiden tulosten perusteella, sillä 8 \times His-puhdistuskahvaisen aminoterminaalisen domeenin tuotto ehdittiin tekemään vain kerran ja sekin liian pienellä virusmäärällä. Avidiini-puhdistuskahvaisen proteiinin tuotto sen sijaan toimi hyvin, mutta eluointipuskurin väärän pH:n vuoksi suurin osa tuotetusta proteiinista jäi puhdistuspylvääseen. Näiden syiden vuoksi puhdistetun fraktion proteiinimäärä on todennäköisesti kummallakin tuottotavalla tehtynä vain pieni osa siitä määrästä, mitä molempien bakulovirusvektorien avulla olisi mahdollista tuottaa.



Kuva 5.19. Hopeavärjäysgeeli aminoterminaalisen domeenin tuotoista ja puhdistuksista sekä histidiini- että avidiini-puhdistuskahvojen avulla. Kuvaan on Avd:llä merkitty kaivo, joka sisältää 5 μ l 1 mg/ml avidiinia sisältävää liuosta. Muita näytteitä kaivossa on 20 μ l. N_{Avd} on näyte avidiini-puhdistuskahvaisen aminoterminaalisen domeenin solujen hajotuksen jälkeisestä supernatantista. F_4 ja F_5 ovat N_{Avd} -näytteestä puhdistuksen jälkeen muodostuneet fraktiot, joissa immunoblottauksen mukaan oli eniten proteiinia. N_{His} on puolestaan näyte His-puhdistuskahvaisen aminoterminaalisen domeenin solujen hajotuksen jälkeisestä supernatantista. F_2 ja F_3 ovat N_{His} -näytteestä puhdistuksen jälkeen muodostuneet fraktiot, joissa immunoblottauksen mukaan oli eniten proteiinia. Nuoli osoittaa tuotetun proteiinin vyöhykettä.

Hopeavärjäysgeeliltä voitiin havaita avidiini-puhdistuskahvaan sidotun aminoterminaalisen domeenin suuri tuotettu määrä N_{Avd} -näytteessä, joka tosin kuvasta näkyy hieman heikosti. Vastaavanlaista suurta vyöhykettä ei ole havaittavissa His-puhdistuskahvaisen proteiinin tuottoliuoksessa. Tämän lisäksi kuvasta voidaan vertailla puhdistusmenetelmien tehokkuutta. 2-iminobiotiinillä puhdistetussa avidiini-puhdistuskahvaisen aminoterminaalisen domeenin puhdistetussa fraktiossa ei ole havaittavissa muita vyöhykkeitä, kun taas nikkeliresiinin avulla puhdistetussa fraktiossa on tuotetun proteiinin lisäksi muitakin proteiineja. Kuva kuitenkin osoittaa His-puhdistuskahvaisen proteiinin puhdistuvan, sillä alkuperäisessä elatusliuoksesta otetussa näytteessä aminoterminaalisen domeenin vyöhyke ei erotu, mutta puhdistetussa fraktiossa se on selkeästi havaittavissa. Avidiinipuhdistuksen kohdalla on kuitenkin otettava huomioon, että proteiini oli eluoitu pylvästä väärällä pH:lla, joten tuotetun proteiinin lisäksi todennäköisesti myös muut mahdollisesti pylväseen kiinnittyneet proteiinit eivät olisi eluoituneet puhdistettuun fraktioon vaan jääneet kiinni pylväseen, eivätkä näkyisi kuvassa.

6 Pohdinta

Tutkimusprojektin tavoitteena oli tuottaa ja puhdistaa β 3Glc-T:a sekä luoda kaksi uutta bakuloviruskantaa, joiden avulla voitaisiin tuottaa β 3Glc-T:n aminoterminaalista domeenia. Tässä kappaleessa arvioidaan kuinka hyvin tavoitteissa onnistuttiin, käydään läpi ongelmakohtia sekä pohditaan, mitä työssä olisi ollut syytä tehdä toisin. Näiden lisäksi esitetään lyhyet visiot, miten jokaista projektia olisi jatkettu, mikäli tutkimus β 3Glc-T:n parissa olisi tutkimusryhmässä jatkunut. Viimeisenä esitetään lyhyt katsaus β 3Glc-T:n ympärillä maailmalla tapahtuneeseen tutkimukseen projektin aikana.

6.1 Täysimittaisen β 3Glc-T:n tuoton ja puhdistuksen optimointi

6.1.1 Täysimittaisen β 3Glc-T:n tuoton optimointi

β 3Glc-T:n tuoton optimointi aloitettiin adherenttiljelmissä, joissa testattiin tuottoon liittyvien muuttujien erilaisten arvojen vaikutusta tuottomääriin. Adherenttiljelmissä oli mahdollista tehdä useampia rinnakkaisia kokeita, jolloin tietyn muuttujan eri arvoja voitiin testata muiden muuttujien arvojen pysyessä samoina. Lisäksi adherenttiljelmät olivat usein pieniä, jolloin kallista elatusliuosta kului vähän. Adherenttiljelmätuottojen tuloksista saatiin paljon tietoa β 3Glc-T:n tuottumisesta Sf9- ja High FiveTM-soluvaljelmassa.

Rakenteen määrittämistä varten β 3Glc-T:a tarvittiin enemmän kuin pohjapinta-alaltaan 75 mm² soluvaljelypulloihin perustuvissa adherenttiljelmissä oli käytännöllistä tuottaa. Tämän vuoksi β 3Glc-T:a siirryttiin tuottamaan suspensiovaljelmassa, joissa tuottoliuoksen tilavuuden kasvattaminen satoihin millilitroihin oli huomattavasti helpompaa. Suspensio- ja adherenttiljelmissä solut kuitenkin käyttäytyivät hieman eritavoin, joten adherenttiljelmissä tehtyjen optimointien tuloksia ei voitu suoraan soveltaa suspensiovaljelmiin. Tuoton optimointiin adherenttiljelmissä käytettiin kuitenkin työssä huomattavasti aikaa. Kenties olisikin ollut hyödyllisempää käyttää enemmän resursseja adherenttituottojen sijaan pienimuotoisten suspensiotuottojen tekemiseen, jolloin tulokset ja havainnot olisivat olleet lähes suoraan sovellettavissa isompiin suspensiotuottoihin.

Adherenttiljelmillä tehdyissä tuottokokeissa käytettiin β 3Glc-T:a tuottavaa virusliuosta, jonka titeri oli noin 5×10^7 . Tätä virusliuosta ei kuitenkaan ollut riittävästi isojen solususpensiotuottojen

infektoimiseen riittävän suurella MOI-arvolla. Virusta tuotettiin lisää sekä solususpensiotuotoissa että adherenttilijelmissä. Plakkipuhdistusten perusteella havaittiin, että uusien virustuottojen tiitterit jäivät alhaisemmiksi kuin virustuottojen infektointiin käytetyn virusliuoksen. Tämän lisäksi erityisesti solususpensioissa tuotettujen virusliuosten tiitterien todettiin alenevan nopeasti säilytyksen aikana. Alhaisten tiitterien seurauksena tuottoihin piti lisätä riittävän MOI-arvon saavuttamiseksi suurempia määriä virusliuosta. Koska virusliuos oli kerätty virustuotosta kuudentena päivänä infektion jälkeen, se todennäköisesti sisälsi huomattavia määriä proteaaseja, jotka myös osaltaan saattoivat vaikuttaa tiitterien pienenemiseen säilytyksen aikana. Suurentuneiden virusliuosten tilavuuksien vuoksi virusliuoksen sisältämiä proteaaseja pääsi tuottoliuokseen entistä enemmän, mikä mahdollisesti vähensi elatusliuokseen tuotetun β 3Glc-T:n määrää.

