



TEKNIikka JA LIIKENNE

Laboratorioalan koulutusohjelma

OPINNÄYTETYÖ

**IHMISEN NEUTRAALIN α -MANNOSIDAASIN TUOTTAMINEN
LEISHMANIA TARENTOLAE -ALKUELÄIMESSÄ**

**Työn tekijä: Sanna Sihvo
Työn ohjaajat: Arja Miettinen-
Oinonen
Pirkko Heikinheimo**

Työ hyväksytty: ____ . ____ . 2010

**Arja Miettinen-Oinonen
yliopettaja**



ALKULAUSE

Tämä opinnäytetyö tehtiin Helsingin yliopiston Biotekniikan instituutissa, rakennebiologian tutkimusohjelmassa.

Haluan kiittää professori Pirkko Heikinheimoa mahdollisuudesta suorittaa työharjoittelu ja opinnäytetyö hänen tutkimusryhmässään sekä Chiara Bruckmannia, Heidi Repoa ja Johanna Trobergia selkeästä ohjauksesta työharjoitteluni aikana. Lisäksi haluan kiittää yliopettaja Arja Miettinen-Oinosta opinnäytetyöhön liittyvistä neuvoista ja ohjeista kirjoitusprosessin aikana.

Vantaalla 12.10.2010

Sanna Sihvo

TIIVISTELMÄ

Työn tekijä: Sanna Sihvo	
Työn nimi: Ihmisen neutraalin α -mannosidaasin tuottaminen <i>Leishmania tarentolae</i> -alkueläimessä	
Päivämäärä: 12.10.2010	Sivumäärä: 42 s.
Koulutusohjelma: Laboratorioala	
Työn ohjaaja: Yliopettaja Arja Miettinen-Oinonen	
Työn ohjaaja: Professori Pirkko Heikinheimo	
<p>Tässä opinnäytetyössä oli tarkoitus tuottaa glykosidihydrolaaseihin kuuluvaa ihmisen neutraalia α-mannosidaasia (NAM) <i>Leishmania tarentolae</i> -alkueläimessä myöhemmin tehtävää proteiinipuhdistusta, kiteytystä ja edelleen rakennetutkimusta varten.</p> <p>Työssä käytettiin LEXSY-tuottomenetelmää, joka perustuu rekombinanttiproteiinien tuottoon ihmiselle vaarattomassa alkueläimessä, liskojen parasiitissa, <i>Leishmania tarentolae</i>-essa. <i>Leishmania tarentolae</i>-soluissa oli tarkoitus tuottaa sekä erittyvää että solunsisäistä ihmisen NAM:a, jonka kolmiulotteista rakennetta ei vielä tunneta. NAM kuuluu glykosidihydrolaaseihin, joilla on tärkeä merkitys väärin laskostuneiden proteiinien sokeriosien hajottamisessa.</p> <p>Aikaisemman laboratoriotyön aikana oli kloonattu ihmisen NAM-geeni ekspressiovektoreihin PCR-reaktioilla. Tämä työ alkoi <i>Escherichia coli</i>-transformaatiolla, jossa tuotettiin erittyvää ja solunsisäistä proteiinituottoa varten kloonattuja ekspressiovektoreita sisältävää DNA:ta. Tämän jälkeen DNA:t puhdistettiin ja digestoitettiin, jotta <i>E. colissa</i> tuottoon tarvittava osa saatiin poistettua. Digestoidut DNA:t konsentroitettiin etanolisaostuksella ennen <i>Leishmania tarentolae</i>-solujen transfektioita, jotka suoritettiin elektroporaatiolla.</p> <p>Transfektion jälkeen seurattiin erittyvän ja solunsisäisen NAM:n aktiivisuuksia solukasvatuksissa aktiivisuusmittauksilla. Solunsisäinen NAM tuottui aktiivisena mutta erittyvän NAM:in aktiivisuus laski nopeasti eikä sen pidempiaikainen tuotto siis onnistunut. Myöhemmin tehtävää proteiinipuhdistusta varten optimoitiin myös soluhajotusta, jolla solunsisäinen NAM-proteiini saataisiin vapautettua tehokkaasti solujen kasvatusliuokseen.</p> <p>Tämän työn jälkeen solunsisäistä NAM:ia tuotettiin lisää tilavuudeltaan suuremmissa solukasvatuksissa ja kokeiltiin eri menetelmiä sen puhdistamiseksi.</p>	
Avainsanat: Neutraali α -mannosidaasi, <i>Leishmania tarentolae</i> , LEXSY	

ABSTRACT

Name: Sanna Sihvo	
Title: Expression of human neutral α -mannosidase in protozoan <i>Leishmania tarentolae</i>	
Date: 12.10.2010	Number of pages: 42
Department: Laboratory sciences	
Instructor: Arja Miettinen-Oinonen, Ph. D	
Supervisor: Pirkko Heikinheimo, Professor	
<p>The aim of this graduate study was to express human neutral α-mannosidase (NAM), which belongs to glycosyl hydrolases, in protozoan <i>Leishmania tarentolae</i> for further protein purification, crystallization and structural research.</p> <p>In this study, LEXSY-expression system was used. It is based on recombinant protein expression in non-pathogenic, lizard parasite <i>Leishmania tarentolae</i>. The objective was to express both soluble and intracellular human NAM, the 3D-structure of which is not known yet. NAM belongs to glycosyl hydrolases which play important roles in hydrolyzation of glycan structures in misfolded proteins.</p> <p>During earlier laboratory research, the expression vectors containing the gene encoding human NAM were cloned in PCR-reactions. This research project began with the transformation of <i>Escherichia coli</i> where DNAs containing the cloned expression vectors for secretory and intracellular protein expression were produced. After this, DNAs were purified and digested to get rid of <i>E. coli</i>-fragments in expression vectors, which were only for DNA production in <i>E. coli</i>. Digested DNAs were concentrated by ethanol precipitation before <i>Leishmania tarentolae</i>-cells were transfected by electroporation.</p> <p>The activities of secreted and intracellular NAM in cell cultures were followed by activity assays. The intracellular NAM expressed in an active form but the activity of soluble NAM reduced quickly and thus a longer expression of it did not work. The optimization of cell lysis was also done for protein purification so that the intracellular protein could be released efficiently to the growth medium of cells.</p> <p>After this study the intracellular NAM was expressed in cell cultures of larger volumes and some methods were also tested in purification of intracellular NAM.</p>	
Keywords: Neutral α -mannosidase, <i>Leishmania tarentolae</i> , LEXSY	

SISÄLLYS

ALKULAUSE

TIIVISTELMÄ

ABSTRACT

1	JOHDANTO	1
2	KIRJALLISUUSKATSAUS	2
2.1	Rekombinanttiproteiinien tuotto	2
2.1.1	<i>Geenin ilmentäminen ja proteiinin signaalisekvenssi</i>	2
2.1.2	<i>Translaation jälkeiset muokkaukset</i>	3
2.1.3	<i>Tuottomenetelmän valinta</i>	4
2.1.4	<i>Tuottoisännät</i>	5
2.2	Proteiinien sokerointi ja väärin laskostuneet proteiinit	8
2.2.1	<i>Glykosidihydrolaasit</i>	9
2.2.2	<i>Alfa-mannosidaasit</i>	9
2.2.3	<i>Neutraali α-mannosidaasi</i>	11
2.3	<i>Leishmania</i> -suku	12
2.3.1	<i>Leishmanian elinkaari</i>	13
2.3.2	<i>Leishmaniaasi</i>	14
2.3.3	<i>Leishmania tarentolae</i>	14
2.4	LEXSY-tuottomenetelmä	15
2.4.1	<i>Leishmania tarentolae -solujen kasvatus</i>	15
2.4.2	<i>Ekspressiovektori</i>	15
2.4.3	<i>Transfektio ja selektio</i>	17
2.4.4	<i>Translaation jälkeiset muokkaukset LEXSY:llä tuotetuissa proteiineissa</i>	17
3	TYÖN SUORITUS	19
3.1	<i>Leishmania tarentolae</i> -solujen kasvatus	19
3.2	Neutraalin α-mannosidaasi -geenin liittäminen ekspressiovektoriin	19
3.3	<i>Escherichia coli</i> -transformaatio	20
3.4	Plasmidi-DNA:n eristäminen ja puhdistaminen	21
3.5	DNA-näytteiden digestio ja konsentrointi etanolisaostuksella	21
3.6	Agaroosigeelielektroforeesi	23
3.7	<i>Leishmania tarentolae</i> -solujen transfektio	24
3.8	Aktiivisuusmittaukset	25
3.9	Soluhajotuksen optimointi	27
3.10	<i>Leishmania tarentolae</i> -tuottokantojen säilöminen	28

4	TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU	29
4.1	<i>Escherichia coli</i> ssa tuotettujen plasmidi-DNA-näytteiden karakterisointi	29
4.2	Swal-digestioiden onnistumisen tarkistus agarosigeelielektroforeesilla	30
4.3	<i>Leishmania tarentolae</i> -solujen transfektio	31
4.4	NAM-proteiinituoton seuraaminen aktiivisuusmittauksilla	32
4.5	<i>Leishmania tarentolae</i> -soluhajotuksen optimointi	36
5	YHTEENVETO	38
	VIITELUETTELO	40

1 JOHDANTO

Eukaryoottisia rekombinanttiproteiineja on perinteisesti tuotettu bakteereissa, mutta haittapuolena ovat translaation jälkeisten muokkauksien puuttuminen toisin kuin eukaryoottisolulla tapahtuvassa proteiinituotossa. *Leishmania tarentolae* on eukaryooteihin kuuluva alkueläin. Se on liskojen parasiitti ja vaaraton ihmiselle. Uuden Leishmania Expression System (LEXSY, Jena Bioscience) -tuottomenetelmän avulla voidaan tuottaa rekombinanttiproteiineja, joissa toteutuvat myös translaation jälkeiset muokkaukset, ja soluja voidaan käsitellä samalla tavalla kuten bakteereja.

Neutraali α -mannosidaasi on soluliman entsyymi, joka hajottaa hiilihyaattien välisiä glykosididoksia. Sen kolmiulotteista rakennetta ei ole vielä selvitetty. Kolmiulotteisen rakenteen selvittäminen olisi tärkeää, koska neutraalilla α -mannosidaasilla saattaa olla yhteys perinnölliseen sairauteen, alfa-mannosidoosiin.

Tämän opinnäytetyön tavoitteena on tuottaa ihmisen neutraalia α -mannosidaasia *Leishmania tarentolae* -alkueläimessä LEXSY-tuottomenetelmällä sekä erityyvästi että solunsisäisesti myöhemmin tehtävää proteiinipuhdistusta, kiteytystä sekä rakennetutkimusta varten.

2 KIRJALLISUUSKATSAUS

2.1 Rekombinanttiproteiinien tuotto

Rekombinanttiproteiinien tuottaminen on tärkeä osa nykypäivän molekyyli-biologiaa ja biotekniikkaa. Rekombinanttiproteiini on proteiini, joka on tuotettu vieraassa isännässä. Näitä proteiineja tuotetaan liittämällä kyseistä proteiinia koodaava geeni sopivaan kantaja-DNA-molekyyliin eli vektoriin, joka ilmentää geeniä tehokkaasti proteiinituottoon valitussa isäntäsolussa. Rekombinanttiproteiineja tuotetaan bakteereissa, hiivoissa, hyönteissoluissa ja nisäkässoluissa sekä myös transgeenisissä eläimissä ja kasveissa. Taloudellisesti merkittävimpiä bakteri- ja soluviljelmissä tuotettuja proteiineja ovat lääketieteelliseen ja teolliseen tarkoitukseen tuotetut proteiinit. [1.]

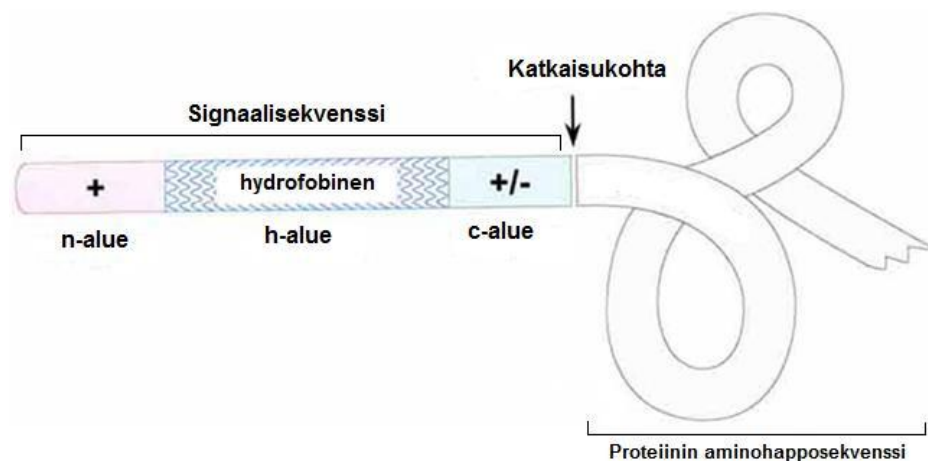
2.1.1 *Geenin ilmentäminen ja proteiinin signaalisekvenssi*

Geenin tuote eli proteiini on useimmiten haluttu tutkimuskohde. Koska proteiineja ilmennetään normaalisti eri solutyypeissä vain vähän ja vain tietyissä solun kasvuvaiheissa, on tutkimusta varten proteiineja ylituotettava. Kun ylituotossa tietyt edellytykset täyttyvät, isäntäsoluun siirretty geeni ilmentyy ja tuottaa lopulta haluttua proteiinia. [2, s. 51.]

Geenin ilmentämisen säätely on tärkeä mekanismi kaikille soluille niin kehityksen, homeostaasin kuin ympäristöön sopeutumisenkin kannalta. Eukaryooteilla jokainen geenin ilmentämisen vaiheista on taipuvainen dynaamiselle säätelylle, joka sisältää kromatiinin rakenteelliset muutokset, DNA:n transkription RNA:ksi, transkriptin käsittelyn ja sen kuljettamisen sytoplasmaan sekä lähetti-RNA:n translaation proteiiniksi. [3, s. 1.]

Signaalisekvenssit ovat tyypillisiä esimerkiksi eritettävälle proteiineille ja kalvoproteiineille sekä eukaryooteilla että prokaryooteilla. Eritettävillä ja kalvoproteiineilla signaalisekvenssi on usein proteiinien ensin syntyvässä N-päässä, mutta muilla proteiineilla se voi olla myös keskellä proteiinin aminohappoketjua tai C-päässä. Signaalisekvenssin avulla proteiinit kuljetetaan oikeisiin paikkoihin solussa ja sen ulkopuolella. [4, s. 615–617; 5, s. 136.]

Signaalisekvenssi sisältää yleensä kolme osaa (kuva 1): N-terminaalisen, positiivisen n-alueen, keskellä olevan hydrofobisen h-alueen ja neutraalin mutta polaarisen c-alueen.



Kuva 1. Proteiinin signaalisekvenssin tyypillinen rakenne, joka sisältää kolme aluetta. N-alue sisältää usein hydrofiilisiä ja positiivisia aminohappotähteitä kuten arginiini ja lysiini. Signaalisekvenssin tärkein alue, h-alue, muodostuu noin 7 - 15:sta hydrofobisesta aminohappotähteestä ja c-alue neutraaleista mutta polaarista aminohappotähteistä. [Lähdettä 4, s. 61 mukailten.]

Kun proteiini on kuljetettu oikeaan paikkaan, signaalisekvenssi poistetaan kalvoon kiinnittyneiden entsyymien, signaaliptidaasien toimesta. Tieto signaalisekvenssien toiminnosta on tärkeää etenkin silloin, kun halutaan valmistaa tehokkaita lääkkeitä geneettisesti muokatuilla eläimillä, bakteereilla ja kasveilla. Niiden avulla on myös pystytty selittämään joidenkin geneettisesti periytyvien sairauksien mekanismeja molekyylitasolla. [4, s. 617.]

