

UUDEN BAKTEERIPERÄISEN AVIDIININ  
SUKULAISPROTEIININ TUOTTAMINEN, PUHDISTUS SEKÄ  
SEN OMINAISUUKSIEN MÄÄRITTÄMINEN

Pro gradu -tutkielma

Jyväskylän Yliopisto

Matemaattis-luonnontieteellinen  
tiedekunta

Lokakuu 2007

Kirsi Pauliina Nurminen

Tämä tutkimus tehtiin Tampereen Lääketieteellisen teknologian instituutissa prof. Markku Kulomaan tutkimusryhmässä vuosina 2005-2006. Kiitokset työhöni liittyvistä ohjeista ja ideoista haluan osoittaa prof. Markku Kulomalle sekä erityisesti ohjaajilleni FM Satu Helppolaiselle sekä Fil. Tri Henri Norlundille. Lisäksi haluan kiittää laboratoriomestaria Ulla Kiiskistä liuosten valmistamisesta, FM Juha Määttä HPLC-kokeiden suorittamisesta, FM Katrin Hallingia DSC-kokeiden suorittamisesta, Satu Helppolaista ITC-kokeiden suorittamisesta sekä kaikkia tutkimusryhmän jäseniä avusta ja kannustuksesta. Haluan kiittää myös Dr Victor Gonzalesia ja Dr Guillermo Davilaa, (Universidad Nacional Autonoma de Mexico) *Rhizobium etli*:n cDNA:sta sekä Dr. Giovanni Paganellia (Division of Nuclear Medicine, European Institute of Oncology) seeruminäytteistä.

Jyväskylän yliopisto  
Pro gradu –tutkielman tiivistelmä  
Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta

---

<b>Tekijä:</b>	Kirsi Nurminen
<b>Tutkielman nimi:</b>	Uuden bakteeriperäisen avidiinin sukulaisproteiinin tuottaminen, puhdistus sekä sen ominaisuuksien määrittäminen
<b>English title:</b>	Producing, purifying and determining the characteristics of the new relative protein of avidin from bacterial origin
<b>Päivämäärä:</b>	3.10.2007
<b>Sivumäärä:</b>	88
<b>Laitos:</b>	Bio- ja ympäristötieteiden laitos
<b>Oppiaine:</b>	Molekyylibiologia
<b>Tutkielman ohjaaja(t):</b>	FM Satu Helppolainen, FT Henri Nordlund

---

Avidiini on kananmunan valkuaisesta eristetty glykoproteiini, jolla on ainutlaatuisen vahva affiniteetti D-biotiinia (vitamiini H:ta) kohtaan. Rakenteeltaan avidiini on homotetrameerinen proteiini; se koostuu neljästä identtisestä monomeeristä, joista kukin pystyy sitomaan yhden biotiinimolekyylin. Avidiinin kyky sitoa biotiinia perustuu sitomistaskun aminohappojen muodostamiin ei-kovalenttisiin vuorovaikutuksiin biotiinin kanssa. Avidiini on hyvin stabiili proteiini, varsinkin sitoessaan biotiinia. Se kestää varsin hyvin proteolyttisiä entsyymejä sekä ääriolosuhteita, kuten voimakasta lämmitystä ja suuria suolapitoisuuksia.

Kanan avidiinin lisäksi muita biotiinia sitovia proteiineja on havaittu esiintyvän myös mm. muiden lintujen ja matelijoiden munissa, sammakoiden munahyytelössä sekä bakteereissa. Avidiinin tunnetuin sukulaisproteiini, bakteeriperäinen streptavidini, muistuttaa avidiinia suurilta osin niin rakenteellisesti kuin toiminnallisestikin. Avidiiniperheeseen kuuluvien proteiinien aminohappohapposekvenssejä vertaamalla on havaittu, että biotiinin sitomiseen osallistuvat aminohapot ovat suurilta osin konservoituneita.

Avidiini-biotiini-teknologiaa hyödynnetään nykyään monen eri tieteenalan sovelluksissa, kuten puhdistusmenetelmissä tai lääkeaineen kohdentamisessa syöpäkasvaimeen. Vastatakseen sovellusten asettamiin vaatimuksiin, avidiinin rakennetta ja sen biokemiallisia ominaisuuksia on muokattu niin kemiallisesti kuin geneettisesti. Tavoitteena on ollut myös ”uusien avidiinien” löytäminen ja niiden valjastaminen eri sovellusten käyttöön.