Edellistä oletusta vahvistivat havainnot, joissa 1,5 milj. solua/ml:ssa infektointihetkellä sisältäneet solususpensiot, joihin siis oli siirretty huomattavasti enemmän proteaasipitoista virusliuosta tuoton kannalta tehokkaan MOI-arvon saavuttamiseksi, näyttivät kahden eri immunoblotin vertailussa tuottavan vähemmän β 3Glc-T:a kuin 0,7 milj. solua/ml:ssa infektiotuhetkellä sisältäneet soluviljelmät. Kirjallisuuden mukaan suositeltava infektointihetken solutiheys on kuitenkin 1,5 - 2 milj. solua/ml, joten kokeissa paremman tuoton saavuttaminen alhaisemmalla infektointihetken solutiheydellä saattoi siis johtua siitä, että proteaasipitoista virusliuosta oli tuottoon käytetty vähemmän.

Toisaalta adherenttilijelmäkokeiden tulosten perusteella solutiheydellä 0,5 milj. solua/ml infektoidut viljelmät tuottivat β 3Glc-T:a suurempia määriä kuin solutiheydellä 1,5 milj. solua/ml infektoidut viljelmät. Nämä tuotot oli tehty käyttäen korkeatiitteristä virusliuosta, jolloin viljelmiin lisätyn virusliuoksen tilavuuksissa ei ollut suuria eroja. Näiden havaintojen perusteella suurempi tuotto solutiheydellä 0,7 milj. solua/ml infektoiduissa suspensioviljelmissä saattoi johtua siitä, että β 3Glc-T:n tuotoissa alhaisempi solutiheys infektiotuhetkellä sai aikaan paremman tuoton, tai siitä, että alhaisemmilla solutiheyksillä virusliuosta tarvittiin vähemmän. Tulos saattoi aiheutua myös molempien edellä esitettyjen seikkojen yhteisvaikutuksesta. Tuottoja olisikin edellä mainitun ongelman takia kannattanut tehdä hieman alemmilla infektointihetken solutiheyksillä tai alhaisemmilla MOI-arvoilla. Toinen ratkaisu mahdollisesti proteaaseista aiheutuvaan proteiinien hajoamiseen olisi ollut proteaasi-inhibiittorien käyttö virusliuoksissa.

Alkuperäisenä syynä oletettuun proteaasien kasvaneeseen määrään solususpensiossa oli infektointiin käytetyn virusliuoksen tilavuuden kasvu, joka puolestaan aiheutui virusliuoksen tiitterin alenemisesta. Tätä olisi voitu estää säilyttämällä virusvarastoja, joita ei aktiivisesti käytetty, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$:n lämpötilassa. Tällöin pakastuksen ja sulatuksen yhteydessä tiitteri olisi todennäköisesti pienentynyt hieman, mutta säilynyt pitkäaikaisessa varastoinnissa silti korkeampana kuin $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$:n lämpötilassa varastoituna, kuten työssä tehtiin. Virukset olisi myös kannattanut kerätä liuoksesta aiemmin, sillä silmikoituneiden viruksien tuotto on yleensä suurimmillaan jo vuorokauden kuluttua infektiosta. Mikäli virusliuos olisi kerätty esimerkiksi kolmantena päivänä olisi elatusliuos todennäköisesti sisältänyt vähemmän proteaaseja, koska solut eivät olisi olleet niin kärsineitä kuin kuudentena päivänä kerättäessä.

$\beta 3\text{Glc-T}$:a tuotettiin seitsemässä solususpensiotuotossa. Kaikissa näissä proteiinia tuottui kohtalaisen paljon, mutta osassa keräyspäivän liian myöhäinen valinta johti siihen, että kerätyn proteiinin määrä jäi vähäiseksi. Näiden tuottojen jälkeen pidettiin pidempi tauko, jonka jälkeen proteiinituotot eivät enää onnistuneet. Plakkimääritysten perusteella syyksi todettiin bakulovirusvarastojen laskenut tiitteri, joka ei enää ollut edes 1×10^6 . Näin alhaisella tiitterillä tuottoja ei kannattanut tehdä, sillä virusliuosta olisi riittävän MOI-arvon aikaansaamiseksi tarvittu infektiioon lähes yhtä paljon kuin infektoitavaa solususpensiotakin oli.

Todennäköisesti paras ratkaisu alhaisista tiittereistä aiheutuviin ongelmiin olisi ollut viruksen uudelleen luominen bacmideista alkaen, mutta koska virus oli tuotu valmiina, ei viruksen luomiseen tarvittavaa bacmidia tai edes bacmidin luomiseen tarvittavaa siirtovektoria ollut käytettävissä. Ainoaksi vaihtoehdoksi uudistaa virusta jäi plakkipuhdistukseen perustuva menetelmä, joka olisi ollut pitkäkestoinen ja työläs prosessi. Tähän prosessiin ei ryhdytty, sillä $\beta 3\text{Glc-T}$ -projektin tiedettiin tutkimusryhmässä loppuvan. Tämän lisäksi $\beta 3\text{Glc-T}$:n kiteytyksen onnistuminen olisi ollut varsin epävarmaa sen oletetun liikkuvan rakenteen vuoksi, joten projektin loppuaika keskityttiin aminoterminaalisten domeenien tuottamiseen.

6.1.2 Täysimittaisen $\beta 3\text{Glc-T}$:n puhdistuksen optimointi

$\beta 3\text{Glc-T}$:n puhdistuksessa suurin ongelmakohta oli elatusliuoksen sisältämän $\beta 3\text{Glc-T}$:n konsentrointi ammoniumsulfaattisaostuksella, jonka aikana $\beta 3\text{Glc-T}$:n määrä väheni huomattavasti erityisesti suspensiotuotoista peräisin olevista liuoksista. $\beta 3\text{Glc-T}$:n hävikin saostuksen aikana saattoivat aiheuttaa proteaasit, sillä $\beta 3\text{Glc-T}$:n ei havaittu jäävän mihinkään

ammoniumsulfaattisaostuksen vaiheeseen. Proteaasi-inhibiittorien käyttöä aluksi vältettiin, sillä proteaasien ajateltiin menettävän toimintakykynsä suuressa suolapitoisuudessa. Proteaasien toiminnan osoittamiseksi suunniteltiin kuitenkin koe, joka toteutettiin liian vähäisellä β 3Glc-T:n määrällä. Tämä koe olisi ehdottomasti kannattanut uusia. Kokeen tuloksen perusteella olisi voitu todeta onko proteaasi-inhibiittoreista apua. Toinen mahdollinen selitys hävinneelle proteiinille saattaisi olla proteiinin sakkautuminen saostusputkien seinämille. Tämä yritettiin kuitenkin huomioida jo työn aikana huuhtomalla putken seinämät pelletin liuotuksen yhteydessä.