2.1.2 Translaation jälkeiset muokkaukset

Lähetä-RNA:sta translaation kautta syntyneet proteiinit käyvät läpi kemiallisia muokkauksia ennen kuin ne ovat valmiita ja pystyvät toimimaan eri soluissa. Näitä muokkauksia kutsutaan translaation jälkeisiksi muokkauksiksi, joissa esimerkiksi polypeptidiketjun tiettyihin aminohappotähteisiin kiinnitetään glykaaneja eli sokerirakenteita entsyymien avulla. Näillä muokkauksilla on hyvin tärkeä asema proteiinien monimuotoisuuden kannalta ja ne säätelevät myös sitä, miten tietty osa proteiinin sekvenssiä käyttäytyy eukaryoottisoluissa. Monimuotoisuudesta johtuen proteiineja voidaan käyttää hyväksi

erilaisissa solujen toiminnoissa ja eri solutyypeissä. Muokkauksien aikana voidaan proteiineihin sekä liittää erilaisia ryhmiä että poistaa niitä.

Muokkaustapoja on monia; esimerkiksi disulfididoksien muodostaminen, glykolysaatio, fosforylointi, asetylaatio, metylaatio ja selektiivinen proteolyysi. Nämä ovat kovalenttisia muokkauksia. Esimerkiksi proteiinien rakenteen ja toiminnan kannalta tärkeässä glykolysaatiossa glykaanit kiinnittyvät tiettyihin aminohappotähteisiin N- tai O-glykosididoksilla, jolloin kyseessä on O- tai N-glykolysaatio. Jos translaation jälkeinen muokkaus on puutteellinen, elimistössä esiintyy erilaisia häiriöitä. Puutteelliset muokkaukset saattavat vaikuttaa proteiinin laskostumisen epäonnistumiseen sekä proteiinin väärään kulkeutumiseen solussa. Glykolysaation epäonnistumisen seurauksena proteiini ei voi toimia ligandina tai reseptorina. [6.]

2.1.3 Tuottomenetelmän valinta

Proteiinituotossa käytettävä menetelmä tulee valita proteiinin ominaisuuksien ja käyttökohteen perusteella. Mahdolliset translaation jälkeiset muokkaukset tulee huomioida sekä se, halutaanko proteiinia tuottaa erittyvänä vai solunsisäisesti. Valintaan vaikuttavat usein myös hinta ja tekniset vaatimukset sekä tuottomenetelmän saannot, sillä bioteknisiin sovelluksiin on tuotettava usein mahdollisimman paljon proteiinia. [7.]

Käytettävillä vektoreilla on myös tärkeä merkitys proteiinituotossa, koska niissä olevan promoottorin ja replikaation aloitusalueen tulee soveltua kyseiselle proteiinituottoon valitulle solutyypille. Itse geenin ilmentämiseen isäntäsolussa voidaan käyttää esimerkiksi indusoitavia promoottoreja, jotka saavat geenin ilmentymisen aikaan vain kyseisen yhdisteen läsnä ollessa. Tällöin proteiinin tuottoa voidaan säädellä. Proteiinin ylituottoa voidaan puolestaan säädellä ajoittamalla se solukasvun vaiheeseen, jolloin solutiheys on hyvä ja jolloin solut tuottavat mahdollisimman paljon proteiinia. Näin toimitaan esimerkiksi soluille haitallisten proteiinien ylituotossa. Myös vektorin kopioluku vaikuttaa proteiinin tuottoon; mitä enemmän solussa on genejä, joita luetaan, sitä enemmän proteiinia tuottuu. Oikean signaalisekvenssin avulla voidaan proteiini tuottaa myös solunulkoisesti kasvatusliuokseen. Tällöin halutun proteiinin eristäminen on helpompaa, koska solut erittävät vain vähän muita proteiineja kasvatusliuokseen. Myös suuret tuotot ovat mahdol-

lisiä, kun tuotto ei tapahdu solunsisäisesti. Eristämisen jälkeen proteiini voidaan esimerkiksi puhdistaa tai kiteyttää. Onnistuneen kiteytyksen jälkeen sen 3-ulotteinen rakenne voidaan yrittää määrittää röntgensädekristallografiolla. [8.]

2.1.4 Tuottoisännät

Rekombinanttiproteiinien tuottoisäntinä voidaan käyttää bakteeri-, nisäkäs-, hyönteis- ja hiivasoluja sekä myös siirtogeenisiä eläimiä ja kasveja. Isäntäsolut valitaan yleensä lähinnä proteiinin ominaisuuksien ja käyttötarkoitusten mukaan, mutta usein otetaan huomioon myös isäntäsolujen tuottotaso, solujen käsittelyn helppous sekä kustannukset.

Bakteerisolut

Escherichia coli ja *Bacillus subtilis* ovat yleisimmin käytettyjä bakteereja proteiinituotossa. Löytyy kuitenkin hyvin vähän proteiineja, joiden tuotto olisi tehokkaampaa *Bacillus subtilis*ssä kuin *Escherichia coli*ssa. *Escherichia coli*in proteiinien tuottoon käytettyjä kantoja ovat esimerkiksi BL21, BL21 AI, Rosetta ja Origami, jotka eroavat toisistaan muun muassa niiden genomiin tehtyjen mutaatioiden ja alkuperäisen kantansa perusteella. Bakteerisolut eivät yleensä eritä tuottamiaan proteiineja kasvatusliuokseen. Proteiinisaannot ovat yleisesti ottaen suuria ja proteiinit ovat liukoisessa muodossa. Haittapuolena ovat kasvatusliuokseen eritettävät useat proteaasit, jotka hajottavat muita proteiineja, sekä joskus väärin laskostuneet proteiinit, jotka eivät ole aktiivisia. Kun työskennellään bakteereiden kanssa, on vektoreiden määrä suuri verrattuna muihin yleisimpiin tuottosysteemeihin ja tuottoa helpottaa se, että proteiinille voidaan valita sopiva tuottovektori. [9, s. 55.]

Nisäkässolut

Nisäkässolut ovat myös yleisesti käytettyjä isäntäsoluja rekombinanttiproteiinien tuotossa. Niissä tuotetut proteiinit ovat yleensä aktiivisia, sillä proteiinin synteeseihin liittyvät signaalit tunnistetaan oikein ja proteiinit prosessoidaan ja eritetään oikein. Nisäkässolujen tuottomenetelmien avulla saadaan myös tärkeää tietoa esimerkiksi transkriptiosta, translaatiosta sekä proteiinin toiminnasta translaation jälkeen. Translaation jälkeiset muokkaukset, kuten solun ulkopuolelle eritettyjen glykoproteiinien oikeanlainen laskostumi-

nen ja niiden sisältämät oligosakkaridi-rakenteet ovat tärkeä etu proteiinien tuotossa nisäkässoluissa. Nämä muokkaukset ovat yleensä monipuolisempia kuin muiden tuottomenetelmien tekemät muokkaukset. Proteiinien tuottaminen nisäkässoluilla vaatii kuitenkin paljon aikaa sekä optimointia. Jos solulinja saadaan tuottamaan haluttua proteiinia, on tuottotaso yleisesti ottaen huono. Lisäksi nisäkässolut ovat herkkiä kontaminaatioille. [10; 11, s. 32.]

Proteiinituottoon nisäkässoluissa käytetyt vektorit ovat usein sukkulavektoreita, joissa on tarvittavat alueet myös bakteerityöskentelyyn esimerkiksi *E. coli*ssa. Yhdistelmä-DNA-molekyylien rakenne varmistetaan käyttämällä ensin isäntänä bakteeria, minkä jälkeen ne viedään vasta eukaryoottisoluun. Toimivien vektoreiden valmistaminen kaikkine erikoisvaatimuksineen eukaryoottien geeniekspressiota varten on huomattavasti työläämpää verrattuna esimerkiksi bakteerituottoa varten valmistettuihin vektoreihin. [2, s. 60.]

Hyönteissolut

Hyönteissolut pystyvät tuottamaan lähes yhtä paljon proteiineja kuin bakteerisolut. Tuotetuissa proteiineissa esiintyvät myös translaation jälkeiset muokkaukset, mutta usein proteiinit ovat ylisokeroituja. Hyönteissoluilla tapahtuvassa proteiinien tuotossa käytetyimpiä vektoreita ovat bakulovirukset. Hyönteissoluista eritettävät proteiinit läpikäyvät hyvinkin monimutkaisia glykolysaatioita ja ne tuottuvat vain rajallisen ajan, sillä tuotto päättyy solukuolemaan. [9, s. 55.]

Hiivasolut

Hiivat ovat myös yleisesti käytettyjä tuottoisäntiä. Ne kasvavat suuriin tiheyksiin ja niiden kasvatus on helppoa ja samalla edullista. Hiivat tuottavat yleensä proteiineja paljon ja nopeasti ja pystyvät muokkaamaan niitä lähes samalla tavalla kuin nisäkässolut. Ainoastaan hydroksyyliyhmiin liittämisen proliineihin ja osa monimutkaisista fosforylaatioista sekä glykolysaatioista puuttuvat. Usein tuotetuissa erityyppisissä proteiineissa ilmenee ylisokerointia. Yleisimpiä käytettyjä hiivoja ovat *Saccharomyces cerevisiae* ja *Pichia pastoris*. Haittapuolena on kuitenkin hiivojen solulimakalvosto, joka ilmeisesti tunnistaa vieraita proteiineja väärin laskostuneiksi. Myös soluhajotus on hankalaa. Erityskelvottomat proteiinit voidaan kuitenkin kytkeä tietynlaiseen kantajaan, joka on *Saccharomyces cerevisiae* -hiivan erittämän proteiinin, pre-pro-a-faktorin, osa. Näin proteiinit saadaan jälleen erittyviksi, sillä hiivan soluli-

makalvosto hyväksyy yhdistelmäproteiinin. Hiivojen genomia voidaan myös muokata ja näin voidaan vähentää proteolyysiä ja varmistaa oikeanlaiset translaation jälkeiset muokkaukset. [11, s.19; 12, s. 4.]

Siirtogeeniset kasvit ja eläimet

Tulevaisuudessa tärkeä merkitys rekombinanttiproteiinien tuotossa tulee olemaan siirtogeenisillä kasveilla, joilla voidaan periaatteessa tuottaa proteiineja samalla tavalla kuin eläinsoluissa. Siirtogeeni on DNA-jakso, joka liittyy organismin genomiin koeolosuhteissa [13].

Kasveissa tapahtuvaan proteiinituottoon käytettävät vektorit poikkeavat melko paljon eläinsoluvektoreista. Kaksisirkkaisiin kasveihin voidaan siirtää vierasta DNA:ta käyttämällä plasmideja, jotka on kehitetty *Agrobacterium*-bakteerin Ti-plasmideista. Kun kasvisolukko infektoidaan Ti-plasmidia sisältävällä bakteerilla, osa plasmidista integroituu osaksi kasvin genomia. Yksisirkkaisille kasveille käytetään taas esimerkiksi kasvivirusien DNA:sta muunneltuja vektoreita. [2, s. 60.]

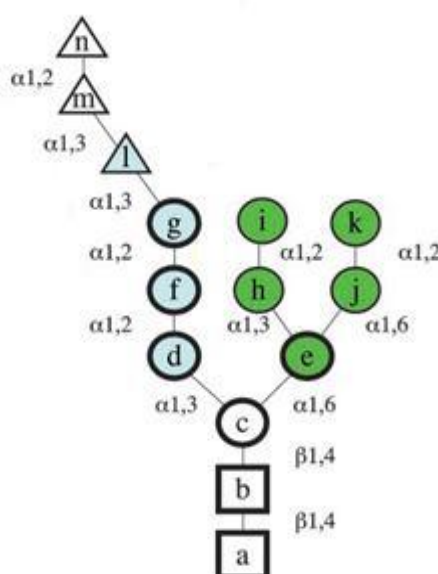
Kasveissa tapahtuva tuotto on noussut vahvaksi kilpailevaksi tuottomenetelmäksi perinteisten rekombinanttiproteiinien tuottomenetelmien kanssa. Kasveissa rekombinanttiproteiinien tuottaminen on edullista, tehokasta sekä turvallista. Tuotetut proteiinit ovat homogeenisiä ja laadukkaita. Kasveissa on alettu tuottaa paljon esimerkiksi rokotteita, vasta-aineita, hormoneja ja kasvun säätelijöitä. On arvioitu, että tällaisten lääketieteellisten proteiinien tuottaminen on turvallisempaa kasveissa kuin mikrobi- tai eläinsoluissa, sillä kasveilta puuttuvat ihmis-patogeenit, syöpää aiheuttavat DNA-sekvenssit sekä endotoksiinit. [14, s. 570–572.]

Siirtogeenisiä eläimiä käytetään erityisesti lääketieteellisyydessä. Siirtogeenisten eläinten ylläpito on erittäin tarkoin valvottua ja jokaisen koe-eläimen tuottamiseen tarvitaan koe-eläinlupa. Suurin osa tuotetuista siirtogeenisistä eläimistä on hiiriä, jotka on tarkoitettu tutkimukseen. DNA:n injektio hedelmöitetyn munasolun tumaan on perinteisin tapa tuottaa siirtogeeninen eläin, mutta myös viruksia sekä alkion kantasoluja käytetään. Tämän jälkeen alkio siirretään emon kohtuun kehittymään ja syntyneistä poikasista tutkitaan, ovatko ne siirtogeenin kantajia. Tärkein käyttötarkoitus siirtogeenisten hiirien tuotossa on perustutkimus, jossa tutkitaan tietyn geenin tai proteiinin merkitystä ja tehtäviä elävässä organismissa. Vaikka siirtogeenisten eläinten käyt-

tö tuottoisäntinä onkin työlästä ja ylläpidoltaan sekä valmistukseltaan kallista, saadut tulokset pätevät koko eläimen mittakaavassa, toisin kuin keinotekoisien soluviljelmien antamat tulokset. [13.]

2.2 Proteiinien sokerointi ja väärin laskostuneet proteiinit

Proteiinien laskostumiseen kuuluva sokerointi tapahtuu solulimakalvostossa entsyymiohjatusti. Vain oikein laskostunut proteiini on aktiivinen ja pystyy siis toimimaan oikein. Oikea laskostunut rakenne on tärkeää myös proteiinin liikkumiselle erityisreittiä pitkin solun ulkopuolelle. Yleisimpiä proteiineihin liitettyjä sokerirakenteita eli glykaaneja ovat N-glykosidiset oligosakkaridit. Proteiiniketjut läpäisevät solulimakalvoston ontelon Sec61-translokoinin kautta, minkä jälkeen oligosakkaryylitransferaasi etsii sekvenssistä oikean kohdan glykaanien kiinnittämiseksi. Glykaanit kiinnittyvät Asn-X-Ser/Thr-sekvenssiin, jossa asparagiinin ja seriinin tai treoniinin välissä voi olla mikä tahansa aminohappo paitsi proliini. Ensimmäisenä valmistetaan sivuketju, jossa on kaksi N-asetyyli-glukosamiinia (a-b, kuva 2), yhdeksän mannoosia (c-k, kuva 2) ja kolme glukoosia (l-n, kuva 2). Nämä kiinnitetään proteiinin asparagiinitähteesiin. Tämä rakenne on esitetty kuvassa 2. [15, s. 592; 595.]



Kuva 2. Solulimakalvostossa proteiiniin liitetty N-glykosidiset oligosakkaridit. Rakenteessa on kaksi N-asetyyli-glukosamiinia (a-b), yhdeksän mannoosia (c-k) ja kolme glukoosia (l-n). [16, s.1023.]