*Rhizobia*-bakteerit ovat maaperässä eläviä bakteereita, joilla on kyky infektoida palkokasvien juuria ja muodostaa symbioottinen suhde isäntäkasvin kanssa osallistumalla sen tyyppiaineenvaihduntaan. *Rhizobia* sukuun kuuluvien *Bradyrhizobium japonicum*-bakteereiden genomista on löydetty geeni, joka koodaa avidiinin kaltaista proteiinia, bradavidinia. Bradavidinia on kyetty tuottamaan ja sen ominaisuuksia on tutkittu. Bradavidiinien löytymisen innoittamana seulottiin myös muiden kasvien juuria infektioivien bakteerien genomeja ja havaittiinkin useita bakteereita, jotka mahdollisesti ekspressoivat biotiinia sitovaa proteiinia. Yksi näistä oli *Rhizobia*-bakteerisukuun kuuluva *Rhizobium etli* -bakteerilaji. Pro Gradu -tutkimuksen tarkoituksena oli eristää ”uutta avidiinia” koodaava geeni *Rhizobium etli* -DNA:sta sekä tuottaa ja puhdistaa rhizavidiiniksi nimettyä proteiinia bakteerisolusysteemillä. Lisäksi haluttiin tutkia sen rakennetta ja ominaisuuksia, kuten biotiininsitomiskykyä, lämmönkestävyyttä sekä immunologista ristireagoitavuutta.

Tutkimuksissa selvisi, että rhizavidini sitoo biotiinia avidiinin lailla suhteellisen tiukasti. Radiobiotiinikokeessa havaittiin, että rhizavidini on bradavidiinien veroinen biotiininsitoja. Sen affiniteetti radiobiotiinia kohtaan osoittautui kuitenkin jonkin verran heikommaksi verrattuna avidiiniin tai streptavidiinien. Rhizavidini kestää kuumennusta varsin hyvin ja biotiinin sitominen lisää sen lämmönkestävyyttä. Immunologisilta ominaisuuksiltaan rhizavidini erosi avidiinista ja streptavidiinista; niiden vasta-aineet eivät merkittävästi ristireagoineet rhizavidiinien kanssa.

Rhizavidiinien löytäminen antoi lisä viitteitä siitä, että biotiinia sitovien proteiinien esiintyminen maaperän bakteereissa saattaa olla hyvinkin yleistä. Rhizavidinia ja muita ”uusien avidiineja” voidaan mahdollisesti tulevaisuudessa käyttää uutena työkaluna avidiini-biotiini-teknologiassa avidiinin ja streptavidiinien rinnalla.

---

Avainsanat: Avidiini, streptavidini, avidiini-biotiini-teknologia, *Rhizobia*, *Rhizobium etli*

**Author:** Kirsi Nurminen  
**Title of thesis:** Producing, purifying and determining the characteristics of the new relative protein of avidin from bacterial origin  
**Finnish title:** Uuden bakteeriperäisen avidiinin sukulaisproteiinin tuottaminen, puhdistus sekä sen ominaisuuksien määrittäminen  
**Date:** 3.10.2007  
**Pages:** 88  
**Department:** Department of Biological and Environmental Science  
**Chair:** Molecular Biology  
**Supervisor(s):** FM Satu Helppolainen, FT Henri Nordlund

---

Avidin is a glycoprotein extracted from the egg white. It has extremely strong affinity against D-biotin (vitamin H). Avidin is a homotetrameric protein; it consists of four identical monomers, which each has the ability to bind one biotin molecule. Avidin's ability to bind biotin is based on the non-covalent interactions between its aminoacids and biotin. Avidin is a very stabile protein, especially when biotin is bound to it. Avidin can suffer proteolytic enzymes and extreme conditions such as high temperatures and salt concentrations very well without losing its biological activity.

In addition to chicken egg avidin, there are also other biotin binding proteins which have been found in the bacteria and from the eggs of the avian, reptile and amphibian species. Streptavidin from bacterial origin resembles avidin in many respects. Comparison of the amino acid sequences between the avidin-like proteins has indicated that the amino acids involved in the binding of biotin are conserved throughout the avidin-family.

The avidin-biotin technology is being exploited in many of the life science applications such as the purification procedures of different substances and targeted drug delivery to tumors. Rational design of the avidin mutants has facilitated the development of new protein tools for different biotechnology applications. In addition, the aim has been to find new wild-type avidins and to use them as new protein tools for different applications.