Ammoniumsulfaattisaostuksessa inkubaatioaikaa yritettiin optimoida mahdollisemman lyhyeksi, jotta proteiinin hajoamiselle suolasaostuksessa jäisi mahdollisimman vähän aikaa. Voimakkaan suolapitoisuuden vuoksi näistä kokeista otettuja näytteitä oli kuitenkin vaikea analysoida, sillä SDS-PAGE-geeliä ajettaessa virta nousi matalasta jännitteestä huolimatta liian korkeaksi virtalähteelle, jos suolapitoisia näytteitä oli monta samalla geelillä. Ammoniumsulfaattisaostusta olisi voitu optimoida myös suolapitoisuuden osalta, jolloin ammoniumsulfaattisaostus olisi toiminut konsentroidin lisäksi myös ensimmäisenä puhdistusvaiheena. Tässä puhdistusvaiheessa β 3Glc-T:a hydrofiilisemmat proteiinit olisi voitu poistaa puhdistettavasta liuksesta.

Ammoniumsulfaattisaostusta tarvittiin elatusliuoksen sisältämän β 3Glc-T:n konsentroidimiseen riittävän pieneen tilaan, jotta se mahtui sitoutettavaksi nikkeli-kelatiini-resiiniä sisältävään ProBondTM-pylvääseen. Eräs mahdollisuus välttää ongelmalliseksi osoittautunut ammoniumsulfaattisaostus olisi ollut nikkeli-kelatiini-resiinin siirtäminen pylvään sijasta solususpensiosta sentrifugoinnin avulla erotetun supernatantin sisältävään putkeen. Sitouttamisen jälkeen nikkeli-kelatiini-resiini, johon His-puhdistuskahvaiset proteiinit olivat tarttuneet, olisi sentrifugoinnin avulla voitu pelletoida ja siirtää muodostunut sakka pylvääseen, jossa proteiinin puhdistusta olisi jatkettu ProBondTM-puhdistusjärjestelmän mukaisesti. Supernatanttiin sentrifugoinnin jälkeen jäävän β 3Glc-T:n määrän perusteella olisi voitu arvioida, kuinka hyvin nikkeli-kelatiini-resiini oli onnistunut β 3Glc-T:a elatusliuoksesta sitomaan eli arvioida menetelmän toimivuutta.

Toinen mahdollisuus välttää ammoniumsulfaattisaostus ja todennäköisesti lisätä β 3Glc-T:n saantoa olisi ollut β 3Glc-T:n puhdistus solun sisältä. Tällöin puhdistettuun fraktioon olisi todennäköisesti tullut myös kiteytystä mahdollisesti haittaavia eri muokausvaiheissa olevia proteiineja, kuten kappaleessa 5.2 on esitetty. Puhdistusta solujen sisältä olisi silti kannattanut kokeilla, sillä

jokaisessa tuotossa β 3Glc-T:n määrä solujen sisällä oli tulosten perusteella huomattavasti suurempi kuin elatusliuoksessa.

ProBondTM-puhdistusjärjestelmä toimi kohtalaisen tehokkaasti, mutta puhdistettuun fraktioon jäi hopeavärijäyskuvien perusteella β 3Glc-T:n lisäksi muitakin proteiineja. Näiden sitoutumista nikkeli-kelatiini-resiiniin olisi todennäköisesti voitu vähentää lisäämällä sitouttamiskuriinimidatsolia, joka olisi kilpaillut heikommin pylvääseen sitoutuvien proteiinien kanssa. Puhdistuksia tehtiin kuitenkin vain muutama, joten erilaisten imidatsolipitoisuuksien vaikutusta ei testattu. Todennäköisesti imidatsolipitoisuuksien optimointi ei yksinään riittäisi kiteytystä varten tarpeeksi puhtaan proteiiniliuoksen tuottamiseen vaan ProBondTM-puhdistusjärjestelmän jälkeen tarvittaisiin vielä toinen puhdistusprosessi. Hopeavärijäyksen mukaan β 3Glc-T:n lisäksi elatusliuoksesta puhdistuneet proteiinit ovat kuitenkin erikokoisia kuin β 3Glc-T, mikä todennäköisesti helpottaisi jatkopuhdistuksia. Eräänä jatkopuhdistusvaihtoehtona suunniteltiin käytettäväksi FPLC-ajoa (Fast protein liquid chromatography).

6.1.3 Yhteenveto β 3Glc-T projektista ja sen tulevaisuuden visiot

Adherenttiviljelmissä testattiin erilaisten muuttujien arvojen vaikutusta β 3Glc-T:n tuottoon. Näiden kokeiden perusteella määriteltiin adherentille β 3Glc-T:a tuottavalle viljelmälle paras elatusliuokseen eritetyn tuoton keräyspäivä sekä suositeltava infektointihetken solutiheys. Adherenttiviljelmätuottojen avulla tutkittiin myös tuotetun β 3Glc-T:n sijaintia viljelmässä sekä vertailtiin Sf9- ja High FiveTM-solujen β 3Glc-T:n tuottoa kolmella erilaisella infektointihetken solutiheydellä kahdessa eri lämpötilassa.

β 3Glc-T:a tuotettiin myös solususpensiossa, mutta liian myöhäisen keräyspäivän tai ammoniumsulfaattisaostuksen aikana esiintyneiden ongelmien vuoksi puhdistettavaksi aiotusta liuoksesta β 3Glc-T kadotettiin ennen varsinaista puhdistusvaihetta. Projektin loppupuolella uusia tuottoja ei voitu enää tehdä, sillä käytettyjen virusliuosten tiitterit olivat laskeneet liian alhaisiksi riittävän MOI-arvon saavuttamiseen kohtuullisella määrällä virusliuosta.

Adherenttiviljelmistä kerätyistä tuotoista hävikki ammoniumsulfaattisaostuksen aikana β 3Glc-T:n oli pienempi kuin suspensioviljelmistä kerätyistä tuotoista, joten adherenttiviljelmien tuotoista peräisin ammoniumsulfaattisaostetuilla liuoksilla voitiin testata ProBondTM-puhdistusjärjestelmän toimivuutta. ProBondTM-puhdistusjärjestelmän todettiin toimivan kohtuullisesti, mutta

puhdistettuun fraktioon havaittiin jäävän β 3Glc-T:n lisäksi muitakin proteiineja. Kiteytykseen vaadittavan puhtausprosentin saavuttamiseksi lisäpuhdistuksia olisi vielä tarvittu.

Mikäli projekti olisi jatkunut, bakuloviruskanta olisi uudistettu plakkipuhdistuksen avulla. Tämän jälkeen uutta, toivottavasti korkeatiitteristä virusliuosta olisi tuotettu kerralla runsaasti, jotta samaa virusliuosta olisi voitu käyttää useissa solususpensiotuotoissa. Virus olisi kerätty virustuotoista viimeistään kolmantena päivänä ja osa tuotetusta virusliuoksesta olisi pakastettu myöhempää käyttöä varten. β 3Glc-T:n substraattien selviämisen myötä tuotetulle proteiinille olisi voitu tehdä entsyymaattisen aktiivisuuden määrittäminen, jonka avulla olisi selvinnyt tuottuuko proteiini aktiivisessa muodossaan.

Ammoniumsulfaattisaostukseen liittyvien β 3Glc-T:n häviöiden selvittämiseen suunniteltu proteaasi-inhibiittorikoe olisi tehty ja sen tulosten pohjalta pohdittu proteaasien vaikutusta ja niiden mahdollisen toiminnan estämistä. Myös nikkeli-kelatiini-resiinin kykyä sitoa His-puhdistuskahvaisia proteiineja ProBondTM-puhdistusjärjestelmän ohjeiden mukaista tilavuutta suuremmasta tilavuudesta olisi myös testattu, jolloin ammoniumsulfaattisaostukselta olisi voitu välttyä. Edellisten parannusten lisäksi ProBondTM-puhdistusta olisi optimoitu erilaisia sitouttamispuskurin ja pesupuskureiden imidatsolipitoisuuksia testaamalla. Mikäli näillä parannuksilla olisi onnistuttu tuottamaan muutama milligramma lähes puhdasta β 3Glc-T:a, olisi tämä liuos lähetetty kiteytettäväksi.