N-asetyyli-glukosamiinit kiinnitetään glykosyylitransferaasilla, minkä jälkeen mannoosi, johon on kiinnittyneenä guanosiinidifosfaatti, kiinnittää viisi mannoosia rakenteeseen transferaasin avulla. Viidennen mannoosin jälkeen fliipaasi-entsyymi kääntää glykaanidolikolin endoplasmakalvoston kalvon sisäpuolelle, jossa siihen lisätään edelleen neljä mannoosia. Mannooseja on kolmessa haarassa, joista ensimmäiseen lisätään vielä kolme glukoosia. Proteiinin oikea laskostuminen tarkastetaan UDP-glukoosi glykoproteiini-glykosyylitransferaasin toimesta. Solulimakalvoston membraanille kiinnittynyt kalneksiini-proteiini tunnistaa proteiiniin liitetyn sokeriketjun ja pitää proteiinin solulimakalvostossa, kunnes se on laskostunut oikein. Proteiinia aletaan muokata jo solulimakalvostossa poistamalla siitä glukoosia ja mannooseja. Oikein laskostunut proteiini päästetään solulimakalvostosta Golgin laitteeseen, jossa sen rakennetta muokataan edelleen. [17, s. 4373.]

Jos proteiinit tunnistetaan väärin laskostuneiksi, ne jäävät solulimakalvostoon hajotettaviksi. Hajotuksella estetään niiden kerääntyminen solulimakalvostoon. Väärin laskostuneen proteiinin hajotukseen kuuluu kolme eri vaihetta: sen tunnistaminen, translokaatio solulimaan ja lopulta ubikitiinista riippuva hajotus proteosomissa. Näistä ensimmäinen vaihe tapahtuu solulimakalvostossa. [16, s. 1038.]

2.2.1 Glykosidihydrolaasit

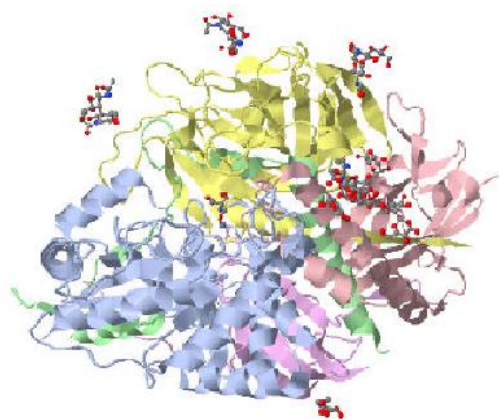
Glykosidihydrolaasit ovat väärin laskostuneiden proteiinien hajotukseen osallistuvia entsyymejä, jotka hydrolysoivat eli hajottavat kahden tai useamman hiilihydraatin välisiä glykosididoksia. Hydrolysaatioon tarvitaan kaksi hyvin tärkeää aminohappotähdettä: protonin luovuttaja sekä nukleofiili tai emäs. Hydrolyysi esiintyy kahden mekanismin avulla, jolloin reaktio joko säilyttää tai hajottaa anomeerisen rakenteen. Glykosidihydrolaasit voidaan jakaa useampaan perheeseen niiden aminohappokoostumuksen perusteella. [18.]

2.2.2 Alfa-mannosidaasit

Alfa-mannosidaasit kuuluvat glykosidihydrolaaseihin ja niitä löytyy solulimakalvostosta, Golgin laitteista, solulimasta sekä lysosomeista. Ne luokitellaan

kahteen eri ryhmään, joilla molemmilla on erilaiset biokemialliset ominaisuudet, tyypilliset konservoituneet aminohappoalueet sekä katalyyttiset mekanismit. Ensimmäistä kutsutaan glykosidihydrolaasiperheeksi 47 ja toista glykosidihydrolaasiperheeksi 38. Perheen 47 solulimakalvostossa ja Golgin laitteissa toimivilla α -mannosidaaseilla on tärkeä merkitys väärin laskostuneiden proteiinien mannoosi-sokeriosien hajottamisessa. Solulimakalvoston mannosidaasi I hajottaa α 1,2-mannoosisidoksia (i, kuva 2) ja Golgin laitteen α -mannosidaasit lähinnä α 1,2-mannoosisidoksia (g,k ja f, kuva 2) [15, s. 595]. Perheen 38 entsyymit sen sijaan voivat hydrolysoida α 1,2-, α 1,3- ja α 1,6-mannoosi-sidoksia (kuva 2) säilyttäen konformaation. [19, s. 1084; 20, s. 100.]

Glykosidihydrolaasiperheen 38 entsyymeille on tyypillistä niiden suuri koko (noin 1000 aminohappoa) ja aktiivisen keskuksen aminohappojen suuri konservoituneisuus eri perheenjäsenten välillä. Tämän perheen entsyymit esiintyvät yleisesti nisäkkäiden soluissa ja ne osallistuvat glykoproteiinien asparagiiniin kiinnittyneiden sokeriketjujen hajottamiseen sekä rakentamiseen. Lisäksi ne hydrolysoivat keinotekoisia substraattia p-nitrofenyyli- α -D-mannopyranosidia. Perheeseen 38 kuuluvat soluliman neutraalin α -mannosidaasin (NAM) lisäksi Golgin laitteen alfa-mannosidaasit II ja IIx sekä lysosomin alfa-mannosidaasi (LAM). Lysosomin α -mannosidaasin kolmiulotteinen rakenne on saatu selville röntgenkristallografian avulla ja se on esitetty kuvassa 3. [19, s. 1084–1087.]



Kuva 3. Naudan lysosomin α -mannosidaasin kolmiulotteinen rakenne [21]

2.2.3 Neutraali α -mannosidaasi

Neutraalia α -mannosidaasia (NAM) erittyy solulimaan ja sitä on eristetty useista eri eläimistä ja on saatu selville, että se on rakenteeltaan tetrameeri, sen molekyylipaino on 468 kDa, sitä inhiboi kasvialkaloidi svainsoniini ja aktivoi koboltti ja että se on aktiivinen neutraalissa pH:ssa. NAM hydrolysoi reaktiota $\text{Man9GlcNAc}_2 \rightarrow \text{Man5GlcNAc}_2$, kun läsnä on Fe^{2+} , Co^{2+} ja Mn^{2+} . Kun läsnä ei ole aktivoivia kationeja, päätuotteena on Man8GlcNAc_2 . NAM on myös liitetty endoplasmakalvostoon, autofagosomeihin ja lysosomeihin, mutta sen merkitystä näissä ei ole saatu selville. Myöskään sen kolmiulotteista rakennetta ei vielä tunneta. [19, s. 1084 – 1087.]

NAM:lla saattaa olla jonkinlainen rooli perinnöllisessä sairaudessa, alfa-mannosidoosissa, koska NAM osallistuu samaan kataboliseen reaktiotiehen kuin LAM. NAM irrottaa osan solulimakalvostossa väärin laskostuneiden glykoproteiinien sokeriosien mannooseista solulimassa. Tämän jälkeen proteiini kuljetetaan edelleen lysosomiin, jossa lysosomin α -mannosidaasi-entsyymi hajottaa loppuosan glykaanista. Kun LAM-aktiivisuus puuttuu, on tuloksena glykosidaasien ja proteinaasien kerääntyminen lysosomeihin, jolloin ne alkavat paisua. Tästä johtuen solun toiminnot häiriintyvät. NAM:n mahdollista vaikutusta alfa-mannosidoosiin ei ole vielä saatu selville, mutta sen aktiivisuus solulimassa on tärkeä osa mannoosi-sokereiden hajottamisessa ennen kuin proteiini siirtyy lysosomiin edelleen hajotettavaksi LAM:n toimesta.

Alfa-mannosidoosissa nimenomaan LAM-aktiivisuus puuttuu. Tämän aiheuttaa mutaatio geenissä MAN2B1, joka sijaitsee kromosomissa 19 ja joka koodaa lysosomin α -mannosidaasia. Alfa-mannosidoosin oireita ovat muun muassa immuunikato, luuston epämuodostumat, kuulovauriot ja nivelongelmat. Sairaus voidaan luokitella kolmeen kliiniseen tyyppiin; ensimmäiseen tyyppiin kuuluvat potilaat, joilla sairaus todetaan 10 ikävuoden jälkeen ja joilla ei esiinny luuston epämuodostumia. Tällöin sairaus luokitellaan heikoksi. Toiseen tyyppiin luokitellaan potilaat, joilla sairaus todetaan ennen 10. ikävuotta ja joilla esiintyy luuston epämuodostumia. Sairaus luokitellaan kohtalaisen vakavaksi, se etenee hitaasti ja potilaille kehittyy ataksia 20–30 vuoden iässä. Kolmannen tyyppin potilailla sairaus tunnistetaan välittömästi ja se luokitellaan vakavaksi. Sairaus etenee nopeasti ja se johtaa potilaan primääriseen keskushermoston aikaiseen tuhoutumiseen tai myopatiaan. Suurin osa potilaista luokitellaan kliiniseen tyyppiin 2. Alfa-mannosidoosi todetaan mittaa-

malla happaman α -mannosidaasin aktiivisuutta leukosyyteissä tai tumallisissa soluissa. [22, s. 1-3, 5.]

2.3 *Leishmania* -suku

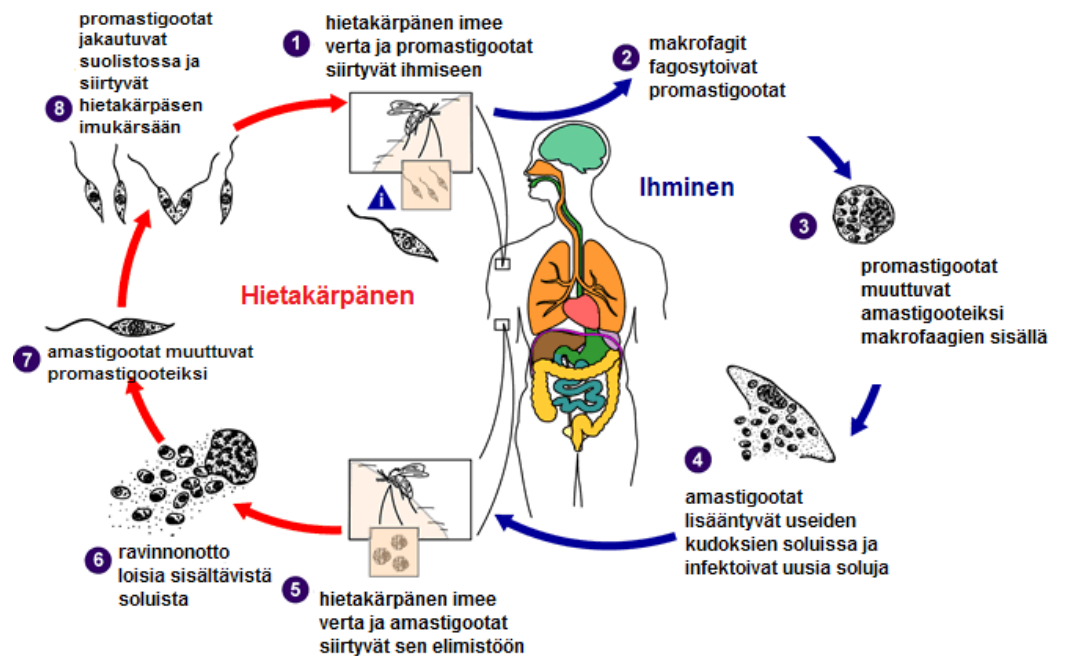
Leishmania on alkueläin, joka kuuluu *Trypanosomatidae*-heimoon. Monet *Leishmania*-suvun lajeista ovat niin solunulkoisia kuin -sisäisiäkin parasiittejä karjalle ja ihmisille. Siksi *Leishmania*-suku onkin yksi tutkituimmista eukaryoottiryhmistä hiivojen jälkeen. *Trypanosomatidae*-heimoon kuuluvat alkueläimet sisältävät paljon glykoproteiineja ja niitä voi olla jopa 10 % kaikista proteiineista. Oligosakkaridien rakenne on hyvin samankaltainen kuin nisäkkäillä sisältäen muun muassa N-galaktoosia ja fukoosia. [23, s. 273–275.]

Leishmania genomi on kooltaan noin 34 Mb ja kromosomien koko vaihtelee välillä 0,3 - 2,5 Mb. Vanhan maailman lajeilla (*Leishmania major*, *L. aethiopica*, *L. tropica* ja *L. infantum*) on 36 kromosomia ja uuden maailman lajeilla 35 (*L. braziliensis*) tai 34 (*L. mexicana*) kromosomia. [3, s. 5.]

Trypanosomatidae-heimoon kuuluvien parasiittien geenien ilmentäminen sisältää epätavallisia ja monimutkaisia mekanismeja, kuten useiden proteiineja koodaavien geenien transkription, esi-lähetti-RNA:n käsittelyn silmukoinnilla, mitokondrionaalisten transkriptien RNA:n muokkauksen sekä proteiineja koodaavien geenien transkription RNA-polymeraasi I:llä tai T7- ja T3 RNA-polymeraaseilla. Näissä organismeissa tuman valmis lähetti-RNA luodaan primäärisistä transkripteista silmukoinnilla. Tässä prosessissa lähetti-RNA:n 5'-päähän lisätään silmukoitu 39-nukleotidia sisältävä eksoni tai johdettava sekvenssi. Myös polyadeniini-hännän lisääminen jokaisen lähetti-RNA:n 3' -päähän on oleellista tehokkaassa translaatiossa. [3, s. 6; 24, s. 1504-1506.]

2.3.1 *Leishmanian* elinkaari

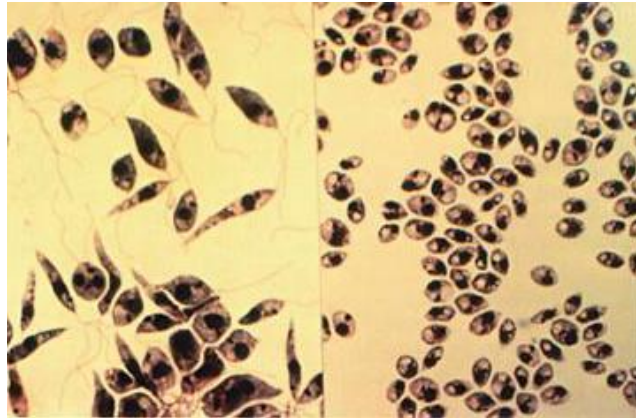
Leishmaniella on monimutkainen elinkaari, joka sisältää eri vaiheita nisäkässä ja hietakärpäsessä. *Leishmania*-alkueläimen elinkaari on esitetty kuvassa 4.



Kuva 4. *Leishmania*-alkueläimen elinkaaren vaiheet hietakärpäsessä ja ihmisessä [lähde: 25 mukaillen]

Leishmaniolla esiintyy eri kehitysvaiheita, joiden avulla ne pystyvät sopeutumaan ympäristöönsä. Hietakärpäsessä *Leishmania* lisääntyy solunulkoisena ja hyvin liikkuvana, flagellan omaavana soluna, jota kutsutaan promastigootaksi. Promastigootteja on kahta eri muotoa; lisääntyvä, mutta nisäkkäille vaaraton muoto, joka elää hietakärpäsen suolistossa sekä nisäkässoluja infektoiva lisääntymätön muoto, joka elää hietakärpäsen suolistossa ja siirtyy sieltä imukärsään. Kun lisääntymätön muoto infektoi nisäkässolun, ne erilaistuvat makrofaagien fagosytoosin jälkeen solunsisäisiksi amastigoteiksi, joilla on lyhyt flagella tai sitä ei ole ollenkaan.

Kuvassa 5 näkyy promastigooteille ja amastigooteille tyypillisiä muotoja. [23, s. 273.]



Kuva 5. Mikroskooppikuva, jossa näkyy *Leishmania* – promastigooteille (vasemmalla) ja amastigooteille tyypilliset muodot [25].