*Rhizobia* are soil bacteria which have the ability to infect the roots of the legumes and to live in symbiosis with the plant host by fixing nitrogen in the root nodes. *Bradyrhizobium japonicum* is one of the bacteria genera belonging to *Rhizobium* family. The gene encoding avidin-like protein, bradavidin, has been found in the genome of *Bradyrhizobium japonicum*. Bradavidin has been produced and the characteristics of the protein have been studied. Other bacteria from the root nodes have been studied as well and many of them are found to have the avidin-like nucleic sequences in their genomes. One of those bacteria genera is *Rhizobium etli* which belongs to the family of the *Rhizobia*. The aim of the Master's Thesis was to isolate the gene encoding this "new avidin" from the *Rhizobium etli* genome and to produce and purificate this new protein named rhizavidin. In addition, the goal was to study the structure and the characteristics such as it's ability to bind biotin, heat stability and immunology.

The results indicate that rhizavidin has a relatively strong affinity for biotin. Radiobiotin assay showed that rhizavidin has an equal binding capacity towards radiobiotin as bradavidin although it was somewhat lower compared with the binding affinity of avidin or streptavidin. Rhizavidin can bear heating relatively well and biotin binding increases its thermostability. Immunological properties of rhizavidin were quite different compared to avidin and streptavidin; antibodies produced against avidin and streptavidin did not significantly cross react with rhizavidin. The founding of rhizavidin suggests that the proteins having biotin binding capacity may be quite widespread. Rhizavidin as well as other "new avidins" can be used in the future as the new tools in avidin-biotin technology in addition to avidin and streptavidin.

---

**Key words:** Avidin, streptavidin, avidin-biotin technology, *Rhizobia*, *Rhizobium etli*

# SISÄLLYSLUETTELO

1	JOHDANTO .....	8
1.1	AVIDIINI.....	8
1.1.1	Historialliset lähtökohdat .....	8
1.1.2	Ominaisuudet sekä esiintyminen luonnossa .....	9
1.1.3	Avidiinin kolmiulotteinen (3-D) rakenne .....	10
1.1.4	Biotiinin sitominen.....	12
1.1.5	Modifioidut avidiinikonstruktit.....	14
1.2	MUUT BIOTIINIA SITOVAT PROTEIINIT.....	16
1.2.1	Streptavidiini.....	16
1.2.2	Bradavidini.....	17
1.2.3	”Avidin related proteins” (AVR-proteiinit) .....	18
1.2.4	”Biotin binding proteins“ (BBP:t) .....	19
1.3	BIOTIINI .....	21
1.3.1	Biotiinin ominaisuudet ja sen biokemiallinen rooli .....	21
1.3.2	Biotiinin biosynteesi .....	22
1.4	(STREPT)AVIDIINI-BIOTIINI TEKNOLOGIA .....	24
1.5	KOHDENNETTU LÄÄKEHOITO.....	25
1.5.1	Kohdennetun lääkehoidon peruseriaatteet .....	25
1.5.2	Sovelluksia .....	26
1.5.3	Avidiini-biotiini-systeemi .....	27
1.6	RHIZOBIA-BAKTEERIKANTA .....	31
2	TUTKIMUKSEN TARKOITUS .....	32
3	MATERIAALIT JA MENETELMÄT .....	32
3.1	RHIZAVIDIINIGEENIN DNA:N KÄSITTELY .....	32
3.1.1	Alukkeiden suunnittelu .....	32
3.1.2	Rhizavidiinigeenin monistaminen .....	34
3.1.3	Agaroosigeelielektroforeesi ja DNA:n eristäminen geelistä.....	35
3.1.4	TOPO <sup>®</sup> -kloonaukset, ”heat shock” transformaatio ja solujen maljaus .....	36
3.1.5	Liemikasvatukset ja plasmidi-DNA:n eristys .....	37
3.1.6	PCR sekvensointia varten, DNA:n etanolisaostus ja sekvensointi .....	38
3.2	RHIZAVIDIINIIN TUOTTAMINEN JA PUHDISTAMINEN .....	39
3.2.1	Rhizavidiinin tuottaminen bakteerisolusysteemillä .....	39
3.2.2	Rhizavidiinin puhdistaminen affiniteetikromatografialla .....	40
3.2.3	Proteiinikonsentraation määrittäminen ja SDS-PAGE-analyysi .....	42
3.3	RHIZAVIDIINIIN KONSENTRINTI JA PUSKURIN VAIHTO .....	44
3.4	RHIZAVIDIINIIN OMINAISUUKSIEN MÄÄRITTÄMINEN.....	44
3.4.1	Koko ja rakenne .....	45
3.4.2	Alayksiköiden välisten rikkisiltojen havaitseminen .....	45
3.4.3	Rhizavidiinin lämmönkestävyyden määrittäminen.....	46
3.4.4	Biotiinin sitominen.....	47
3.4.5	Ristiinreagoitokokeet .....	47
3.4.6	Seerumianalyysi.....	50
3.5	PROTEIINIENAMINOHAPPOSEKVENSSIEN VERTAILU JA EPITOOPIANALYYSI .....	50