6.2 β 3Glc-T:n aminotermiinalisen domeenin tuotto ja puhdistus

6.2.1 β 3Glc-T:n aminotermiinalista domeenia tuottavien bakulovirusvektorien luonti

Työn toisessa osassa β 3Glc-T:n aminotermiinalisen domeenin tuottoa varten luotiin kaksi uutta bakuloviruskantaa, joista toisen aminotermiinaliseen domeeniin liitettiin His-puhdistuskahva ja toiseen avidiini-puhdistuskahva. Bakulovirusvektorit luotiin Invitrogenin Bac-to-Bac[®]-menetelmää mukailleen, jossa tuotettavan proteiinin geeni saatiin bakuloviruksen genomiin siirtovektoreiden avulla Bakuloviruskannan luontia varten SES-PCR:n ja neljän alukkeen PCR -menetelmän avulla valmistettiin insertit, jotka sisälsivät puhdistuskahvan ja tuotettavan proteiinin sekvenssin. PCR-menetelmät sekä niissä käytetyt alukkeet toimivat hyvin, sillä kumpaakin inserttiä saatiin tuotetuksi riittävästi siirtovektoriin liittämistä varten.

Siirtovektorien sisältämien inserttien sekvensointi osoitti kahdeksasta sekvensoidusta insertistä viiden olevan mutatoitunut. Tämä oletettavasti johtui inserttien rakennukseen käytetystä Amplitaq Gold –entsyymistä, jonka sijaan olisi ollut parempi käyttää polymeerasia, jolla on oikolukuominaisuus. Tällöin mutaatioiden määrä todennäköisesti olisi vähentynyt.

Molempien uusien bakulovirusvarastojen tiitterit arvioitiin plakkimäärityksen avulla ja tiittereiksi saatiin His-puhdistuskahvaista proteiinia tuottavalle virukselle 1×10^6 ja avidiini-puhdistuskahvaista proteiinia tuottavalle virukselle 1×10^7 . His-puhdistuskahvaan liitettyä aminotermiinalista domeenia tuottavan viruksen tiitteri oli hieman alhainen, joten viruksen luontia uudelleen harkittiin. Toisaalta virusten monistustuoton avulla olisi mahdollisesti voitu saada aikaan korkeatiitterisempi virusvarasto tästäkin bakuloviruksesta.

6.2.2 Avidiini-puhdistuskahvaan liitetyn β 3Glc-T:n aminotermiinalisen domeenin tuotto ja puhdistus

Avidiini-puhdistuskahvaan liitetty β 3Glc-T:n aminotermiinalinen domeeni puhdistettiin solun sisältä, jolloin tuotetun proteiinin keräämiseksi solut tuli ensin hajottaa. Ensimmäisen tuoton saanto oli noin 160 μ g eli solususpensioviljelmä oli tuottanut proteiinia noin 1 μ g:n millilitrassa. Tämä oli varsin hyvä tulos, sillä ensimmäinen tuotto oli tehty lähinnä uuden bakuloviruksen monistusta ja tiitterin parannusta varten. Tämän vuoksi tuotossa oli käytetty viruksen monistukseen sopivaa MOI-arvoa, joka oli huomattavasti proteiinin tuotolle optimaalista MOI-arvoa alempi. Tämän lisäksi puhtaan proteiinin saantoa vähensi liian kevyt solujen hajotus, jonka vuoksi huomattava osa tuotetusta proteiinista jäi solujen sisään sekä sitouttamisen epäonnistuminen oletettavasti liian vähäisen 2-iminobiotiinin määrän vuoksi.

Seuraavissa tuotoissa MOI-arvoa kasvatettiin, solujen hajotusta tehostettiin ja 2-iminobiotiinin määrää lisättiin. Tuotetun proteiinin määrä puhdistetussa fraktiossa ei kuitenkaan kasvanut, sillä käytetyn eluutiopuskurin pH oli liian korkea irrottaakseen avidiinin 2-iminobiotiinista. Tämä selvisi kuitenkin vasta tuottoprojektin jo päätyttyä. Ennen syyn selviämistä puhdistuksen vaiheista otettujen näytteiden perusteella 2-iminobiotiinin määrän oletettiin olevan liian alhainen, sillä 2-iminobiotiinin lisäyksestä huolimatta resiiniin sitoutumattoman tuotetun proteiinin määrä oli huomattavan suuri. Koska kaikissa puhdistuksissa käytettiin samaa resiiniä, oli todellinen syy huonoon sitoutumiseen se, että resiinin avidiinia sitovat kohdat olivat jo edellisissä puhdistuksissa täyttyneet, eivätkä väärän eluutiopuskurin pH:n vuoksi olleet vapautuneet eluoinnin yhteydessä.

Sf9-solujen tuottaman aminoterminaalisen domeenin tuottotasot olivat kuitenkin hyvät, jopa epäoptimaalisesti tuotettuna. Tämän lisäksi 2-iminobiotiiniipylvään avulla puhdistettu fraktio sisälsi hyvin puhdasta β 3Glc-T:n aminoterminaalista domeenia. Tämän asian arviointiin käytettiin väärällä pH:lla eluoitua fraktiota, joten puhdistettuun fraktioon ei todennäköisesti eluoitunut pylvästä sinne mahdollisesti sitoutuneet proteiinit, joten tulosta ei voi pitää kovin luotettavana. Oikealla puskurilla eluoituna β 3Glc-T:n aminoterminaalista domeenia olisi todennäköisesti saatu tuotettua riittävästi rakenteen määrittystä varten. Avidiinin läsnäolo tuotetussa proteiinissa olisi voinut haitata kiteytystä, joten avidiinin irrottamiseen aminoterminaalista domeenista olisi käytetty Thrombin CleanCleaveTM-kittiä (Sigma). CleanCleaveTM-kitin tuloksena muodostuneesta liuksesta olisi poistettu leikatut avidiinit todennäköisesti biotiiniipylvään avulla, jonka jälkeen aminoterminaalista domeenia sisältävä liuos olisi ollut valmis kiteytykseen.

6.2.3 8×His-puhdistuskahvaan liitetyn β 3Glc-T:n aminoterminaalisen domeenin tuotto ja puhdistus

His-puhdistuskahvaan liitettyllä β 3Glc-T:n aminoterminaalista domeenia tuottavalla bakuloviruksella tehtiin vain yksi isompi tuotto, jonka päätarkoitus oli monistaa virusta. Tuotto tehtiin hyvin pienellä MOI-arvolla, sillä myöhemmin plakkimääritykset osoittivat käytetyn viruksen tiitterin olevan oletettua alhaisempi. Monistustuotossa tuottui proteiinia, mutta tuottotasot olivat huomattavasti heikommät kuin avidiini-puhdistuskahvan sisältävää aminoterminaalista domeenia tuottavalla viruksella.