2.3.2 *Leishmaniaasi*

Leishmania-sukuun kuuluvat parasiitit levittävät hyvin laajalle levinnyttä sairautta, leishmaniaasia, jonka oireet voivat vaihdella suuresti. Yleisin muoto on iholeishmaniaasi. Itsestään paranevia ihovammoja aiheuttavat *Leishmania major*, *Leishmania tropica* ja *Leishmania mexicana*. Limakalvovaurioita aiheuttavat taas *Leishmania braziliensis* ja vakavia sisäelinkipuja eli viskeraalista leishmaniaasia *Leishmania infantum*, *Leishmania donovani* ja *Leishmania chagasi*. Viskeraalinen leishmaniaasi aiheuttaa erityisesti pernan ja maksan vaurioita, ja se voi johtaa kuolemaan. Viskeraaliseen leishmaniaasiin liittyvistä sisäelinkivuista kärsii noin 500 000 ihmistä vuosittain. [26, s. 53–62.]

2.3.3 *Leishmania tarentolae*

Leishmania tarentolae on yksisolainen, flagellallinen alkueläin, joka kuuluu *Leishmania*-sukuun. Se on *Tarentola annularis* -gekon loinen ja ensimmäisen kerran se eristettiin vuonna 1921 *Tarentola mauretanic* -liskosta [27]. *Leishmania tarentolae* ei ole patogeeninen nisäkkäille, ja se luokitellaankin bioturvaluokkaan 1 [28].

2.4 LEXSY-tuottomenetelmä

LEXSY (Leishmania expression system, Jena Bioscience) -proteiinituottomenetelmä perustuu *Leishmania tarentolae* laboratorioikantaan P10, joka on eristetty *Tarentola annularis* -gekosta. Tällä eukaryoottisella tuottomenetelmällä voidaan tuottaa niin indusoituja, solunsisäisiä kuin eritettäviäkin proteiineja.

2.4.1 *Leishmania tarentolae* -solujen kasvatus

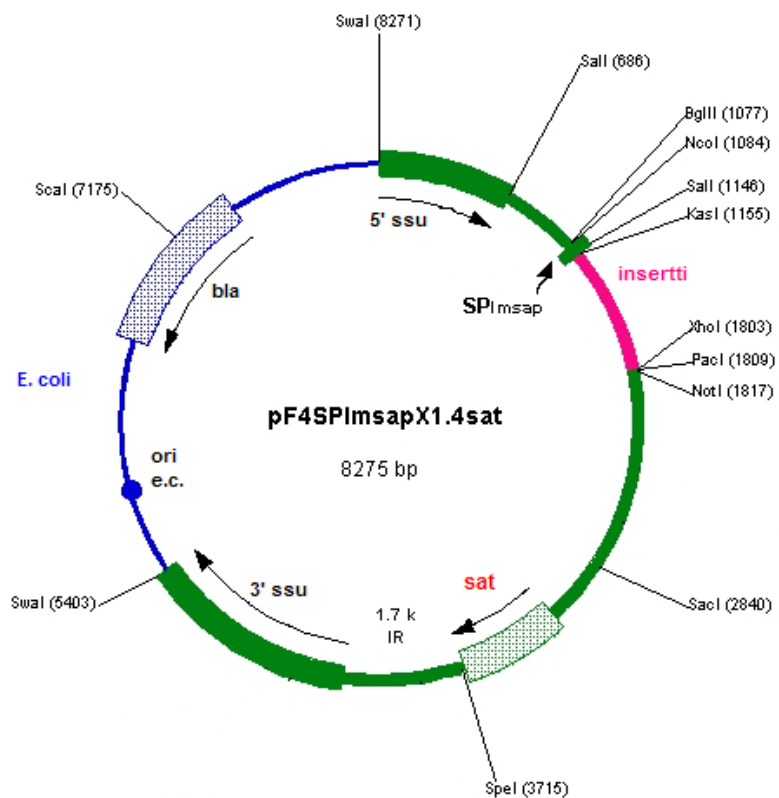
Yksi tämän tuottomenetelmän hyvistä puolista on, että *Leishmania tarentolae* -soluja voidaan käsitellä kuten *Escherichia coli*, niitä voidaan kasvattaa niin maljoilla, solukasvatuspulloissa kuin kuoppalevyilläkin. Lisäksi LEXSY-tuottomenetelmässä käytetyt *Leishmania tarentolae* -solut kasvavat nopeammin ja niiden kahdentumisaika voi olla vain 4 tuntia. Ne kasvavat yleisesti ottaen myös suurempaan tiheyteen kuin nisäkäs- ja hyönteissolut ($> 10^8$ solua/ml). Soluja viljellään BHI (brain heart infusion) -liuoksessa, joka estää muiden rekombinanttituotteiden, kuten virusten kontaminaatiota. Kasvatusliuos ei sisällä seerumia ja siihen lisätään heminiä, joka toimii orgaanisen raudan lähteenä ja on välttämätöntä ainesosa solujen kasvulle. Myös penisilliinin ja streptomysiinin sekoitusta olevaa antibioottia on hyvä käyttää kasvatusliuoksessa bakteerikontaminaation ehkäisemiseksi. [29; 30, s. 384-386; 31, s. 488.]

2.4.2 *Ekspressiovektori*

Tässä työssä käytettiin erityyään proteiinituottoon tarkoitettua sukkulavektoria (pf4splmsapX1.sat). Halutut proteiinit tuottuvat valmistetun lineaarisen ekspressiovektorin avulla, joka integroituu isäntäsolussa kromosomaaliseen 18S rRNA -lokukseen (ssu) ja joka johtaa suureen transkriptiotehokkuuteen isäntäsolun RNA-polymeraasi I:n avulla. Vektori sisältää myös optimoituja ei-translatoituvia alueita, jotka voivat toimia kohdegeenin liittymiskohtana. Nämä alueet tarjoavat myös silmukoitumis-signaaleja translaation jälkeiseen lähetti-RNA:n prosessointiin. Vektoriin liitetty kohdegeeni eli insertti korvaa vektorissa 0,7 kiloemäsparin kokoisen täytefragmentin. Kasvatusliuokseen erittyvän proteiini tuotto vaatii toimiakseen erityisen signaalisekvenssin eli

signaalipeptidin, *Imsap:n*, joka on peräisin *Leishmania mexicana* geenistä, joka tuottaa hapanta fosfataasia (*Imsap1*). [23, s. 274.]

Kun kohdegeeni liitetään niin, että signaalipeptidi (*SP_{Imsap}*) jää kokonaan vektoriin, proteiini tuottuu siis erityyvästi solujen ulkopuolelle. Kun signaalipeptidi poistetaan vektorista, proteiini tuottuu solunsisäisesti. Kuvassa 6 on esitetty tässä työssä proteiinituottoon käytetty vektori, jossa restriktiokohtien lisäksi on merkitty DNA-tuottoa varten oleva *E. coli* -osio, signaalipeptidi, insertin liittymiskohta erityyvässä proteiinituotossa sekä selektion mahdollistava *sat*-geeni.



Kuva 6. LEXSY-vektori (*pF4SP_{Imsap}X1.4sat*), jossa näkyvät restriktiokohtien lisäksi *E. coli* -osio (sininen), insertin liittymiskohta (vaaleanpunainen) erityyvässä proteiinituotossa, signaalipeptidi (*SP_{Imsap}*) ja selektion mahdollistava *sat*-geeni (punainen). Kun proteiinia tuotetaan solunsisäisesti, signaalipeptidi poistetaan vektorista. [Lähdettä 32 mukailen.]

2.4.3 Transfektio ja selektio

LEXSY-tuottomenetelmässä solujen transfektio tehdään elektroporaatiota käyttäen ja selektion mahdollistava antibiootti lisätään solukasvatuksiin seuraavana päivänä transfektioista. Vektorin sisältämä *sat*-geeni, joka koodaa nurseotrisiini N-asetyyli transferaasia, mahdollistaa selektion nurseotrisiini (NTC)-antibiootilla. *Sat*-geeni inaktivoi nurseotrisiinin, jolloin kyseisen geenin sisältävät solut pystyvät kasvamaan selektiivisessä kasvatusliuoksessa. Resistanssi perustuu streptotrisiini-molekyylien beta-lysyili-osissa olevien beta-amino-ryhmien monoasetylaatioon [34]. Nurseotrisiini on luonnollinen sekoitus streptotrisiini C:tä (5 %), D:tä (51,5 %), E:tä (6 %) ja F:ää (35 %), jotka on tuotettu *Streptomyces noursei* -aktinomykeetissä [34, s. 3].

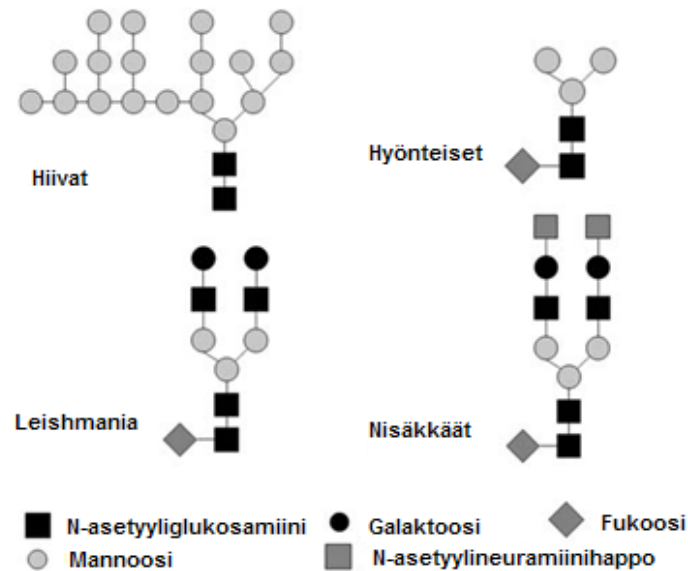
LEXSY-tuottomenetelmässä valmistettu ekspressiovektori linearisoidaan ja se yhdistyy *Leishmania tarentolaen* 18S rRNA -lokukseen (*ssu*) homologisella rekombinaatiolla. *Leishmania*-soluissa homologinen rekombinaatio on hyvin samankaltainen kuin hiivoilla ja nisäkässoluilla. Homologisessa rekombinaatiossa samanlaiset DNA-alueet tai sekvenssit vaihtavat paikkaa tai korvautuvat toisillaan vastinkromosomien tai sisar-kromatidien välillä. Bakteereilla ja eukaryoteilla homologisessa rekombinaatiossa muodostuu kaksoishaarukoita samanlaisista yksi- tai kaksijuosteisista DNA:ista perheen RecA/Rad51 – proteiinien ATP:tä vaativissa reaktioissa. [35, s. 21–23.]

Jos homologiset DNA-sekvenssit ovat alle 1000 emäsparin pituisia, laskee tällöin rekombinaation tarkkuus lineaarisesti. DNA-sekvenssien ollessa alle 180 emäsparia, homologista rekombinaatiota ei tapahdu. Homologisen rekombinaation etuna on se, että insertin mukana ei siirry ylimääräisiä geenisekvenssejä. Menetelmänä se on kuitenkin monimutkainen ja yleisesti ottaen melko vaikea toteuttaa. [23, s. 274; 37.]

2.4.4 Translaation jälkeiset muokkaukset LEXSY:llä tuotetuissa proteiineissa

LEXSY-tuottomenetelmässä proteiinien translaationjälkeiset muokkaukset, kuten glykosylaatio, fosforylaatio ja prenylaatio toteutuvat. Vain glykaanien silylaatio puuttuu ja proteiinit ovat hyvin homogeenisiä. Homogeenisyys auttaa etenkin jos proteiineja tuotetaan rakennetutkimuksiin. LEXSY-tuottomenetelmällä on tuotettu onnistuneesti esimerkiksi aktiivista ja N-glykolysoitua ihmisen erytropoietiinia [37].

Kuvassa 7 on esitetty *Leishmania*-soluissa tuotettujen proteiinien tyypillinen sokerointi, joka on samankaltainen kuin vastaavien nisäkässoluissa tuotettujen proteiinien sokerointi.



Kuva 7. *Leishmania*-alkueläimessä ja muissa soluissa tuotettujen proteiinien tyypillinen sokerointi [lähde 23, s. 275 mukailen]

Leishmania tarentolae pystyy siis tuottamaan niin solunsisäisiä kuin solunulkoisiakin proteiineja, jotka erittyvät kasvatusliuokseen. Kasvatusliuokseen eritetyt proteiinit muodostavat suurimman osan siinä olevista proteiineista, sillä kasvatusliuos sisältää vain hyvin vähän erikseen lisättyjä proteiineja. Proteiinisaantoja kokeiltaessa erilaisilla proteiineilla, saannot vaihtelivat välillä 0,1 – 5 mg/l tai hieman tämän yli. Valmistajan mukaan proteiinisaanto laboratorio-olosuhteissa yhdestä litrasta solukasvatusta voi kuitenkin olla jopa 300 mg. [29].

3 TYÖN SUORITUS

3.1 *Leishmania tarentolae* -solujen kasvatus

Tämä työ suoritettiin pääasiassa Jena Biosciencen kitin (*Leishmania tarentolae* Secretory Expression Starter Kit with LMSAP signal peptide, EGE-111) ohjeiden mukaisesti. *Leishmania tarentolae* -solujen (kanta P10) kasvatusta myöhemmin tehtävää transfektiota varten aloitettiin lisäämällä 250 ml:n solukasvatuspulloon (Becton Dickinson) 10 ml LEXSY-kasvatusliuosta (LEXSY Broth BHI), 100 µl 500-kertaista heminiä (Jena Bioscience) ja 50 µl penisilliini- ja streptomysiinin sekoitusta olevaa antibioottia (10 000 U/ml penicillin G sodium and 10 000 µg/ml streptomycin sulfate in 0,85 % saline, Jena Bioscience) bakteerikontaminaation ehkäisemiseksi. Aiemmin tehty *Leishmania tarentolae* -soluja sisältävä glyseroliputki otettiin pakkasesta (-80 °C) ja sulatettiin jäissä. Lisättiin putken sisältö solukasvatuspulloon ja laitettiin lämpökaappiin (+25 °C) inkuboitumaan. Solujen kasvatusta jatkettiin, kunnes solukasvatuksen tiheys absorbanssina mitattuna aallonpituudella 600 nm oli 2-3 ($1-2 \cdot 10^8$ solua/ml). Solutiheys mitattiin Eppendorf AG:n BioPhotometer-laitteella kasvatusliuoksen toimiessa nollanäytteenä. Kun tämä absorbanssiväli saavutettiin, jaettiin solut uusiin pulloihin suhteissa 1:10 ja 1:50 lisäämällä oikea tilavuus soluja ja uutta kasvatusliuosta. Kasvatusliuokseen oli lisätty 5 µg/ml heminiä sekä 5 µl/ml penisilliini-streptomysiini-antibioottia. Lopullinen tilavuus solukasvatuksissa oli 10 ml. Tämän jälkeen solujen jako tapahtui yleensä noin kahden päivän välein.

3.2 Neutraalin α -mannosidaasi -geenin liittäminen ekspressiovektoriin

Aikaisemman laboratoriotyön aikana inserttinä toiminut neutraali α -mannosidaasi -geeni (noin 3000 emäsparia) oli liitetty tässä työssä käytettyyn ekspressiovektoriin (pf4splmsapX1.sat) valmistamaan kaksi erilaista konstruktia. Toinen konstrukt ei sisältänyt signaalipeptidiä, jolloin solu ei pysty lukemaan sitä. Tällöin proteiinia ei eritetä solun ulkopuolelle vaan se tuottuu solunsisäisesti. Toisessa konstruktissa insertti liitettiin ekspressiovektoriin vasta 69-nukleotidia pitkän signaalipeptidin jälkeen, jolloin proteiini tuottuisi erittyvänä.