4	TULOKSET .....	51
4.1	RHIZAVIDIGEENIN DNA:N KÄSITTELY .....	51
4.1.1	Polymeraasiketjureaktiot ja monistettujen DNA-fragmenttien eristäminen agarosigeelistä .....	51
4.2	RHIZAVIDIININ TUOTTAMINEN JA PUHDISTUS .....	54
4.3	RHIZAVIDIININ OMINAISUUKSIEN MÄÄRITTÄMINEN .....	56
4.3.1	Alayksiköiden välisten rikkisiltojen havaitseminen .....	56
4.3.2	Lämpöstabiilisuuden määrittäminen .....	57
4.3.3	ELISA-levyn proteiinin sitomistehokkuuskoe .....	58
4.3.4	Ristiinreagoitikoheet .....	59
4.3.5	Seerumikoe .....	60
4.4	AVIDIINIEN AMINOHAPPOSEKVENSSIEN VERTAILU JA EPITOOPPIANALYYSI .....	61
4.4.1	Aminohapposekvenssien vertailu .....	61
4.4.2	Epitooppianalyysi .....	62
4.5	PROTEIINIEN FYSIKAALISET OMINAISUUDET .....	63
5	TULOSTEN TARKASTELU .....	64
5.1	RHIZAVIDIINIGEENIN DNA:N KÄSITTELY .....	64
5.2	RHIZAVIDIININ TUOTTAMINEN JA PUHDISTUS .....	65
5.3	RHIZAVIDIININ OMINAISUUKSIEN MÄÄRITTÄMINEN .....	66
5.3.1	Rhizavidiinin koko ja rakenne .....	66
5.3.2	Lämpöstabiilisuuden määrittäminen .....	67
5.3.3	Biotiinin sitominen .....	68
5.3.4	Rhizavidiinin immunologisten ominaisuuksien määrittäminen .....	69
5.3.5	Proteiinien aminohapposekvenssien vertailu ja evolutiiviset suhteet .....	71
6	LÄHDELUETTELO .....	73
	LIITE A: HIGH PERFORMANCE LIQUID CROMATOGRAPHY (HPLC) .....	80
	LIITE B: DIFFERENTIAL SCANNING CALORIMETRY (DSC) .....	81
	LIITE C: ISOTHERMAL SCANNING CALORIMETER (ITC) .....	82
	LIITE D: RADIOBIOTIINIMÄÄRITYS .....	84
	LIITE E: LIUOKSET, REAGENSIT JA KOKOSTANDARDIT .....	85

## LYHENTEET

1° vasta-aine	= primääri vasta-aine
2° vasta-aine	= sekundääri vasta-aine
3-D	= kolmiulotteinen (rakenne)
AGE	= agarosigeelielektroforeesi
AMP	= adenosiinimonofosfaatti
amp	= ampisilliini
AP	= alkaalinen fosfataasi
apo BCCP	= biotiini-karboksylaasi kantajaproteiini
<i>avd</i> -geeni	= Avidiinin tuottoa ohjaava geeni
AVR	= "Avidin Related Proteins" (suom. avidiinin kaltaiset proteiinit)
<i>avr</i>	= AVR-proteiinin tuottoa ohjaava geeni
BBP	= "Biotin Binding Proteins"
BCIP	= "5-Bromo-4-chloro-3-indolyl Phosphate"
<i>bio</i> -geeni	= biotiinin tuottoa ohjaava geeni
BirA	= "Bifunctional biotin biosynthesis protein A"
cDNA	= "complementary DNA" (suom. komplementaarinen DNA)
CEA	= karsinoembryoninen antigeeni
DAPA	= 7,8-diaminopelargonihappo
DNA LB	= "DNA loading buffer" (lastauspuskuri DNA-näytteille)
DNA	= deoksiribonukleiinihappo
dNTP	= deoksiribonukleotiditriposfaatti
DOTA	= "tetra-azacyclododecanetetra-acetic acid"
DSC	= "Differential Scanning Calorimetry"
ELISA	= "Enzyme-linked Immunosorbent Analysis"
EtBr	= etidiumbromidi
GAR-AP	= "Goat Anti-Mouse-alkaline-phosphatase"
HPLC	= "High Performance Liquid Chromatography"
IgG	= immunoglobuliini G
ITC	= "Isothermal Titration Calorimetry"
KAPA	= 7-keto-8-aminopelargonihappo
KoA	= koentsyymi A
mAb	= "monoclonal antibody" (suom. monoklonaalinen vasta-aine)
NBT	= Nitro Blue Tetrazolium
NHL	= non-Hodkinsin lymfooma
<i>nod</i> -geeni	= juurinystyröiden muodostumista ohjaava geeni
PBS	= "Phosphate buffered saline"
PCR	= "Polymerase Chain Reaction" (suom. polymeraasikerjureaktio)
PEG	= polyetyleni glykoli
PNPP	= Para-nitrofenyyli fosfaatti
SDS	= "sodium dodecyl sulphate" (suom. natriumlauryylisulfaatti)
SDS-PAGE	= SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesi
TBS	= "Tris buffered saline"
TEMED	= N,N,N',N'-tetrametyylietyleenidiamiini
tet	= tetramysiini