Heikosta tuotosta huolimatta tuotettu proteiini puhdistettiin solun sisältä. Solujen hajotukseen käytettiin jäädytys-lämmitys-sykliä, joka ei kuitenkaan hajottanut soluja kovin tehokkaasti, sillä solujen sisään jäi suuri määrä tuotettua proteiinia. Sonikointi olisi voinut toimia tässä vaiheessa tehokkaampana solujen hajotusmenetelmänä. Hajotuksen jälkeen ProBondTM-puhdistusjärjestelmällä tehdyn puhdistuksen todettiin puhdistavan tuotettua aminoterminaalista domeenia liuksesta, mutta samoin kuin β 3Glc-T:n puhdistuksessa lopulliseen fraktioon jäi tuotetun proteiinin lisäksi muitakin proteiineja, jotka vaatisivat lisäpuhdistuksia kiteytystä varten riittävän puhtauden saavuttamiseksi.

Puhdistusprosessissa nikkeli-kelatiini-resiiniin sitoutuksen jälkeen liukseen jäi resiiniin sitoutumatonta tuotettua proteiinia, toisin kuin β 3Glc-T:n tuotoissa. Syy pylväeseen sitoutumattoman proteiinin määrään olisi mielenkiintoista selvittää. β 3Glc-T:n puhdistamisella

solun sisältä selviäisi aiheuttaako solun sisältä puhdistaminen sitoutumattoman proteiinin määrän kasvun vai esiintyykö havaittu sitoutumisongelma ainoastaan aminoterminaalisen domeenin tuottojen yhteydessä.

Yhden tuoton perusteella ei voida tehdä kovin vahvoja päätelmiä 8×His-puhdistuskahvaan liitettyä β3Glc-T:n aminoterminaalista domeenia tuottavan viruskannan proteiinin tuottotehokkuudesta. Viruksen alhaisen tiitterin vuoksi voisi kuitenkin olla hyödyllistä luoda virus uudelleen. Toisaalta monistustuoton elatusliuoksen tiitteriä ei projektin loppumisen vuoksi tarkistettu, joten se saattaisi olla viruksen primaarivarastoliuosta korkeampi.

6.2.4 Yhteenveto β3Glc-T:n aminoterminaalisten domeenien tuotosta ja puhdistuksesta sekä näiden projektien tulevaisuuden visiot

Aminoterminaalisten domeenien tuottoon tähtäävässä projektissa valmistettiin kaksi uutta bakulovirusvektoria, joista kummankin avulla saatiin tuotetuksi aminoterminaalista domeenia. Avidiini-puhdistuskahvan sisältävää proteiinia tuottavalla viruksella saatiin aikaan kohtalaisen suuret tuotot, mutta puhdistus epäonnistui väärässä pH:ssa olevan eluointipuskurin vuoksi. Proteiinin tuottotasot hyönteissolussa olivat kuitenkin niin hyvät, että luultavasti kiteytykseen riittävä määrä proteiinia olisi saatu tuotettua oikean eluointipuskurin avulla. Ainoastaan oikealla eluointipuskurilla tehdystä proteiinituotosta lähetettiin avidiini-puhdistuskahvaan liittynyt aminoterminaalista domeenia sisältävä puhdistettu fraktio kiteytettäväksi, mutta kiteytys ei onnistunut. His-puhdistuskahvan sisältävää proteiinia tuottavalla viruksella ehdittiin tekemään vain yksi tuotto, jonka perusteella oikeankokoisen proteiinin todettiin tuottuvan, mutta tuottotasot eivät olleet hyvät. Suurimpana syynä tähän pidettiin liian alhaista MOI-arvoa hyönteissolujen infektoinnissa.

Mikäli projektia olisi jatkettu, olisi avidiinipuhdistuskahvaan liitettyä aminoterminaalista domeenia tuottavalla viruksella tehty iso tuotto, jonka jokaisesta puhdistuksen vaiheesta olisi otettu näytteet. Näiden näytteiden perusteella olisi päätelty, tuleeko solujen hajotusta yhä tehostaa ja sitoutuuko suurin osa tuotetusta proteiinista nyt 2-iminobiotiiniresiiniin. Puhdistuksen jälkeen tulosfraktiot, jotka sisältävät eniten tuotettua proteiinia, olisi käsitelty CleanCleave™-pakilla. Tämän käsittelyn jälkeen avidiini olisi poistettu muodostuneesta liuoksesta todennäköisesti biotiiniin perustuvalla puhdistuksella ja muodostunut liuos lähetetty kiteytettäväksi.

His-puhdistuskahvaan liitetyn aminoterminaalisen domeenin tuotto olisi todennäköisesti jäänyt hieman taka-alalle, sillä avidiiniin sidotun aminoterminaalisen domeenin tuotot ja puhdistukset vaikuttivat huomattavasti lupaavimmilta aminoterminaalisen domeenin rakenteen määrittämistä varten. Jos His-puhdistuskahvaan liitetyn aminoterminaalisen domeenin tuottoa olisi kuitenkin jatkettu, olisi seuraava vaihe ollut monistustuotossa muodostuneen elatusliuoksen tiitterin tarkistus. Mikäli tiitteri tässäkin liuoksessa olisi ollut yhtä alhainen kuin primaarivarastossa, olisi virus todennäköisesti luotu uudelleen. Jos proteiinin tuotto vanhalla tai uudella viruksella olisi onnistunut, olisi aminoterminaalista domeenia yritetty puhdistaa sekä elatusliuoksesta että solujen sisältä. ProBondTM-puhdistusjärjestelmän lisäksi olisi todennäköisesti jouduttu käyttämään lisäpuhdistuksia, jotta proteiiniliuos olisi saatu riittävän puhtaaksi kiteytystä varten.

6.3 Tuntemattomasta proteiinista β 3Glc-T:ksi

Pro gradu -työssä eräänä tavoitteena oli tuottaa uutta proteiinia, jonka mRNA-tasojen oli ohutsuolen epiteelisoluissa havaittu muuttuvan TGF- β -kasvutekijän vaikutuksesta. Sekvenssivertailujen perusteella tämän proteiinin oletettiin olevan β 1,3-glykosyyli transferaasi, jonka ennustettiin sijaitsevan kiinnittyneenä Golgin kalvorakenteisiin useiden muiden glykosyyli transferaasien tavoin. Tuotettavan proteiinin mRNA:n oli osoitettu ilmentyvän monissa kudoksissa ja mahdollisia ortologeja olevan useissa eri lajeista, joten proteiinilla voitiin olettaa olevan perustavanlaatuinen tehtävä monisoluisissa eliöissä.

Tuotettua ja puhdistettua proteiinia oli tarkoitus käyttää entsyymaattisen aktiivisuuden selvitykseen, vasta-aineiden testaukseen ja rakenteen määrittämiseen. Testattujen ja toimivien vasta-aineiden avulla oli tarkoitus määrittää proteiinin sijainti solun sisässä sekä sen ilmentymistä kudoksissa. Tuotetun proteiinin käyttötarkoituksista kaksi ensin mainittua kuitenkin menettivät pääasiällisen merkityksensä, sillä *pro gradu* -työn aikana kaksi ryhmää julkaisivat artikkelit, joissa tuotettava proteiini vahvistettiin todella β 1,3-glykosyyli transferaasiksi ja sen entsyymaattiseksi aktiivisuudeksi kokeellisesti osoitettiin UDP-glukoosin liittäminen TSR-domeeneihin liittyneisiin fukooseihin. Entsyymaattisen aktiivisuuden lisäksi julkaisuissa esitettiin tämän aktiivisuutensa mukaan ”UDP-glukoosi: fukoosi β 1,3-glukosyyli transferaasiksi” eli β 3Glc-T:ksi nimetyn proteiinin sijaitsevan solulimakalvostossa kalvoon sitoutumattomana entsyyminä, ei suinkaan Golgin membraaniproteiinina, kuten aiemmin oli ennustettu.