Erittyvää ja solunsisäistä proteiinituottoa varten valmistetut konstruktit signaalipeptidin ja insertin sijainnin suhteen on esitetty kuvassa 8.

Erittyvä tuotto:



Solunsisäinen tuotto:



Kuva 8. Insertin ja signaalipeptidin (SP) sijoittuminen ekspressiovektorissa. Erityvässä NAM-proteiinituotossa insertti on liitetty vektoriin 69-nukleotidia pitkän signaalipeptidin jälkeen. Solunsisäiseen tuottoon tarkoitettussa konstruktissa ei ole signaalipeptidiä. Ennen signaalipeptidiä ja inserttiä sekä insertin jälkeen olevat osat (V) ovat osa vektoria. Kuvan mittasuhteet eivät ole todellisia.

3.3 *Escherichia coli* -transformaatio

Tämä työ alkoi *Escherichia coli* -transformaatiolla, jonka avulla saatiin tuotettua tarvittava määrä molempia DNA:ita transfektioita varten. Tuottoisäntänä käytettyjä *Escherichia coli* XL10-Gold -kompetentteja soluja sulatettiin jäissä noin 15 minuuttia, minkä jälkeen niitä otettiin 100 µl kahteen steriiliin eppendorf -putkeen ja lisättiin toiseen 2 µl edellisissä PCR-reaktioissa monistettua erittyvän NAM:n (NAM_s, s = secreted) tuottoon tarkoitettua ekspressiovektoria sisältävää DNA:ta. Toiseen putkeen lisättiin kompetenttien solujen lisäksi 2 µl solunsisäisen NAM:n (NAM_i, i = intracellular) tuottoon tarkoitettua ekspressiovektoria sisältävää DNA:ta. Tämän jälkeen annettiin molempien transformaatioseoksien olla jäissä puoli tuntia, minkä jälkeen seoksille annettiin lämpöshokki (+42 °C, 72 sekuntia), jolloin DNA:t menivät solujen sisään. Siirrettiin seokset jäihin hetkeksi. Näistä seoksista otettiin molemmista 100 µl eppendorf-putkiin ja lisättiin 900 µl SOC-liuosta ja laitettiin putket puoleksi tunniksi + 37 °C:seen. Seoksia sentrifugoitiin 5 minuuttia nopeudella

3000xg (Centrifuge 5415 D, Eppendorf AG), minkä jälkeen niistä pipetoitiin pois 800 µl supernatanttia. Ampisilliiniä sisältävälle LB-maljalle maljattiin 100 µl jäljelle jäänyttä seosta ja laitettiin maljat inkuboitumaan yön yli + 37 °C:seen.

3.4 Plasmidi-DNA:n eristäminen ja puhdistaminen

Molemmista yön yli kasvaneista maljoista siirrostettiin kaksi pesäkettä 3 ml:aan LB-liuosta niin, että yksi pesäke siirrostettiin aina 3 ml:aan LB-lientä. Ampisilliinia (100 mg/ml) lisättiin niin, että sen loppupitoisuus oli 100 µg/ml. Inkuboitiin ravistuksessa yön yli (+ 37 °C).

LB-liemessä kasvaneet DNA-näytteet, kaksi erittyvän NAM:n ja kaksi solunsisäisen NAM:n tuottoon tarkoitettua näytettä, puhdistettiin Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System -kitin (Promega) ohjeiden mukaisesti. Puhdistuksen jälkeen mitattiin kaikkien neljän DNA-näytteen konsentraatiot ND 1000 Spectrofotometer -laitteella.

Puhdistetuista DNA-näytteistä NAM_s (näytteet 1 ja 2) ja NAM_i (näytteet 1 ja 2) yhdistettiin niin, että toisessa eppendorf-putkessa oli 30 µg NAM_s-DNA:ta ja toisessa 30 µg NAM_i-DNA:ta. Tästä jaettiin molemmat DNA:t digestioita varten erikseen vielä kolmeen eri eppendorf -putkeen. Näin jokaisessa, yhteensä kuudessa putkessa, oli 10 µg DNA:ta ja näytetilavuudet olivat 59,0 µl (NAM_s) sekä 59,1 µl (NAM_i).

3.5 DNA-näytteiden digestio ja konsentroidi etanolisaostuksella

Digestiossa ekspressiovektori pilkottiin lineaariseksi ja siitä poistui *E. colissa* DNA-tuottoon tarvittava osa. Digestiossa käytetty restriktioentsyymi *Swa*I (New England Biolabs) katkaisi ekspressiovektorin kahdesta kohdasta, jolloin tuloksena syntyivät noin 2900 ja 8000 emäsparin fragmentit. Jälkimmäinen fragmentti sisälsi myös insertin, jonka koko oli noin 3000 emäsparia. Digestiot tehtiin eppendorf-putkissa, joihin lisättiin puhdistuksen jälkeiset DNA-näytteet (10 µg) ja lisäksi 10 U *Swa*I:tä ja 6 µg BSA:ta (New England Biolabs), joka suojaa reaktion aikana *Swa*I-entsyymiä. Puskurina reaktioissa käytettiin 10-kertaista NeBuffer 3:ta (New England Biolabs), joka laimeni lopullisessa reaktioseoksessa noin yksinkertaiseksi.

Digestioseoksia oli yhteensä kuusi, kolme NAM_s- ja kolme NAM_i-DNA:n digestioseosta, joiden reagenssit yhtä digestioseosta kohden on esitetty taulukossa 1.

Taulukko 1. Digestioseoksien reagenssit yhtä NAM_s ja NAM_i -reaktioseosta kohden. Yhteensä digestioseoksia oli kuusi, joista kolme oli NAM_s- ja kolme NAM_i-digestiota.

	NAM _s	NAM _i
DNA (169,5 ng/μl)	59,0 μl	59,1 μl
10x NEBuffer 3	5,8 μl	5,8 μl
100x BSA (10 mg/ml)	0,6 μl	0,6 μl
10 000 U/ml Swal	1,0 μl	1,0 μl

Näytteet sentrifugoitiin, minkä jälkeen niitä inkuboitiin 3 tuntia + 25 °C:n lämpötilassa. Digestion jälkeen restriktioentsyymi inaktivoitiin lämmittämällä seosta 20 minuuttia + 65 °C:ssa. Digestoidusta DNA:sta otettiin näyte (0,5 μl) agarosegelelelektroforeesia varten, millä varmistettiin digestion onnistuminen. Digestion jälkeen DNA-näytteet konsentroidtiin etanolisaostuksella eppendorfputkissa. Etanolisaostukset suoritettiin taulukossa 2 esitetyillä reagensseilla jokaiselle, yhteensä kuudelle digestioseokselle erikseen.

Taulukko 2. Etanolisaostukseen käytetyt reagenssit yhtä saostusreaktiota kohden. Saostusreaktioita tehtiin yhteensä kuusi, kolme NAM_s ja kolme NAM_i- saostusreaktiota.

	NAM _s	NAM _i
DNA (169,5 ng/μl)	58,0 μl	58,0 μl
5 M NaCl	2,3 μl	2,3 μl
99,5 % EtOH	116,0 μl	116,0 μl

5 M NaCl lisäyksen jälkeen seosta sekoitettiin, minkä jälkeen lisättiin 99,5 % etanolia kaksi kertaa seoksen tilavuus. Seosta sentrifugoitiin 10 minuuttia +4 °C:ssa, minkä jälkeen supernatantti kaadettiin pois. Tämän jälkeen lisättiin 750 μl 70 % jääkylmää etanolia ja sentrifugoitiin seosta 2 minuuttia +4 °C:ssa. Supernatantti poistettiin ja annettiin etanolin haihtua avonaisessa

ependorf-putkessa. Lopuksi DNA liuotettiin 20 µl:aan steriiliä vettä ja laitettiin -20 °C:seen.

3.6 Agarosigeelielektroforeesi

Digestion onnistuminen ja se, että DNA:ta oli jäljellä myös etanolisaostuksen jälkeen, varmistettiin agarosigeelielektroforeesilla. Ajossa käytettiin 1 % agarosigeeliä, johon lisättiin tippa DNA:han sitoutuvaa väriainetta, etidiumbromidia. Kontrollina toimi digestoimaton NAM-DNA ja molekyylikokostandardina 1 kb DNA ladder (GeneRuler). Digestoituja näytteitä ladattiin geelille noin 85 ng ja saostettuja sekä konsentroituja noin 100 ng. Näytepuskurina käytettiin kuusinkertaista latauspuskuriä (Fermentas). Konsentroiduista DNA-näytteistä tehtiin ensin laimennos veteen ja tästä otettiin 0,5 µl:n näyte geelille. Geelille ladatut näytteet on esitetty taulukossa 3.

Taulukko 3. Agarosigeelille ladatut digestoimattomat NAM-DNA kontrollit, molekyylikokostandardit sekä digestoidut ja konsentroidut NAM_s- ja NAM_i-DNA-näytteet

Kaivo	Näyte	Näyte (µl)	6x näytepuskuri	H ₂ O
1	mol.kokostandardi	4	-	-
2	NAM-kontrolli	0,5	1,5	8,0
3	NAM _s (näyte 1, digestoitu)	0,5	1,5	8,0
4	NAM _s (näyte 2, digestoitu)	0,5	1,5	8,0
5	NAM _s (näyte 3, digestoitu)	0,5	1,5	8,0
6	NAM _s (näyte 1, konsentroituu)	0,5	1,5	8,0
7	NAM _s (näyte 2, konsentroituu)	0,5	1,5	8,0
8	NAM _s (näyte 3, konsentroituu)	0,5	1,5	8,0
9	mol.kokostandardi	4	-	-
10	NAM-kontrolli	0,5	1,5	8,0
11	NAM _i (näyte 1, digestoitu)	0,5	1,5	8,0
12	NAM _i (näyte 2, digestoitu)	0,5	1,5	8,0
13	NAM _i (näyte 3, digestoitu)	0,5	1,5	8,0
14	NAM _i (näyte 4, konsentroituu)	0,5	1,5	8,0
15	NAM _i (näyte 5, konsentroituu)	0,5	1,5	8,0
16	NAM _i (näyte 6, konsentroituu)	0,5	1,5	8,0
17	mol.kokostandardi	4	-	-

Ajo suoritettiin Mini Sub cell GT (Bio-Rad) -laitteella 70 V:lla ja se pysäytettiin noin tunnin jälkeen. Ajon jälkeen geeli kuvattiin Quantity One -ohjelmalla.

3.7 *Leishmania tarentolae* -solujen transfektio

Leishmania tarentolae -solujen transfektiossa haluttiin optimoida DNA:n määrää, joten se päätettiin tehdä sekä 5 µg:lla että 10 µg:lla konsentroitua DNA:ta. Valmistajan kitin ohjeistus transfektioon oli 5 - 10 µg DNA:ta. Transfektioita varten laskettiin tarvittavan DNA:n määrä sekä erityyväle NAM:lle että solunsisäiselle NAM:lle. Erityyvä proteiinituottoa varten transfektioon 5 µg:lla DNA:ta otettiin NAM_s (näyte 1) -DNA:ta 14 µl ja 10 µg:lla NAM_s (näyte 2) -DNA:ta 18 µl. Solunsisäistä tuottoa varten NAM_i (näyte 1) -DNA:ta otettiin 13 µl 5 µg:n transfektiota varten ja NAM_i (näyte 3) -DNA:ta 15,5 µl 10 µg:n transfektiota varten. Muut DNA-näytteet, joita ei käytetty transfektiossa, laitettiin -20 °C:seen.

Päivää ennen transfektiota *Leishmania tarentolae* -solut jaettiin suhteissa 1:10, 1:20 ja 1:50 ja laitettiin kasvamaan lämpökaappiin + 25 °C:seen. Seuraavana päivänä solukasvatuksien tiheys mitattiin aallonpituudella 600 nm, ja transfektiota varten valittiin laimennos 1:20, sillä sen solutiheys oli 1,03 eli lähimpänä haluttua arvoa (noin 1). Transfektio suoritettiin elektroporaatiolla, jossa käytetään lyhyitä sähköiskuja, jotka aiheuttavat häiriöitä solukalvoon, mikä mahdollistaa DNA:n siirtymisen solun ulkopuolelta soluun. Kontrolleja, joihin lisättiin DNA:n sijasta pelkkää steriiliä vettä, tehtiin kaksi. Näistä toisella kokeiltiin elektroporaatiolaitteen asetuksia eikä tätä näytettä käytetty enää sen jälkeen.

Elektroporaatiokyvetit (Gene pulser cyvette, 0,2 cm, Bio-Rad) ja DNA:t laitettiin jäihin. Kahdeksaan steriiliin eppendorf-putkeen pipetoitiin soluja 1,2 ml ja yhteen putkeen 1,1 ml. Soluja sentrifugoitiin 5 minuuttia (2000xg), minkä jälkeen pelletti liuotettiin 0,5 ml:aan suodatettua (0,22 µm) LV-HEB -elektroporaatiopuskuria (Jena Bioscience). Seoksia sentrifugoitiin jälleen 5 minuuttia (2000xg), minkä jälkeen supernatantit poistettiin ja pelletit liuotettiin jälleen 0,5 ml:aan elektroporaatiopuskuria. Seoksien annettiin seistä huoneenlämmössä 5 minuuttia. Tämän jälkeen lisättiin 0,4 ml soluja sekä DNA:t kuuteen elektroporaatiokyvetiin. Laitettiin kyvetit jäihin 10 minuutiksi. Elektroporaatio suoritettiin 450 V:lla ja 450 µF:lla, laitteella Gene Pulser II (Bio-Rad). Kyseisillä asetuksilla aikavakiot saatiin lähelle aikavakioväliä, joka oli valmistajan kitin ohjeistuksen mukaan 3.5–4.5 millisekuntia. Aikavakio on yhden sähköpulsstin volttien määrään tarvittava aika [38, s.11].

Elektroporaation jälkeen transfektoituja soluja sisältäviä kyvettejä pidettiin jäässä noin 10 minuuttia, minkä jälkeen solut siirrettiin kyveteistä automaattipipetillä solukasvatuspulloihin, joissa oli valmiina 10 ml huoneenlämpöistä kasvatusliuosta sekä 100 μ l heminiä ja 50 μ l penisilliini-streptomysiini-antibioottia. Tämän jälkeen solukasvatukset laitettiin lämpökaappiin + 25 °C:seen.

Transfektiota seuraavana päivänä lisättiin 10 μ l nurseotrisiiniä (LEXSY NTC, Jena Bioscience) kaikkiin transfektoituihin soluihin selektiota varten. Solujen annettiin kasvaa 5 päivää, jonka jälkeen niiden kasvatusliuos vaihdettiin. Soluja sentrifugoitiin 5 minuuttia nopeudella 2000xg (Centrifuge 5810R, Eppendorf Nordic) ja pelletti liotettiin 1 ml:aan uutta kasvatusliuosta. Tämä siirrettiin uuteen kasvatuspulloon, jossa oli valmiina 9 ml uutta kasvatusliuosta, johon oli lisätty hemin sekä molemmat antibiootit; penisilliini-streptomysiini ja nurseotrisiini. Solujen kasvatusta jatkettiin +25 °C:ssa.

3.8 Aktiivisuusmittaukset

Aktiivisuusmittauksien tarkoituksena oli seurata erittyvän ja solunsisäisen NAM:n tuottoa. Aktiivisuusmittauksia tehtiin kerran päivässä ja niitä varten otettiin noin 700 μ l:n näyte solukasvatuksista, joista aktiivisuusmäärittelyyn otettiin 500 μ l soluja ja solukasvatuksen tiheyden mittaamiseen 100 μ l. Myöhemmin solutiheysmittauksissa käytettiin vain 50 μ l soluja. Solutiheysmittauksia varten valmistettiin näytteistä aina 1:10 laimennos, jotta sameus absorbanssina mitattuna aallonpituudella 600 nm olisi alle 1 ja näin ollen mittaustulos olisi luotettava.