# 1 JOHDANTO

## 1.1 AVIDIINI

### 1.1.1 Historialliset lähtökohdat

Ensimmäiset havainnot avidiinista tehtiin jo yli sata vuotta sitten. 1800-luvun loppupuolella havaittiin, että koirilla, joiden ainoa proteiininlähde oli kananmunanvalkuainen, esiintyi ripulia ja oksentelua (Steiniz 1898). Myöhemmän tiedon valossa koirien oireilu osattiin yhdistää kananmunan valkuaisen proteiinista johtuvaan biotiinin puutostilaan. 1920-luvulla tehtiin tutkimus, jossa rotille syötettiin suuria määriä kananmunan valkuaista, jolloin niille kehittyi aliravitsemuksesta kertova dermatiitti (Boas 1927). Aliravitsemus johtui niin ikään biotiinin puutteesta, minkä aiheutti avidiini sitomalla biotiinia pois elimistön käytöstä ja muodostamalla sen kanssa imeytymättömän kompleksin. (Savage ym., 1992). 1940-luvun alussa valkuaisen proteiini eristettiin ensimmäistä kertaa ja nimettiin avidiiniksi (Eakin ym., 1941) Sen havaittiin sitovan vitamiini H:ta, eli biotiinia, ainutlaatuisen tiukasti (Gyorgy ym., 1941). Vuotta myöhemmin avidiini onnistuttiin ensimmäistä kertaa kiteyttämään (Pennington ym., 1942). Toinen biotiinia sitova proteiini, streptavidini, löydettiin 1960-luvun alkupuolella *Streptomyces avidinii* -bakteerikannasta (Chaiet ym., 1963). Se osoittautuikin sekä rakenteellisesti että toiminnallisesti hyvin suurilta osin avidiinin kaltaiseksi proteiiniksi (Tausig ja Wolf, 1964).

Avidiinin aminohapposekvenssi saatiin selville 1970-luvun alussa (DeLange ja Huang, 1971) ja avidiinin cDNA kloonattiin ensimmäisen kerran vuonna 1987 (Gope ym., 1987). Samoihin aikoihin avidiinin ja streptavidiinin kolmiulotteisia (3-D) rakenteita selvitettiin monella taholla ja rakenteet julkaistiin 1990 luvun vaihteessa (Hendrickson ym., 1989; Weber ym., 1989; Livnah ym., 1993; Pugliese ym., 1993). Tämän jälkeen avidiinin sekä sen sukulaisproteiinien tutkimus on edennyt nopeasti ja nykyään avidiini-biotiini-teknologiaa käytetään laajasti useiden eri tieteenalojen sovelluksissa.



### 1.1.2 Ominaisuudet sekä esiintyminen luonnossa

Avidiini kuuluu kalykiineiksi kutsuttujen, pieniä ligandeja sitovien proteiinien superperheeseen yhdessä lipokaliinien ja rasvahappoja sitovien proteiinien kanssa (Flower 1996). Avidiini on emäksinen, positiivisesti varautunut proteiini, joka rakentuu neljästä 128 aminohappotähteen pituisesta polypeptidiketjusta (n. 15 600 Da) muodostaen tetrameerirakenteen (Green 1975a; Green 1990). Näin ollen tetrameerinen avidiini koostuu neljästä identtisestä monomeeristä. Avidiini on glykoproteiini, jonka jokaisen monomeerin asparagiini 17 -tähteeseen on kovalenttisesti sitoutunut yksi oligosakkaridiketju. Avidiinin glykaaniketju koostuu glukosamiini- sekä mannoositähteistä (Savage ym., 1992). Avidiinin molekyylipaino sokeriosien kanssa on noin 66 000 Da ja sen isoelektrinen piste asettuu noin 10:een (Green 1990).