Entsyyminen aktiivisuuden lisäksi työn aikana julkaistiin artikkeli, jossa synnyntäisen Peters' plus -oireyhtymän osoitettiin aiheutuvan pistemutaatioista β 3Glc-T:n geenissä. Tätä oireyhtymää sairastavien henkilöiden hyvin erityyppiset monissa kudoksissa ilmenevät epämuodostumat ja kehityksen häiriöt vahvistivat käsitystä β 3Glc-T:n olennaisesta roolista monien kudosten kehityksessä.

Vasta edellä mainittujen artikkeleiden myötä käsitys β 3Glc-T:n tehtävästä ja merkityksestä yksilölle alkoi avautua, mutta edelleen β 3Glc-T:n säätelemät toiminnot Glc β 1,3Fuc-O-Ser/Thr-sokeroinnin välityksellä ovat selvittämättä. Tähän selvitystyöhön β 3Glc-T:n tai edes sen aminoterminaalisen domeenin rakenne olisivat voineet antaa merkittävää lisätietoa. Myös tulevaisuudessa β 3Glc-T:n määritetylle rakenteelle olisi todennäköisesti käyttöä erityisesti, jos β 3Glc-T:n rooli osoittautuu yhtä merkittäväksi solujen välisessä viestinnässä kuin sekvenssiltään ja entsyymiaktiivisuudeltaan samankaltaisen Notch-signaalointia säätelevän Fringen.

7 Johtopäätökset

Bakulovirus-hyönteissolu-tuottojärjestelmä soveltuu sekä täysimittaisen β 3Glc-T:n että β 3Glc-T:n aminoterminaalisen domeenin tuottoon. Optimointikokeiden perusteella β 3Glc-T:n tuotto kannattaa tehdä +28 °C:n lämpötilassa kasvatetuilla High Five™ –soluviljelmillä, jotka infektoidaan solutiheyden ollessa noin 700 solua ml:ssa, ja kerätä kolmantena päivänä infektoinnista. Oikean laskostumisen varmistamiseksi β 3Glc-T on hyvä ohjata erityisreitit kautta elatusliuokseen, mutta työssä havaittiin erityisreitille ohjauksesta huolimatta suurimman osan tuotetusta proteiinista jäävän solun sisään. Tämän perusteella suuremman β 3Glc-T:n tuoton saavuttamiseksi puhdistusta kannattaisi kokeilla solujen sisältä, vaikka tällöin kiteytystä mahdollisesti haittaavien β 3Glc-T:n eri muokkausasteiden määrä puhdistetussa liuoksessa kasvaisi.

Puhdistusmenetelmänä β 3Glc-T:lle testattiin vain nikkeli-resiinipylvästä. Tämän puhdistusmenetelmän avulla konsentroidusta elatusliuoksesta saatiin aikaan fraktio, jonka proteiineista noin 70 % oli β 3Glc-T:a. Tämä puhtaustaso riittää entsymaattisen aktiivisuuden määrittelyyn ja vasta-aineiden testaukseen, mutta rakennemääritystä varten ainakin yksi lisäpuhdistus olisi tarpeellinen

Paikkakohtaiseen transpositioon perustuvan bakulovirusluontimenetelmän avulla valmistettiin kaksi uutta bakuloviruskantaa, joiden avulla saatiin aikaan hyönteissoluissa histidiini- ja avidiini-puhdistuskahvaan liitetyn β 3Glc-T:n aminoterminaalisen domeenin tuotto. Avd-kahvaista proteiinia tuottavalla viruksella saatiin aikaan hyvä tuottotaso, mutta puhdistusprosessissa käytetyn virheellisen liuoksen vuoksi proteiini jäi puhdistuspylvääseen. Oikeita liuoksia käyttämällä olisi hyvin todennäköistä saada aikaan kiteytykseen tarvittava määrä puhdasta proteiinia. Heikon His-puhdistuskahvaisen proteiinin tuoton ja molempien proteiinien puhdistusvaiheiden ongelmien vuoksi puhdistusmenetelmien välisen vertailun tekemiseen ei saatu riittävän tasavertaista aineistoa.

Tutkimustyössä saatiin tuotettua runsaasti sekä täysimittaista β 3Glc-T:a että β 3Glc-T:n aminoterminaalista domeenia, mutta puhdistusprosesseissa esiintyneiden ongelmien takia kumpaakaan näistä ei tämän tutkimuksen puitteissa onnistuttu tuottamaan kiteytykseen vaadittavaa määrää. Tuotetun proteiinin käyttökohteista tutkimuksen aikana muut tutkimusryhmät julkaisivat β 3Glc-T:n entsymaattisen aktiivisuuden ja sijainnin solussa, mutta rakenteen määrittäminen säilyi relevanttina tavoitteena koko projektin ajan, eikä β 3Glc-T:n tai sen domeenien rakennetta ole vielä julkaistu.

8 Lähdeluettelo

- Altmann F, Staudacher E, Wilson I, März L. Insect cells as host for the expression of recombinant glycoproteins. *Glycoconjugate Journal* 1999;16;109-123
- Baneyx F. Protein expression technologies, current status and future trends. *Horizon Bioscience*, 2004, pp 101 pp 427-460 pp.387-425
- Breton C, Mucha J, Jeanneau C. Structural and functional features of glycosyltransferases. *Biochimie* 2001; 83; 713-718
- Breton C, Snajdrova L, Jeanneau C, Koca J, Imberty A. Structures and mechanisms of glycosyltransferases. *Glycobiology* 2006; 16: 29-37
- Chen M, Liu X, Wang Z, Song J, Qi Q, Wang P. Modification of Plant N-glycans Processing: The Future of Producing Therapeutic Protein by Transgenic Plants. *Medicinal Research Reviews* 2005; 25:343-360
- Collin P, Mäki M. *Gastroenterologia* 2005;
http://www.terveysportti.fi/terveysportti/ekirjat_tmp.Naytaartikkeli?p_artikkeli=gas00042
- Fischer R, Emans N. Molecular farming of pharmaceutical proteins. *Transgenic Research* 2000;9: 279-299
- Gellissen G. *Production of Recombinant Proteins*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co, 2005, pp.1-11 ja 233-250.
- Glick B, Pasternak J. *Molecular biotechnology: principles and applications of recombinant DNA*. ASM Press, 2003, pp163-187
- Grabenhorst E, Schlenke P, Pohl S, Nimtz M, Conradt H. Genetic engineering of recombinant glycoproteins and the glycosylation pathway in mammalian host cells. *Glycoconjugate Journal* 1999;16;81-97
- Halttunen T, Marttinen A, Rantala I, Kainulainen H Mäki M. Fibroblasts and transforming growth factor β induce organization and differentiation of T84 human epithelial cells. *Gastroenterology* 1996; 111: 1252-1262
- Heinonen T & Mäki M. Peters'-plus syndrome is a congenital disorder of glycosylation caused by a defect in the β 1,3-glycosyltransferase that modifies thrombospondin type 1 repeats. *Käsikirjoitus*
- Heinonen T, Pasternack L, Lindfors K, Breton C, Gastinel LN, Mäki M, Kainulainen H A. novel human glycosyltransferase: primary structure and characterization of the gene and transcripts. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 309: 166-174
- Heinonen T, Pelto-Huikko M, Pasternack L, Mäki M, Kainulainen H. Murine Ortholog of Novel Glycosyltransferase, B3GTL: Primary Structure, Characterization of the Gene and Transcripts, and Expression in Tissues. *DNA and Cell Biology* 2006;25;465-474