Aktiivisuusmittaukset suoritettiin 96-kuoppalevyllä (PS Microplate, Greiner Bio-one), jonka kuoppiin pipetoitiin ensin 80 μ l liuosta, joka sisälsi seuraavat reagenssit (suluissa lopullinen pitoisuus yhtä reaktiota kohden):

400 mM MES, pH 6.5	25 μ l (100 mM)
10 mM CoCl ₂	10 μ l (1 mM)
5 mM PNP- α -man.	40 μ l (2 mM)
Milli-Q-vesi	5 μ l

Solunsisäisten NAM_i-näytteiden solut hajotettiin ensin sonikaatiolla (30 pulssia, laite: Bandelin Sonopuls), joka perustuu ultraäänen aiheuttamaan hydrostaattiseen paineeseen, joka muuttaa solukalvon permeabiliteettiä. Tämän jälkeen sonikoituja ja muita näytteitä sentrifugoitiin 5 minuuttia nopeudella 2000xg. Reaktio aloitettiin lisäämällä 20 µl:n näyte muodostuneesta supernatantista kuoppaan. Tehtiin kolme rinnakkaista mittausta jokaisesta näytteestä. Solunsisäisistä NAM_i-näytteistä otettiin näytteet myös syntyneestä pelletistä niin, että sentrifugoinnin jälkeen supernatantti poistettiin ja pelletti liuotettiin noin 60 µl:aan kasvatusliuosta. Tästä pipetoitiin 20 µl:n näytteet mittausta varten. Substraattina aktiivisuusmittauksissa toimi 4-nitrofenyyli- α -D-mannopyranosidi (Apollo Scientific), joka oli valmistettu liottamalla oikea määrä jauheena ollutta substraattia steriiliin veteen. Substraatin loppupitoisuus yhtä reaktiota kohden oli 2 mM. Kun kaivoihin oli pipetoitu reaktioseos ja näyte, kuoppalevyä inkuboitiin 30 minuuttia + 37 °C:n lämpötilassa. Tämän jälkeen reaktio pysäytettiin lisäämällä 100 µl lopetusseosta (13 mM glysiini, 67 mM NaCl, 83 mM Na₂CO₃, pH 10.7), joka muuttaa seoksen pH:ta ja pysäyttää reaktion. Aktiivisuudet mitattiin Thermo Scientific Multiskan-laitteella aallonpituudella 405 nm.

Aktiivisuuksista vähennettiin aina transfektoimattomien solujen aiheuttama tausta eli niiden mitattu aktiivisuus. Lopullista aktiivisuutta määritettäessä tuloksia verrattiin solukasvatuksen tiheyteen aallonpituudella 600 nm ja laskuissa käytettiin kaavaa

$$\text{Aktiivisuus} = \left(\frac{1}{A_{600}} \right) \cdot (A_{405}(\text{näyte}) - A_{405}(\text{tausta})).$$

Erittyvän NAM-proteiinin tuotto ei lähtenyt toivotulla tavalla käyntiin ja aktiivisuus pieneni nopeasti. Neljännen mittauspäivän jälkeen aktiivisuutta ei enää ollut erittyvän NAM:n solukasvatuksissa.

Solunsisäisen NAM:n aktiivisuus säilyi kauemmin solukasvatuksissa. Tästä johtuen aktiivisuusmittauksia päätettiin jatkaa ainoastaan solunsisäisestä NAM:sta. Aktiivisuutta seurattiin eri solutiheyden arvoilla aallonpituudella 600 nm, jotta pystyttäisiin optimoimaan solujen kasvuvaihe, jossa ne tuottaisivat mahdollisimman aktiivista proteiinia myöhemmin tehtävää proteiinipuhdistusta varten. Soluja jaettiin joidenkin mittauspäivien välissä suhteissa 1:10 ja

1:20. Aktiivisuusmittausten yhteydessä kokeiltiin transfektoitujen solujen kasvatusta myös ravistelussa huoneenlämmössä 250 ml:n erlenmeyerissä.

3.9 Soluhajotuksen optimointi

Työn aikana optimoitiin soluhajotusta erityisesti tulevaa proteiinipuhdistusta varten. Optimoinnin avulla määritettäisiin sellaiset soluhajotuksen olosuhteet, joilla solunsisäinen NAM-proteiini vapautuisi tehokkaimmin kasvatusliuokseen. Soluhajotukset tehtiin pienissä tilavuuksissa eppendorf-putkissa. Soluhajotuksessa optimoitiin sekä sonikointia että Triton-X-100 -käsittelyä ja myös näiden kahden sekoitusta. Solujen resuspensoinnissa käytettiin 20 mM MOPS -puskuria, jota oli tarkoitus käyttää soluhajotuksessa ennen proteiinipuhdistuksen aloittamista, sillä 20 mM MOPS toimisi puskurina proteiinipuhdistuksissa. Soluhajotusnäytteisiin otettujen solujen tiheys aallonpituudella 600 nm oli 2,1.

Sonikoinnissa pulssien ja solujen resuspensointiin käytettyä 20 mM MOPS-puskurin määrää vaihdeltiin ja näin saatiin selville, mikä pulssimäärä hajottaisi solut tehokkaimmin ja vapauttaisi solunsisäisen NAM_i-proteiinin. 500 µl soluja sentrifugoitiin (5 minuuttia, 2000xg) eppendorf-putkissa, minkä jälkeen solut resuspensoitiin joko 250 µl:aan tai 500 µl:aan 20 mM MOPS -puskuria. 10 pulssin näytteissä oli vain 300 µl soluja. Sonikoinnissa käytetyt näytteet ja niiden pulssimäärät on esitetty taulukossa 4.

Taulukko 4. Sonikoinnissa käytetyt näytteet ja niiden pulssimäärät

Näyte	Soluja (µl)	20 mM MOPS	Sonikointi (pulssit)
1	300	250	10
2	500	250	20
3	500	250	30
4	300	500	10
5	500	500	20
6	500	500	30

Triton-X-100 -soluhajotuksessa kokeiltiin, kuinka hyvin solunsisäinen NAM-proteiini vapautuu eri määrillä kyseistä detergenttiä, joka hajottaa *Leishmania tarentolae* -solujen solukalvon. 500 µl soluja sentrifugoitiin eppendorf-putkien pohjalle ja ne resuspensoitiin 100 µl:aan, 250 µl:aan ja 500 µl:aan 1 % Triton-X-100 -detergenttiä, joka oli laimennettu 20 mM MOPS -puskuriin

15 %:sta Triton-X-100:sta. Resuspensoinnin jälkeen näytteiden annettiin olla jäissä noin puoli tuntia, minkä jälkeen ne sentrifugoitiin (5 minuuttia, 2000xg) ja supernatanteista otettiin 20 µl:n näytteet aktiivisuusmittauksia varten. Näytteet, joissa solut resuspensoitiin 1 % Triton-X-100:lla, on esitetty taulukossa 5.

Taulukko 5. 1 % Triton-X-100:lla käsitellyt näytteet

Näyte	Soluja (µl)	1 % Triton-X-100 (µl)
1	500	100
2	500	250
3	500	500

Soluhajotusta kokeiltiin myös niin, että eppendorf-putken pohjalle sentrifugoidut solut (5 minuuttia, 2000xg) resuspensoitiin sekä 250 µl:aan että 500 µl:aan 20 mM MOPS -puskuria, minkä jälkeen niitä sonikoitiin 10:llä ja 30 pulssilla. Sonikoinnin jälkeen lisättiin vielä 17 µl ja 33 µl 15 % Triton-X-100 -detergenttiä ja laitettiin seokset jäihin. Tämän jälkeen soluja sentrifugoitiin (5 min, 2000xg) ja supernatantista otettiin 20 µl:n näyte aktiivisuusmittausta varten. Näytteet, joihin sonikoinnin jälkeen lisättiin vielä 15 % Triton-X-100 -detergenttiä on esitetty taulukossa 6.

Taulukko 6. Sonikoidut ja 15 % Triton-X-100:lla käsitellyt näytteet

Näyte	Soluja (µl)	20 mM MOPS	Sonikointi (pulssit)	15 % Triton-X-100 (µl)
1	500	250	30	17
2	500	500	30	33

Mittaukset tehtiin näytteiden käsittelyjen jälkeen kuten aktiivisuusmittaukset ja jokaisesta näytteestä tehtiin kolme rinnakkaista mittausta.

3.10 *Leishmania tarentolae* -tuottokantojen säilöminen

Erittyvää NAM:a muutamia päiviä tuottaneista soluista päätettiin tehdä glyseroliputkia, vaikka tuotto ei onnistunutkaan pitkäaikaisesti ja aktiivisuutta ei enää ilmennyt. Myös solunsisäisiä NAM_i-tuottokantoja säilöttiin myöhemmin. Glyceroliputkiin (Cryo Pure tube, Sarstedt), joiden tilavuus oli 1,6 ml, pipetoiittiin 1,2 ml soluja ja 0,4 ml 99,5 % glyserolia. Tämän jälkeen putkia pidettiin

noin 10 minuuttia huoneenlämmössä, minkä jälkeen ne siirrettiin jäihin noin tunniksi ja edelleen yöksi -20 °C:seen. Seuraavana päivänä putket siirrettiin -80 °C:seen. Näistä glyseroliputkista herätettiin erittyvää NAM:a hetken tuotaneet solut myöhemmin ja mitattiin niistä NAM-aktiivisuus, mutta sitä ei edelleenkään ilmennyt.

4 TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU

4.1 *Escherichia colissa* tuotettujen plasmidi-DNA-näytteiden karakterisointi

Puhdistettujen, *Escherichia colissa* tuotettujen plasmidi-DNA-näytteiden konsentraatiot sekä puhtaus mitattiin ND-1000 Spectrofotometer -laitteella (Thermo Scientific). Puhdistuksien jälkeiset konsentraatiot on esitetty taulukossa 7.

Taulukko 7. Puhdistettujen NAM_s- ja NAM_i - DNA-näytteiden konsentraatiot ennen näytteiden yhdistämistä digestioita varten

DNA	ng/μl
NAM _s (näyte 1)	171,2
NAM _s (näyte 2)	167,6
NAM _i (näyte 1)	188,6
NAM _i (näyte 2)	143,9

Puhdistettujen DNA-näytteiden konsentraatiot vaihtelivat välillä 143,9–188,6 ng/μl. Jokaisen näytteen tilavuus puhdistuksen ja konsentraatiomittauksen jälkeen oli 98 μl.

Taulukossa 8 on esitetty DNA-näytteiden konsentraatiot etanolisaostuksen jälkeen sekä niiden puhtaus (A_{280}/A_{260}).

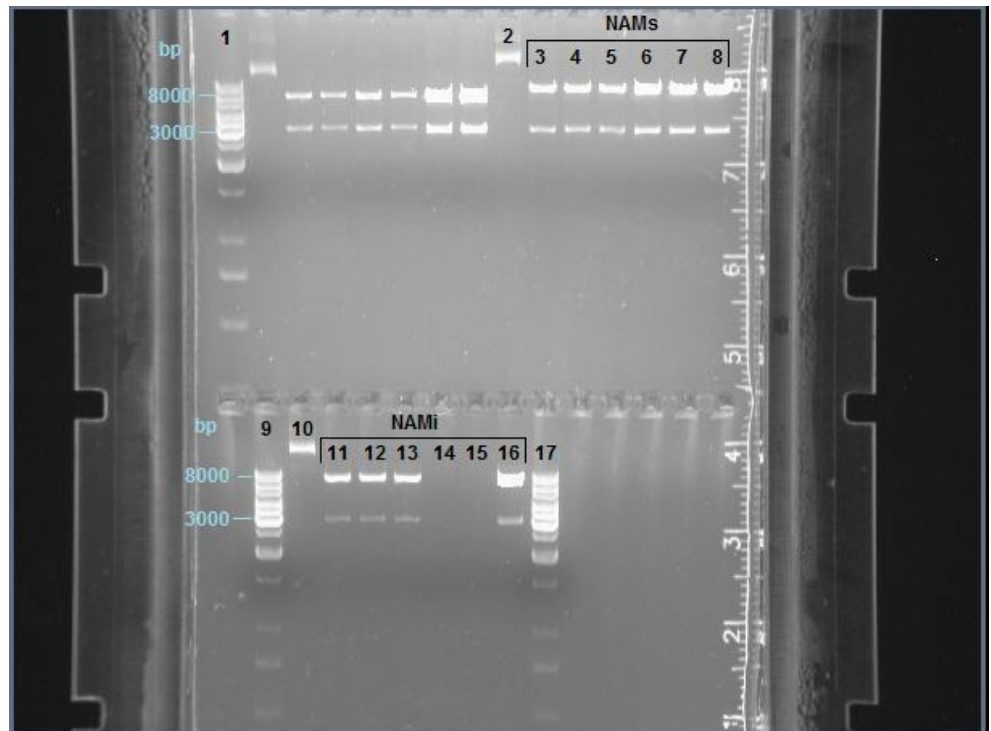
Taulukko 8. DNA-näytteiden (laimennettu 1:5) konsentraatiot sekä puhtaus (A_{280}/A_{260}) etanolisaostuksen jälkeen. Kaikkien näytteiden tilavuus etanolisaostuksen ja konsentraatiomittauksen jälkeen oli 18 μ l.

DNA	ng/ μ l (1:5)	ng/ μ l	A_{280}/A_{260}
NAM _s (näyte 1)	71,2	356,0	1,83
NAM _s (näyte 2)	111,9	559,5	1,81
NAM _s (näyte 3)	91,6	458,0	1,82
NAM _i (näyte 1)	76,8	384,0	1,90
NAM _i (näyte 2)	96,0	480,0	1,86
NAM _i (näyte 3)	129,8	649,0	1,83

Puhtaalle DNA:lle A_{280}/A_{260} -suhde on noin 1,90, joten DNA-näytteet olivat melko puhtaita. Jokaisen etanolisaostetun DNA-näytteen tilavuus oli etanolisaostuksen ja konsentraatiomittauksen jälkeen 18 μ l ja konsentraatiot vaihtelivat välillä 356-649 ng/ μ l. Nämä konsentraatiot olivat riittäviä transfektioita varten.

4.2 Swal-digestioiden onnistumisen tarkistus agarosigeelielektroforeesilla

NAM_s ja NAM_i DNA-näytteiden Swal-digestioiden ja etanolisaostuksien onnistuminen tarkistettiin agarosigeelielektroforeesilla. Kuvassa 9 on esitetty kuvattu agarosigeeli ja siinä olleet digestoidut ja etanolisaostuksella konsentroidut DNA-näytteet.



Kuva 9. Kuvattu agarosigeeli. NAM_s - näytteet 3-5 ja NAM_l - näytteet 11-13 ovat digestoituja DNA-näytteitä. NAM_s - näytteet 6-8 ja NAM_l -näyte 16 ovat konsentroituja DNA-näytteitä. Molekyylikokostandardeista (näytteet 1, 9 ja 17) on merkitty 8000 ja 3000 emäsparin (bp) vyöhykkeet ja näytteet 2 ja 10 ovat NAM -DNA kontrolleja. Ylärivin ensimmäisissä kaivoissa olevat näytteet eivät liity tähän työhön.

Kuvatun agarosigeelin perusteella (kuva 9) kaikki *Swal*-digestiot olivat onnistuneet, sillä DNA-vyöhykkeiden koot olivat odotetut, noin 3000 ja 8000 emäsparia, kun niitä verrattiin molekyylikokostandardiin. Kaivoissa 14 ja 15 ei voida havaita vyöhykkeitä lainkaan, sillä ilmeisesti näytteeseen ei vahingossa pipetoitu lainkaan kyseistä etanolisaostettua ja konsentroitua DNA:ta.