Toiminnallisesti avidiinin merkittävin ominaisuus liittyy sen kykyyn sitoa erittäin voimakkaasti vitamiini H:ta, eli biotiinia. Avidiinin affiniteetti biotiiniin on voimakkain luonnossa havaittu, ei-kovalenttinen vuorovaikutus ( $K_d \sim 10^{-15}$  M) proteiinin ja ligandin välillä (Green 1975a). Vertailun vuoksi esimerkiksi vasta-aineen ja antigeenin välinen dissosiaatiokerroin ( $K_d$ ) on  $10^{-7}$  -  $10^{-11}$  M (Wilcheck ja Bayer 1999). Yksi avidiinimonomeeri kykenee sitomaan yhden biotiinin, jolloin täysin biotiinilla kyllästetty avidiinitetrameeri sitoo neljää biotiinia. (Green 1990).

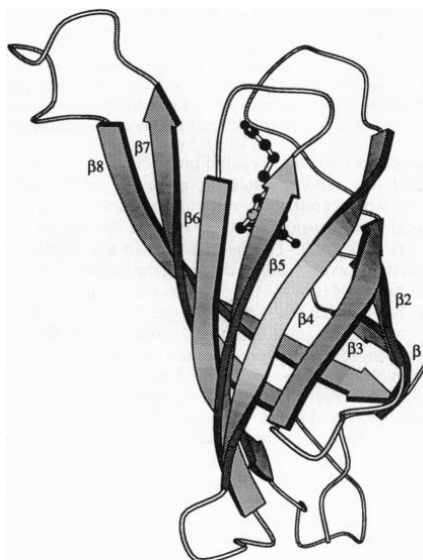
Avidiini on erittäin stabiili sekä kestävä proteiini. Se säilyttää rakenteensa ja biotiininsitomiskykynsä laajalla pH-alueella sekä suurissa lämpötiloissa. Lämmönkestävyydeltään avidiinin onkin todettu olevan kestävin mesofiilissä ja termofiilissä organismeissa havaituissa proteiineissa (Gonzales ym., 1999). Avidiini kestää myös varsin hyvin voimakkaita kemiallisia denaturantteja, suuria suolapitoisuuksia sekä proteolyttisiä entsyymejä. Biotiinin sitominen lisää merkittävästi avidiinin kestävyttä eri olosuhteissa. (Green 1990; Gonzales ym., 1999). Esimerkiksi biotiinia sitomaton avidiini inaktivoituu ”jo” 85 °C:ssa ja avidiini-biotiini-kompleksi kestää kuumennusta 132 °C:een asti (Donovan ja Ross 1973; Green 1975b). Avidiini-biotiini-kompleksi kestää myös ruuansulatuselimistön läpi kulkeutumisen hajoamatta (Green 1975b).

Kananmunan valkuaisen lisäksi avidiinia on havaittu esiintyvän myös muiden lintujen ja matelijoiden munissa sekä sammakkoeläinten munahyytelössä (Hertz ja Sebrell 1942; Jones and Briggs 1962; Korpela ym., 1981). Avidiinia tai avidiinin kaltaisia biotiinia sitovia proteiineja voi esiintyä myös kudoksissa, joissa niitä tuotetaan muun muassa tulehduksen, kudonvaurion tai bakteeri-infektion yhteydessä (Elo ja Korpela 1984). Avidiinin kaltaisia proteiineja on havaittu esiintyvän luonnossa myös muun muassa bakteereissa (Chaiet ym., 1963; Norlund ym., 2005). Lisäksi merisiileistä on löydetty fibropelliineiksi kutsuttuja glykoproteiineja, joiden karboksyyli-terminaalissa on aminohapposekvenssiltään avidiinia muistuttava alue (Bisgrove ym., 1991).