- Hellwig S, Drossard J, Twyman R, Fischer R. Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. *Nature biotechnology* 2004; 22:1415-1422
- Hennekam R, van Schooneveld M, Ardingier H, Van Den Boogaard M, Friedburg D, Rudnik-Schoneborn S, Seguin J, Weatherstone K, Wittebol-Post D, Meinecke P. The Peters'-Plus syndrome: description of 16 patients and review of the literature. *Clinical Dysmorphology* 1993; 2;283-300
- Hess D, Kesch J, Lesnik Oberstein S, Hennekam R, Hofsteenge J. Peters Plus Syndrome Is a New Congenital Disorder of Glycosylation and Involves Defective O-Glycosylation of Thrombospondin Type 1 Repeats. *Journal of biological chemistry* 2008; 283; 7354-7360
- Hofsteenge J, Huwiler K, Macek B, Hess D, Lawler J, Mosher D, Katalinic J. C-Mannosylation and O-Fucosylation of the Thrombospondin Type 1 Module. *The Journal of Biological Chemistry* 2001; 276; 6485-6498
- Ikonomou L, Schneider Y, Agathos S. Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2003;62;1-20
- Invitrogen. Bac-to-Bac Baculovirus Expression System. 2004.http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/bactobac_man.pdf
- Invitrogen. Guide to Baculovirus Expression Vector Systems(BEVS) and Insect Cell Culture Techniques 2002. <http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/bevtest.pdf> (a)
- Invitrogen.Growth and Maintenance of Insect Cell Lines. 2002 http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/insect_man.pdf (b)
- Jarvis J. Developing baculovirus-insect cell expression systems for humanized recombinant glycoprotein production. *Virology* 2003;310; 1-7
- Jehle J, Blissard G, Bonning B, Cory J, Herniou E, Rohrmann G, Theilmann D, Thiem S, Vlaskovits J. On the classification and nomenclature of baculoviruses: A proposal for revision. *Archives of Virology* 2006;151; 1257-1266
- Kalmakoff J.& Ward V. Baculoviruses. <http://www.microbiologybytes.com/virology/kalmakoff/baculo/baculo.html> 2003 päivitetty 2007
- Kitts PA & Possee R. A method for producing recombinant baculovirus expression vectors at high frequency. *BioTechniques* 1993;14;810-817
- Kitts PA, Ayres MD Possee RD. Linearization of baculovirus DNA enhances the recovery of recombinant virus expression vectors. *Nucleic Acids Research* 1990; 18;5667-5672
- Kost T, Condreay J, Jarvis D. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nature Biotechnology* 2005; 23; 567-575

Kozma K, Keusch J, Hegemann B, Luther K, Klein D, Hess D, Haltiwanger R, Hofsteenge J. Identification and Characterization of a β 1,3-Glucosyltransferase That Synthesizes the Glc- β 1,3-Fuc Disaccharide on Thrombospondin Type 1 Repeats. *The Journal of Biological Chemistry* 2006;281;36742-36751

Lesnik Oberstein S, Kriek M, White S, Kalf M, Szuhai K, den Dunnen J, Breuning M, Hennekam C. Peters Plus Syndrome Is Caused by Mutations in B3GALTL, a Putative Glycosyltransferase. *The American Journal of Human Genetics* 2006; 79: 562-566

Lindfors K, Halttunen T, Huotari P, Nupponen N, Vihinen M, Visakorpi T, Mäki M, Kainulainen H. Identification of novel transcription factor-like gene from human intestinal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 276: 660-666

Luckow V, Lee S, Barry G, Olins P. Efficient Generation of Infectious Recombinant Baculovirus by Site-Specific Transposon-Mediated Insertion of Foreign Genes into a Baculovirus Genome Propagated in *Escherichia coli*. *Journal of virology* 1993;67;4566-4579

Luo Y, Nita-Lazar A, Haltiwanger R. Two Distinct Pathways for O-Fucosylation of Epidermal Growth Factor-like or Thrombospondin Type 1 Repeats. *The Journal of Biological Chemistry* 2006; 281; 9385-9392.

Majumder K. Ligation free gene synthesis by PCR:synthesis and mutagenesis at multiple loci of a chimeric gene encoding OmpA signal peptide and hirudin. *Gene* 1992;110;89-94

Maras M, Die I, Contreras R, Van den Hondel C. Filamentous fungi as production organisms for glycoproteins of bio-medical interest. *Glycoconjugate Journal* 1999;16:99-107

Matilainen H. Development of baculovirus display strategies towards targeting to tumor vasculature. *Väitöskirja Jyväskylän yliopisto* 2006

McCarroll L & King L. Stable insect cell cultures for recombinant protein production. *Current Opinion in Biotechnology* 1997; 8;590-594

Moloney D, Haltiwanger R. The O-linked fucose glycosylation pathway: identification and characterization of a uridine diphosphoglucose:fucose- β 1,3-glucosyltransferase activity from Chinese Hamster ovary cells. *Glycobiology* 1999; 9; 679-687

Moloney D, Panin V, Johnston S, Chen J, Shao L, Wilson R, Wang Y, Stanley P, Irvine K, Haltiwanger R, Vogt T. Fringe is glycosyltransferase that modifies Notch. *Nature* 2000; 406; 369-375

Nevalainen H, Te'o V, Bergquist P. Heterologous protein expression in filamentous fungi. *TRENDS in Biotechnology* 2005; 23(9): 468-474

Okano K, Vanarsdall A, Mikhailov V, Rohrmann G. Conserved molecular systems of the Baculoviridae. *Virology* 2006;344;77-87

QIAprep® Miniprep Handbook, 2006

<http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/literature.aspx?id=1000248>

Sato T, Sato M, Kiyohara K, Sogabe M, Shikanai T, Kikuchi N, Togayachi A, Ishida H, Ito H, Kameyama A, Gotoh M, Narimatsu H. Molecular Cloning and Characterization of Novel Human β 1,3-Glucosyltransferase, β 3Glc-T, Which is Localized at the Endoplasmic Reticulum and Glucosylates O-linked Fucosylglycan on Thrombospondin Type 1 Repeat Domain. *Glycobiology*. 2006;16;1194-1206

Shao L, Haltiwanger R. O-fucose modifications of epidermal growth factor-like repeats and thrombospondin type 1 repeats: unusual modifications in unusual places. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2003; 60;241-250

Smith G, Fraser M, Summers M. Molecular engineering of the *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus Genome: Deletion Mutations Within the Polyhedrin Gene. *Journal of Virology* 1983;46;584-593

Smith G, Fraser M, Summers M. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Molecular and cellular biology* 1983;3;2156-2165

Szewczyk B, Hoyos-Carvajal L, Paluszek M, Skrzecz I, Lobo de Souza M. Baculoviruses –re-emerging biopesticides. *Biotechnology Advances* 2006;24;143-160

Taha A, Giannotti J, Léry X, Ravalec M, Abol-ELA S. Host range of the *Autographa californica* multicapsid nuclear polyhedrosis virus (AcMNPV) in relation to granulosis viruses susceptible lepidopteran species in Egypt. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 1995;5;127-130

Tucker R. The thrombospondin type 1 repeat superfamily. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2004; 36; 969-974.