4.3 *Leishmania tarentolae* -solujen transfektio

Leishmania tarentolae -solujen transfektio suoritettiin kahdella eri DNA-konsentraatiolla (5 μ g ja 10 μ g) optimoiden näin proteiinituottoon riittävää DNA-määrää.

Transfektiossa käytetyn elektroporaation aikavakiot on esitetty taulukossa 9. Kontrollit eivät sisältäneet lainkaan DNA:ta, vaan sen tilalla käytettiin steriiliä vettä. Kontrollinäytettä 1 käytettiin ainoastaan elektroporaatiolaitteen asetusten tarkistamisessa.

Taulukko 9. Elektroporaatioiden aikavakiot millisekunteina. Aikavakio on yhden sähköpulssin volttien määrään tarvittava aika. Suluissa on esitetty DNA:n määrä kussakin näytteessä. Kontrollinäytteissä DNA:n tilalla käytettiin steriiliä vettä.

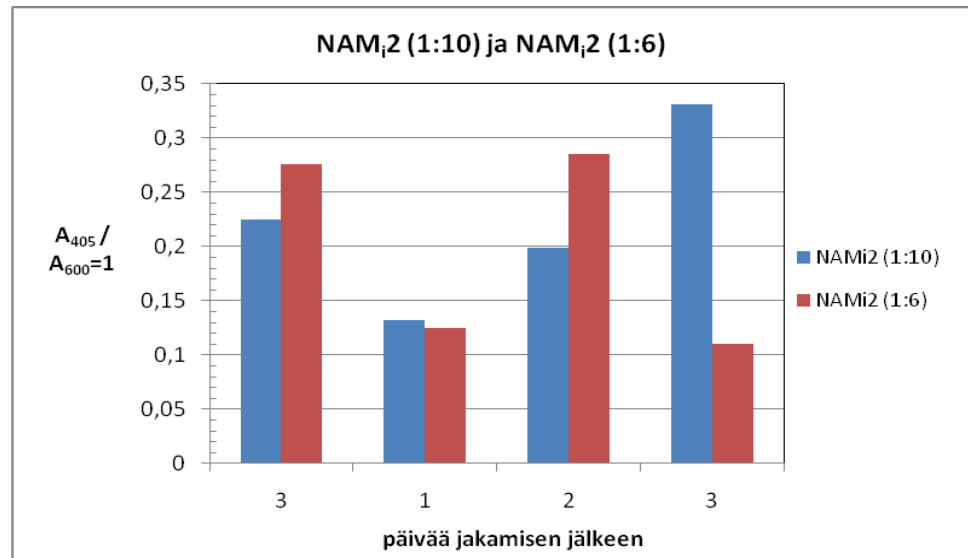
Näyte	aikavakio (millisekuntia)
Kontrolli (näyte 1)	4,4
Kontrolli (näyte 2)	4,4
NAM _s 1 (5 µg)	4,4
NAM _s 2 (10 µg)	4,5
NAM _i 1 (5 µg)	4,7
NAM _i 2 (10 µg)	4,6

Transfektion jälkeen soluja tarkasteltiin mikroskoopilla. Heti transfektion jälkeen solut eivät juuri liikkuneet ja ne näyttivät lähes kuolleilta. Noin viikko transfektion jälkeen solut alkoivat näyttää paremmilta ja ne lisääntyivät ja liikkuivat. Puolentoista viikon jälkeen näkyi ero transfektioiden välillä; enemmän DNA:ta sisältävissä solukasvatuksissa solut olivat lisääntyneet enemmän. Myös 5 µg DNA:ta sisältävässä NAM_i-kasvatuksessa solut olivat lisääntyneet. Kontrollikasvatuksessa soluja oli enää vähän, ne olivat kuolleita ja kasvatusliuos oli kirkasta. Tämä osoitti, etteivät kontrollisolut, joihin ei ollut lisätty DNA:ta, pystyneet elämään selektiivisessä kasvatusliuoksessa. Tästä pääteltiin, että selektio oli onnistunut.

4.4 NAM-proteiinituoton seuraaminen aktiivisuusmittauksilla

Erityyvä NAM-proteiini tuottui vain muutamia päiviä solukasvatuksissa ja neljännen mittauspäivän jälkeen aktiivisuutta ei enää ollut. Solunsisäisen NAM:n aktiivisuus säilyi kauemmin solukasvatuksissa. Tästä johtuen aktiivisuusmittauksia päätettiin jatkaa ainoastaan solunsisäistä NAM:a tuottavista solukasvatuksista. Kuvassa 10 on esitetty kahden alkuperäisestä transfektoidusta NAM_i-solukasvatuksesta tehtyjen laimennoksien (1:10 ja 1:6) aktiivisuudet laskettuina solukasvatuksen tiheyttä $A_{600}=1.0$ kohden neljänä eri mit-

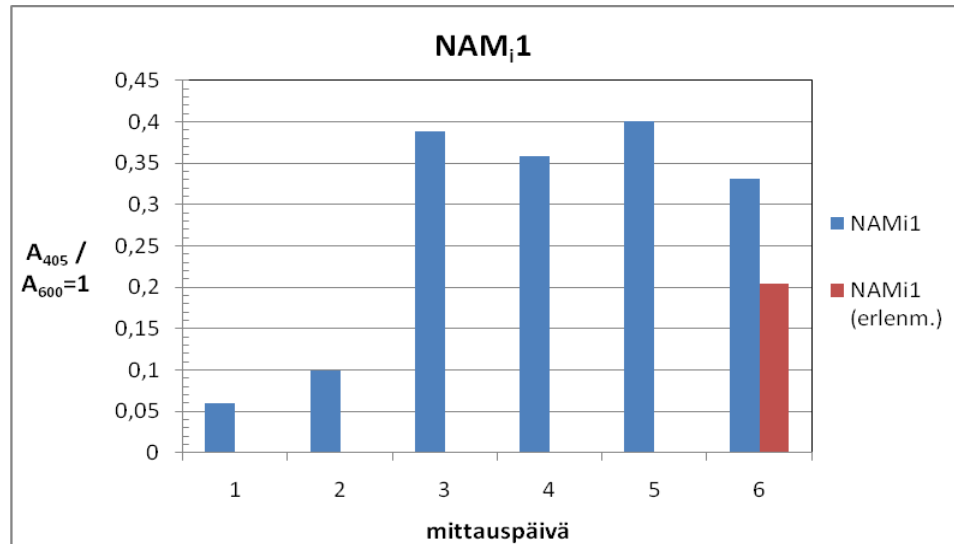
tauspäivänä. Nämä solut oli jaettu 15 päivää transfektion jälkeen suhteissa 1:10 ja 1:6 ja ensimmäinen aktiivisuusmittaus tehtiin kolme päivää jakamisen jälkeen. Ensimmäisen mittauspäivän jälkeen molemmat solukasvatukset jaettiin suhteessa 1:20, jotta ne eivät olisi kasvaneet liian suureen tiheyteen.



Kuva 10. NAM_i2-solukasvatusten aktiivisuudet laskettuina solutiheyttä $A_{600}=1$ kohden neljänä eri mittauspäivänä. Solut oli jaettu 15 päivää transfektion jälkeen suhteissa 1:10 ja 1:6. Näistä mitattiin ensimmäisen kerran aktiivisuus kolme päivää jakamisen jälkeen. Solukasvatukset jaettiin jälleen ensimmäisen mittauspäivän jälkeen suhteessa 1:20.

NAM_i2(1:10)-solukasvatuksen aktiivisuus solukasvatuksen tiheyttä $A_{600}=1$ kohden nousi selvemmin solujen jakamisen jälkeen. NAM_i2(1:6)-solukasvatuksessa aktiivisuus nousi jakamisen jälkeen mutta kääntyi seuraavana päivänä laskuun.

Kuvassa 11 on esitetty solunsisäisen NAM_i 1 -solukasvatuksen aktiivisuus laskettuna solutiheyttä $A_{600}=1.0$ kohden kuutena eri mittauspäivänä. Soluille vaihdettiin kasvatusliuos ensimmäisen mittauspäivän jälkeen ja ne jaettiin suhteissa 1:10 ja 1:4 viidennen mittauspäivän jälkeen. Näistä suhteessa 1:4 jaettuja soluja (tilavuus 25 ml) kasvatettiin ravistelussa (150 rpm), 250 ml:n erlenmeyerissä huoneenlämmössä yli yön.

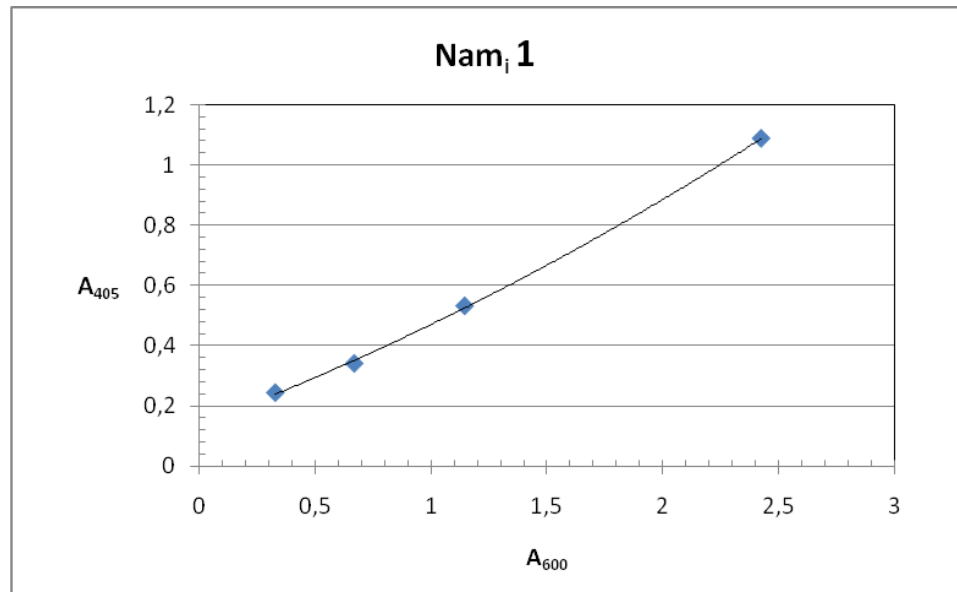


Kuva 11. NAM_i1- solukasvatusten aktiivisuus laskettuna solutiheyttä $A_{600}=1.0$ kohden kuutena eri mittauspäivänä. Viidennen mittauspäivän jälkeen solut jaettiin suhteissa 1:10 ja 1:4. Näistä suhteessa 1:4 jaettua, 25 ml:n solukasvatusta (NAM_i1 (erlenm.)) kasvatettiin 250 ml:n erlenmeyerissä huoneenlämmössä ravistelussa (150 rpm) yön yli ja seuraavana päivänä mitattiin myös sen aktiivisuus.

Aktiivisuus kasvoi selvästi solutiheyden noustessa ja myös huoneenlämmössä yön yli kasvaneessa solukasvatuksessa oli NAM-aktiivisuutta. Tästä pääteltiin, että jos soluja halutaan kasvattaa suuremmissa tilavuuksissa, se onnistuisi myös ravistelussa huoneenlämmössä.

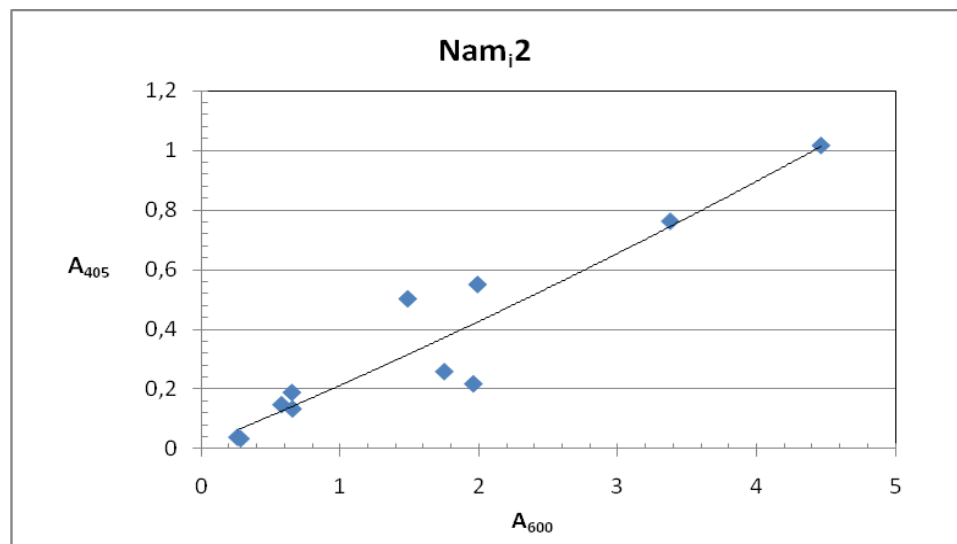
Tämän työn jälkeen tehtävää solunsisäisen NAM-proteiinin puhdistusta varten määritettiin, kuinka totaaliaktiivisuuden määrä riippuu solukasvatuksen tiheydestä aallonpituudella 600 nm. Näin saataisiin arvio siitä, missä vaiheessa NAM:n aktiivisuus olisi suurimmillaan ja milloin proteiinipuhdistus solukasvatuksesta kannattaisi aloittaa.

Kuvassa 12 on esitetty NAM_i1-solukasvatusten totaaliaktiivisuus (tausta vähennetty) verrattuna solutiheyteen aallonpituudella 600 nm neljänä eri mittauspäivinä.



Kuva 12. NAM_i1-solukasvatuksien totaaliaktiivisuus (A_{405}) verrattuna solukasvatuksen tiheyteen aallonpituudella 600 nm (A_{600}) neljänä eri mittauspäivänä.

Kuvassa 13 on esitetty NAM_i2-solukasvatuksien totaaliaktiivisuus verrattuna niiden tiheyteen aallonpituudella 600 nm yhteensä kymmenenä eri mittauspäivänä. NAM_i2-solukasvatuksia on jaettu mittauspäivien välillä ja tuloksiin on otettu kaikkien kyseisten solukasvatuksien aktiivisuus- ja sameusmittauksien tulokset.



Kuva 13. NAM_i2-solukasvatuksien totaaliaktiivisuus (A_{405}) verrattuna niiden tiheyteen aallonpituudella 600 nm (A_{600}) kymmenenä eri mittauspäivänä.

NAM_i1-solukasvatuksessa aktiivisuus nousee hieman selvemmin suhteessa solukasvatuksen tiheyteen aallonpituudella 600 nm mutta myös NAM_i2

-solukasvatuksissa on nähtävissä melko selkeästi, kuinka aktiivisuus nousee solujen tiheyden noustessa muutamaa mittauspistettä lukuun ottamatta.

Aktiivisuusmittauksien tuloksista siis pääteltiin, että aktiivisuus nousee solukasvatuksen tiheyden noustessa. Tämän työn jälkeen tehdyissä proteiinipuhdistuksissa päätettiin käyttää soluja, joiden solutiheys aallonpituudella 600 nm olisi mahdollisimman korkea. Tällöin myös aktiivisen NAM-proteiinin määrä olisi mahdollisimman suuri ennen proteiinipuhdistuksen ensimmäistä vaihetta.

4.5 *Leishmania tarentolae* -soluhajotuksen optimointi

Soluhajotuksen optimoinnissa käytetyn sonikoinnin tulokset eri resuspensointi- ja pulssimäärillä on esitetty taulukossa 10. Tuloksia on verrattu 500 µl:n tilavuuteen.

Taulukko 10. Sonikoinnin optimointi. Aktiivisuus on esitetty kolmen rinnakkaisen näytteen keskiarvona (A_{405} , ka.), josta on myös vähennetty transfektoimattomien solujen aiheuttama tausta (A_{405} , tausta vähennetty). Lopullista aktiivisuutta on verrattu 500 µl:n tilavuuteen ($A_{405}/500$ µl).