Kautta avidiinin historian sen roolia biotiinin sitojana on pyritty selvittämään. Yksiselitteistä vastausta kysymykseen vieläkkään ei ole saatu, mutta on esitetty, että avidiinin rooli saattaisi liittyä mikrobien torjuntaan (Green 1990). Biotiini toimii tärkeänä kofaktorina monille biokemiallisia reaktioita katalysoiville entsyymeille (Samols ym., 1988). Käytännössä avidiini inhiboi mikrobien kasvua sitomalla vapaan biotiinin ympäristöstä ja häiritsee siten mikrobien normaalia metaboliaa. (ks. yleiskatsaus Wilchek ja Bayer 1989). Arvoitukseksi on kuitenkin jäänyt, miksi avidiini ei toimi samoin isäntäorganismiaan vastaan. Kananmunan valkuaisen lisäksi avidiinia on todettu esiintyvän pieninä pitoisuuksina myös keltuaisessa, jossa sen rooli mahdollisesti liittyy biotiinin saannin säätelyyn yksilönkehityksen alussa (Green 1990).

### 1.1.3 Avidiinin kolmiulotteinen (3-D) rakenne

Avidiinin ja avidiini-biotiini -kompleksin rakenne on selvitetty röntgensäde-kristallografiolla (Livnah ym., 1993, Rosano ym., 1999). Avidiinimonomeeri rakentuu kahdeksasta vastakkaisuuntaisesta  $\beta$ -juosteesta, joita yhdistää seitsemän  $\beta$ -levyjen välistä silmukkaa (kuva 1,1). Ensimmäistä ja viimeistä  $\beta$ -juostetta yhdistävät vetysidokset. Laskostunut tertiäärirakenne muistuttaa tyypillistä  $\beta$ -tynnyriä. Jokaisen  $\beta$ -tynnyrin sisäosassa sijaitsee biotiinin sitomistasku.



Kuva 1,1: (Livnah ym. 1993) Avidiinimonomeerin  $\beta$ -tynnyrirakenne sekä siihen sitoutunut biotiini. Juosteet  $\beta 1 - \beta 8$  on merkitty kuvaan nuolirakenteina.

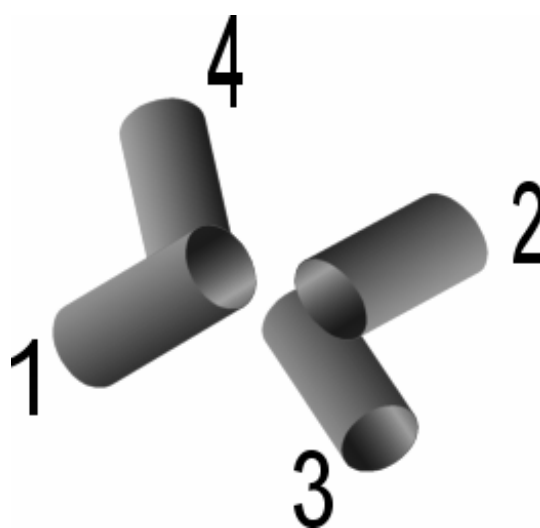
Avidiinin kvaternäärirakenne muodostuu neljästä monomeerista. Jokaisessa monomeerissa on yksi kysteiinitähteiden välille muodostunut alayksikön sisäinen rikkisilta, joka lisää avidiinin lämmönkestävyyttä (Green 1990).

Tetrameerisessä avidiinissa monomeerit ovat kolmella eri tasolla vuorovaikutuksessa toistensa kanssa (kuva 1,2). Monomeerien väliset vuorovaikutukset vaikuttavat niin avidiinitetrameerin jäykkään rakenteeseen kuin biotiinin sitomiseenkin. Monomeerien 1 ja 4 (2 ja 3) välisiä vuorovaikutuksia voidaan kuvata rakenteellisiksi vuorovaikutuksiksi. Onkin sanottu, että kyseiset vuorovaikutukset ovat avidiinin ”tetrameerinen liima”. Voimakas sidos muodostuu pääasiassa van der Waals -voimista, mutta myös polaaristen aminohappotähteiden ja vesimolekyylien väliset vetysidokset muodostavat osan vuorovaikutuksista monomeerien 1 ja 4 (2 ja 3) välillä. (Livnah ym. 1993.)

Heikommat rakenteelliset vuorovaikutukset muodostuvat puolestaan monomeerien 1 ja 3 (2 ja 4) välillä. Sidos muodostuu ainoastaan vähäisistä van der Waals'n vuorovaikutuksista. Avidiinin stabiliteetin kannalta kyseisten monomeerien väliset vuorovaikutukset ovat vähiten merkittäviä. (Livnah ym., 1993; Rosano ym., 1999.)