Van den Hombergh, J, van de Vondervoort, P, Fraissinet-Tachet L, Visser J. Aspergillus as a host for heterologous protein production: the problem of proteases. *Trends in Biotechnology* 1997;146:256-263

Watson C. Viral activity in the infected cell.
<http://athena.bioc.uvic.ca/bioDoc/baculoviridae/infected> 2005

Wenniger-Prick L & Hennekam R. The Peters' plus syndrome: a review. *Annale de génétique* 2002; 45; 97-103

Zuidema D, Schouten A, Usmany M, Maule AJ, Belsham GJ, Roosien J. Expression of cauliflower mosaic virus gene I in insect cells using a novel polyhedrin-based baculovirus expression vector. *Journal of General Virology* 1990;71;2201-2209

LIITE 1. His-insertin rakenne.

5'

Paikka	Nimi	Sekvenssi	Tarkoitus
1-3	3 ylimääräistä nukleotidia	cgc	Helpottaa katkaisueksyymien sitoutumista.
4-9	BamHI:n leikkauskohta	ggatcc	Tarjoaa BamHI-katkaisueksyymille tämän tunnistaman leikkauskohdan (5'-g'gatcc-3'). Tarvitaan liitettäessä insertti samalla katkaisueksyymillä käsitellyyn FastBac1-siirtovektoriin.
10-72	Melittiini-ohjaussignaali	atgaagttcctggtgaacgtggct ctggtgttcatggtggtgacatct cctacatctacgct	Ohjaa valmistuvan peptidin eritysureille, leikataan pois valmiista proteiineista.
73-81	3AH:a ohjaussignaalin jälkeen	gaccgttg	Varmistaa signaalipeptidin katkaisueksyymien sitoutuminen peptidiin (ei tod.näk. välttämätön osa).
82-105	Histiiniinimotiivi	caccaccatcaccaccatcaccac	Muodostaa proteiinin tunnistukseen ja puhdistukseen käytettävän histidiinipuhdistuskahvan.
106-123	Trombiinin leikkauskohta	ctggtgccccgtggttcc	Muodostaa tuotetussa peptidissä proteiinin katkaisueksyymi trombiinin tunnistaman aminohapposekvenssin. Tarvitaan irrottamaan histidiinikahva tuotetusta proteiineista.
124-759	Aminoterminaalinen domeeni	tctgaagatacaagaagaaggtca agcagttctcaggatttggagaaaag tggatatcaaggaaaatgacata gacttaaaaggaattgtattcgtca tccagagtcagaataattcttttca tgcaagagagcagagcagttaaa aaaagcatcttaagcaggctgcag atcttacacaggagctccccagtg cctcctccttcacagctggctaaa caagaaggtgcatggaccatacttc cgttggtaccgcactttctgtaac atatagcagaatttcatcttgatt ttcttctgtgaagaagacaagaa tacagattccaaaactctggaaac cctcagaagatgacccctctaag gaatggtttttggaaaagcattac atgatgaagaagctacaataattca ccattatgcctttccgagaatcct acagtttttaagtatccagactttg ctgcaggctggccttaagtattcc acttgtaacaagcttaccagaga ctaaagagtgaatccttgaatccg actttacaatagatttaaacatga gattgccctctacatctggacaaa ggcggaggacctccccgacccag tgctgagttt	Muodostaa tuotettavan proteiinin.
760-762	Lopetuskodoni	taa	Lopettaa geenin luennan tähän kohtaan.
763-768	KpnI:n leikkauskohta	ggtagc	Tarjoaa KpnI-katkaisueksyymille tämän tunnistaman leikkauskohdan (5'-ggtagc-3'). Tarvitaan liitettäessä insertti samalla katkaisueksyymillä käsitellyyn FastBac1-siirtovektoriin.
769-771	3 ylimääräistä nukleotidia	gcg	Helpottaa katkaisueksyymien sitoutumista.

3'

LIITE 2. Avd-insertin rakenne.

5'

Paikka	Nimi	Sekvenssi	Tarkoitus
1-3	3 ylimääräistä nukleotidia	cgc	Helpottaa katkaisuelementin sitoutumista.
4-9	BamHI:n leikkauskohta	ggatcc	Tarjoaa BamHI-katkaisuelementille tämän tunnistaman leikkauskohdan (5'-g'gatcc-3'). Tarvitaan liitettäessä insertti samalla katkaisuelementillä käsiteltyyn FastBac1-siirtovektoriin.
10-465	Avidiini	atggtgcacgcaacctccccgctgc tgctgctgctgctgctcagcctggc tctggtggtccccggcctctctgcc agaaagtgctcgctgactggaaat ggaccaacgatctggctccaacat gaccatcgggctgtgaacagcaga ggtgaattcacaggcacctacatca cagccgtaacagccacatcaaatga gatcaaagagtcaccactgcatggg acacaaaacacatcaacaagagga cccagcccacctttggttcaccgt caattggaagtttcagagtcacc actgtcttcacggccagtgtctca tagacaggaatgggaagggtcct gaagaccatgtggctgctgctgca agtgttaatgacattggtgatgact gaaagctaccaggtcgcatcaa catcttcactcgctgcgcacacag aaggag	Muodostaa proteiinin tunnustukseen ja puhdistukseen käytettävän avidiinipuhdistuskahvan. Ohjaa valmistuvan peptidin eritysureille.
466-483	Linkkerialue	ggcgggtccggtggctcc	Antaa avidiinille ja aminoterminaalille domeenille tilaa laskostua ja liikkua toisistaan huolimatta.
484-501	Trombiinin leikkauskohta	ctggtgccccgtggtcc	Muodostaa tuotetussa peptidissä proteiinin katkaisuelementin trombiinin tunnistaman aminohaposekvenssin. Tarvitaan irrottamaan avidiini- ja trombiinista.
502-1137	Aminoterminaalinen domeeni	atggtgcacgcaacctccccgctgc tgctgctgctgctgctcagcctggc tctggtggtccccggcctctctgcc agaaagtgctcgctgactggaaat ggaccaacgatctggctccaacat gaccatcgggctgtgaacagcaga ggtgaattcacaggcacctacatca cagccgtaacagccacatcaaatga gatcaaagagtcaccactgcatggg acacaaaacacatcaacaagagga cccagcccacctttggttcaccgt caattggaagtttcagagtcacc actgtcttcacggccagtgtctca tagacaggaatgggaagggtcct gaagaccatgtggctgctgctgca agtgttaatgacattggtgatgact gaaagctaccaggtcgcatcaa catcttcactcgctgcgcacacag aaggag	Muodostaa tuotettavan proteiinin.
1138-1140	Lopetuskodoni	taa	Lopettaa geenin luennan tähän kohtaan.
1141-1146	KpnI:n leikkauskohta	ggtacc	Tarjoaa KpnI-katkaisuelementille tämän tunnistaman leikkauskohdan (5'-ggtacc-3'). Tarvitaan liitettäessä insertti samalla katkaisuelementillä käsiteltyyn FastBac1-siirtovektoriin.
1147-1149	3 ylimääräistä nukleotidia	gcg	Helpottaa katkaisuelementin sitoutumista.

3'