Soluja (µl)	20 mM MOPS (µl)	Sonikointi (pulssit)	A_{405} (ka.)	A_{405} (tausta vähennetty)	$A_{405} / 500$ µl
300	250	10	0,289	0,242	0,145
500	250	20	0,399	0,352	0,176
500	250	30	0,418	0,371	0,189
300	500	10	0,151	0,104	0,062
500	500	20	0,241	0,194	0,194
500	500	30	0,231	0,184	0,184

Taulukossa 11 on esitetty eri Triton X-100 -määrillä tehdyn soluhajotuksen tulokset. Lopullista aktiivisuutta verrattiin 500 µl:n tilavuuteen, jotta kaikki tulokset olisivat verrattavissa toisiinsa.

Taulukko 11. Triton X-100 -soluhajotuksen optimointi. Mitattu aktiivisuus on esitetty kolmen rinnakkaisen mittauksen keskiarvona (A_{405} , ka.), josta on myös vähennetty transfektoimattomien solujen aiheuttama tausta eli niiden mitattu aktiivisuus. Lopullista aktiivisuutta on verrattu 500 µl:n tilavuuteen ($A_{405}/500$ ml).

Soluja (µl)	1 % Triton-X-100 (µl)	A_{405} , ka.	A_{405} (tausta vähennetty)	$A_{405}/500$ µl
500	100	0,462	0,415	0,083
500	250	0,278	0,231	0,116
500	500	0,183	0,136	0,136

Taulukossa 12 on esitetty sekä sonikoinnilla että 15 % Triton-X-100:lla käsitellyt näytteet ja niiden mitatut aktiivisuudet.

Taulukko 11. Sonikoinnilla ja Triton-X-100:lla käsiteltyjen näytteiden mitatut aktiivisuudet. Aktiivisuudet on esitetty kolmen rinnakkaisen mittauksen keskiarvona (A_{405} , ka.) Myös tausta on vähennetty (A_{405} , tausta vähennetty). Lopullista aktiivisuutta on verrattu 500 µl:n tilavuuteen ($A_{405}/500$ µl).

Soluja (µl)	20 mM MOPS	Sonikointi (pulssit)	15 % Triton-X-100 (µl)	A_{405} , ka.	A_{405} (tausta vähennetty)	$A_{405} / 500$ µl
500	250	30	17	0,204	0,157	0,157
500	500	30	33	0,301	0,254	0,127

Soluhajotuksen optimoinnin tuloksista huomataan, että Triton-X-100 -soluhajotus ei antanut niin hyviä tuloksia kuin sonikointi, sillä mitatut aktiivisuudet olivat suurempia, kun solut hajotettiin sonikoinnilla. Paras tulos saavutettiin sonikoimalla, kun solut resuspensoitiin samaan tilavuuteen eli 500 µl:aan 20 mM MOPS:a ja käyttämällä 30 pulssia. Myös sonikointi 20 pulssilla ja resuspensoimalla solut puoleen niiden alkuperäisestä tilavuudesta (250 µl) antoi lähes saman tuloksen. Myöhemmissä aktiivisuusmittauksissa ennen proteiinipuhdistuksen aloittamista soluhajotus solunsisäisen NAM-proteiinin vapauttamiseksi kasvatusliuokseen päätettiin suorittaa sonikoinnilla, jossa käytettiin 30:tä pulssia ja 500 µl soluja, jotka resuspensoitiin 500 µl:aan 20 mM MOPS:a.

5 YHTEENVETO

Tämän työn tavoitteena oli tuottaa ihmisen neutraalia α -mannosidaasia myöhemmin tehtävää proteiinipuhdistusta, kiteytystä ja edelleen rakennetutkimusta varten, sillä ihmisen neutraalin α -mannosidaasin kolmiulotteista rakennetta ei vielä ole saatu selville. Tuotto tapahtui *Leishmania tarentolae*-alkueläimessä uudella LEXSY-tuottomenetelmällä sekä erittyvästi että solunsisäisesti. Aiemmat *Pichia pastoris* -hiivassa tehdyt neutraalin α -mannosidaasin tuottokokeet ovat osoittaneet, että erittyvä tuotto antaa huomman saannon kuin solunsisäinen tuotto. Erittyvä tuotto helpottaisi kuitenkin proteiinin eristystä ilman puhdistushäntää.

Solunsisäisen ihmisen neutraalin α -mannosidaasin tuotto onnistui ja se tuotui aktiivisena *Leishmania tarentolaessa*. Tuotto oli riittävä tämän työn jälkeen tehtyjä proteiinipuhdistuksia varten. Muutamien puhdistuskokeilujen jälkeen proteiiniin päätettiin kuitenkin liittää proteiinipuhdistusta helpottava puhdistushäntä, sillä proteiini ei puhdistunut tarpeeksi käytetyillä puhdistusmenetelmillä ja proteiinisaanto puhdistuksen jälkeen oli pieni. Puhdistusmenetelmiä ihmisen solunsisäiselle neutraalille α -mannosidaasille kehitetään edelleen.

Sen sijaan erittyvä ihmisen neutraali α -mannosidaasi tuotui soluissa vain hyvin vähän aikaa ensimmäisten aktiivisuusmittauksien jälkeen ja sen aktiivisuus laski nopeasti. Yksi syy tähän saattaa olla proteiinin hajoaminen kasvatusliuoksessa sen jälkeen, kun proteiini on erittynyt solujen ulkopuolelle. Erittyvän NAM:n tuottoa kokeiltiin tämän työn jälkeen vielä valmistajan uudella transfektio-protokollalla mutta tuotto ei edelleenkään onnistunut. Erittyvän NAM:n tuottoa tullaan siis edelleen kehittämään ja tutkimaan syitä kyseisen proteiinin nopeaan hajoamiseen kasvatusliuoksessa solujen ulkopuolelle erittymisen jälkeen.

Myös valmistajan kitti proteiinituottoon LEXSY-tuottomenetelmällä on muuttunut ekspressiovektorin ja transfektion suhteen. Transfektio suoritetaan uuden kitin protokollan mukaan solujen omassa kasvatusliuoksessa ja siinä käytetään vain 0,1 – 5 μ g DNA:ta. Tällä uudella protokollalla tehdyissä transfektioissa *Leishmania tarentolae* -solut ovat näyttäneet voivan paremmin heti elektroporaation jälkeen. Solujen toipuminen elektroporaatiosta on yksi tärkeimmistä vaiheista, ja mitä useampi solu selviää siitä, sitä nopeammin ne

alkavat lisääntyä ja tuottaa haluttua proteiinia. Elektroporaation onnistuminen on siis yksi tärkeimmistä vaiheista proteiinien tuotossa.

Tuottomenetelmänä LEXSY on osoittautunut hyväksi ja lupaavaksi vaihtoehdoksi erityisesti sen edullisuuden, proteiineissa toteutuvien translaation jälkeisten muokkauksien, siinä käytettävien solujen helpon käsittelyn sekä niiden nopean jakautumisen takia. LEXSY:llä on tuotettu jo useita proteiineja, esimerkiksi aktiivista ja N-glykolysoitua ihmisen erytropoietiinia, sekä rakennetutkimuksia varten ihmisen Cu/Zn - superoksididismutaasia [37; 39].

LEXSY-proteiinituottomenetelmää kehitetään koko ajan myös valmistajan toimesta, ja esimerkiksi siinä käytettävien ekspressiovektoreiden kehittäminen tulee mahdollistamaan erilaisten proteiinien yhä tehokkaamman tuoton tulevaisuudessa *Leishmania tarentolae* -alkueläimessä.

VIITELUETTELO

- [1] Makarow, Marja – Simonen, Marjo – Ulmanen, Ismo, Geenistä koeputken kautta proteiiniksi. *Duodecim* 4 (1996), s. 325–336.
- [2] Suominen, Ilari – Ollikka, Pauli: *Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet*. Helsinki: Hakapaino Oy. 2006.
- [3] Consuelo Gomez et al. Regulation of gene expression in Protozoa Parasites. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010 (2010).
- [4] Chou, Kuo-Chen. Prediction of Protein Signal Sequences. *Current Protein and Peptide Science* 3 (2002), s. 615–622.
- [5] Chou, Kuo-Chen. Prediction of Protein Signal Sequences and Their Cleavage Sites. *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics* 42 (2001), s. 136–139.
- [6] Premier Biosoft International. *Post Translational Modifications*. [verkkodokumentti, viitattu 24.8.2010]. Saatavissa: <http://www.premierbiosoft.com/glycan/glossary/post-translational-modifications.html>.
- [7] Hytönen, Vesa. *Rekombinanttiproteiinien tuotto ja puhdistus*. [verkkodokumentti, viitattu 10.8.2010]. Saatavissa: www.laborantti.net/Rekombinanttiproteiinien_tuotto_ja_puhdistus_2.ppt
- [8] Suomen virtuaaliyliopisto: Solunetti. *Proteiinien tuottaminen*. [verkkodokumentti, viitattu 13.8.2010]. Saatavissa: http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/proteiinien_tuottaminen/2/
- [9] Sambrook, Joseph – Russel, David W. : *Molecular cloning: a laboratory manual* Volume 3, 3rd edition, unit 15. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.
- [10] Gray, David. Overview of Protein Expression by Mammalian Cells. *Current protocols in Protein Science*, unit 5.9 (1997).
- [11] Filén, Jan-Jonas. *Proteiinien tuottoon käytettävien organismien eukaryootti-proteiineihin tekemät glykolysaatiot*. Pro gradu -tutkielma. Turun yliopisto, Biokemia. Turku. 2001.
- [12] Tuan, Rocky S. *Methods in molecular biology: Recombinant gene expression protocols*, volume 62. New Jersey, USA: Humana Press Inc. 1997.
- [13] Soinin, Raija. *Miten ja miksi siirtogeenisiä eläimiä tehdään?* [Verkkodokumentti, viitattu 13.8.2010]. Saatavissa: http://www.bioteknologia.info/FAQ/yleiset_kysymykset/fi_FI/yleiset_kysymykset_10_4_1/.
- [14] Twyman, Richard M. ym. Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *TRENDS in Biotechnology* 21:12 (2003).

- [15] Moremen, Kelley W – Molinari, Maurizio. N-glycan recognition and processing: the molecular basis of endoplasmic reticulum quality control. *Current opinion in Structural Biology* 16 (2006).
- [16] Helenius, Ari – Aebi, Markus. Roles of N-Linked Glycans in the Endoplasmic reticulum. *Annual Review of Biochemistry* 73 (2004), s. 1019–1049.
- [17] Ruddock, Loyd W. – Molinari, Maurizio. N-glycan processing in ER quality control. *Journal of Cell Science* 119 (2006), s. 4373–4380.
- [18] Swiss-Prot Protein knowledgebase. Glycosyl hydrolases families. [verkkodokumentti, viitattu 24.8.2010]. Saatavissa: <http://www.expasy.ch/cgi-bin/lists?glycosid.txt>
- [19] Kuokkanen, Elina ym. Characterization and subcellular localization of human neutral class II α -mannosidase cytosolic enzymes/free oligosaccharides/glycosidehydrolase family 38/M2C1/N-glycosylation. *Glycobiology* 17:10 (2007), s. 1084–1093.
- [20] Herscovics, Annette. Importance of glycosidases in mammalian glycoprotein biosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1473 (1999), s. 96–107.
- [21] Protein Data Bank. *The Structure of the Bovine Lysosomal α -mannosidase Suggests a Novel Mechanism for Low pH Activation*. [verkkodokumentti, viitattu 1.8.2010]. Saatavissa: <http://www.pdb.org/pdb/explore/jmol.do?structureId=1O7D&bionumber=1>
- [22] Malm, Dag – Nilssen, Oivind: Alpha-mannosidosis. *Orphanet Journal of rare diseases* 3:21 (2008).
- [23] Basile, Giancarlo – Peticca, Manuela. Recombinant Protein Expression in *Leishmania tarentolae*. *Molecular Biotechnology* 43:3 (2009), s. 273–278.
- [24] Teixeira, S.M.R. Control of gene expression in Trypanosomatidae. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 31 (1998), s.1503–1516.
- [25] Stanford University. *Leishmania Life Cycle*. [verkkodokumentti, viitattu 4.7.2010]. Saatavissa: <http://www.stanford.edu/class/humbio103/ParaSites2003/Leishmania/Leish%20Biology.html>
- [26] Mizbani, Amir et al. Recombinant *Leishmania tarentolae* expressing the A2 virulence gene as a novel candidate vaccine against visceral leishmaniasis. *Vaccine* 28:1 (2009), s. 53–62.
- [27] Jena Bioscience GmbH. *LEXSY Background Information*. [verkkodokumentti, viitattu 5.7.2010]. Saatavissa: http://www.jenabioscience.com/cms/en/1/browse/1143_lexsy_organism_and_basics.html
- [28] LGC Standards. *Protozoa and Algae*. [verkkodokumentti, viitattu 5.7.2010]. Saatavissa: <http://www.lgcstandards-atcc.org/LGCAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx?ATCCNum=30143&Template=protistology>

- [29] Jena Bioscience. *LEXSY eukaryotic protein expression system*. [verkkodokumentti, viitattu 5.7.2010]. Saatavissa: [http://www.jenabioscience.com/images/b3e879b381/lexsy_flyer_09-2008.pdf].
- [30] Fritsche, Claudia et al. Characterization of the growth behavior of *Leishmania tarentolae* – a new expression system for recombinant proteins. *Journal of Basic Microbiology* 47 (2007), s. 383–394.
- [31] Fritsche, Claudia et al. Development of a defined medium for heterologous expression in *Leishmania tarentolae*. *Journal of Basic Microbiology* 48 (2008), s. 488–495.
- [32] Cosmo Bio co. *Leishmania tarentolae Secretory Expression Starter Kit with LMSAP signal peptide*. s. 9 [verkkodokumentti, viitattu 27.8.2010]. Saatavissa: http://search.cosmobio.co.jp/cosmo_search_p/search_gate2/docs/JNA_EGE111.20060425.pdf
- [33] Sigma Aldrich Chemie GmbH. *Nourseothricin sulfate BioChemica*. [verkkodokumentti], viitattu 25.8.2010]. Saatavissa: <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Datasheet/1/74667dat.Par.0001.File.tmp/74667dat.pdf>
- [34] Jena Bioscience. *Nourseothricin superior selection antibiotic in molecular genetics*. [verkkodokumentti, viitattu 25.8.2010]. Saatavissa: http://www.jenabioscience.com/images/625337ef95/NTC_superior_selection_tool.pdf
- [35] Shibata, Takehiko. Function of homologous DNA recombination. *RIKEN Review* 41 (2001), s. 21–23.
- [36] Nieminen, Leena. Geeniteknisesti muunnettujen mikro-organismien ympäristövaikutukset ja niiden seuranta. [verkkodokumentti, viitattu 31.8.2010]. Saatavissa: http://www.mm.helsinki.fi/users/lindstro/Opetus/Opetus_2003/Seminaarityot_2001/Leena/GMMO2.htm
- [37] Breitling, Reinhard et al. Non-pathogenic protozoa as a platform for protein research and production. *Protein Expression and Purification* 25 (2002), s. 209–218.
- [38] Bio-Rad, *Gene Pulser II Electroporation System Instruction manual*. [verkkodokumentti, viitattu 24.9.2010]. Saatavissa: http://biotech.wku.edu/online_manual/Bio-Rad%20Gene%20Pulser%20II.pdf
- [39] Gazdag et al. Purification and crystallization of human Cu/Zn superoxide dismutase recombinantly produced in the protozoan *Leishmania tarentolae*. *Acta Crystallographica*, F66 (2010), s. 871.