Monomeerien 1 ja 2 (3 ja 4) välinen yhteys on pääasiassa toiminnallinen ja vuorovaikutukset liittyvät biotiinin sitomiseen. Biotiinin sitoutuminen aiheuttaa  $\beta 3$ - ja  $\beta 4$ -

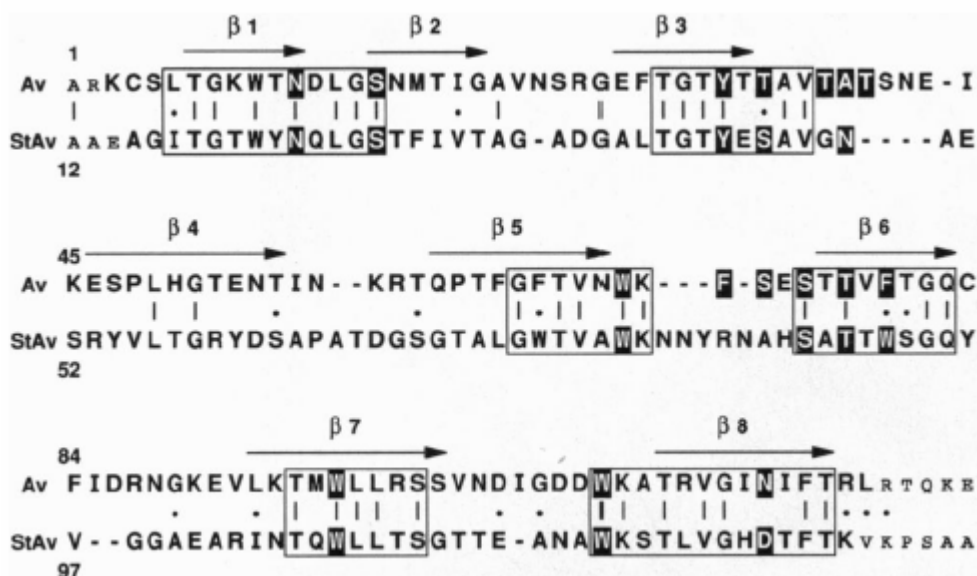
juosteiden välisessä silmukassa (aminohapot 36 – 44) konformaatiomuutoksen. Kun biotiini sitoutuu esimerkiksi monomeeri 1:een, sulkee monomeeri 2:n edellä mainittu silmukka monomeeri 1 sitomistaskun ”lukiten” biotiinin sitomiskohtaan. Silmukka muodostaa ikään kuin kannen tynnyrille. Vuorovaikutukset kyseisten monomeerien välillä muodostuvat vetysidoksista ja hydrofobisista vuorovaikutuksista. Merkittävässä osassa on aminohappotähde tryptofaani 110, joka muodostaa vastakkaiseen monomeeriin sitoutuneen biotiinin kanssa vuorovaikutuksia ja on täten yksi rakenteellinen osa biotiinin sitomiskohtaa. (Livnah ym., 1993; Rosano ym., 1999.)



Kuva 1,2: Kaavamainen esitys avidiinitetrameerista ja monomeerien välisistä vaikutustasoista. (Malli kuvaan otettu Pugliese ym. 1993.)

#### 1.1.4 Biotiinin sitominen

Avidiinilla ja streptavidiinilla on primäärirakenteessaan kuusi biotiinin tunnistamiseen sekä sitomiseen osallistuvaa homologista aluetta (kuva 1,3). Useimmat biotiinin sitomiseen osallistuvat aminohapot ovat konservoituneita. Rakenteellisesti ne sijaitsevat silmukoissa tai niiden läheisyydessä (kuva 1,3). (Wilchek ja Bayer 1989; Bayer ja Wilchek 1990.)



Kuva 1,3: (Livnah ym., 1993.) Avidiinin ja streptavidiinin primäärirakenteet. Biotiinin tunnistamiseen ja sitomiseen osallistuvat homologiset alueet on merkitty ympäröimällä ne kehyksellä. Suoraan biotiinin sitomiseen osallistuvat aminohapot on tummennettu. Konservoituneet aminohapot on merkitty pystyviivalla ja samankaltaiset pisteellä.  $\beta$ -juosteiden paikat on merkitty nuolella sekvenssien päälle.

Avidiinin ja streptavidiinin biotiinin sitomiskohta sijoittuu  $\beta$ -tynnyrin toisessa päässä sijaitsevaan ”onkaloon”, jossa sijaitsee biotiinin sitomiseen osallistuvia polaarisia sekä aromaattisia aminohapotähteitä. Biotiinin sitomiskohta on muodoltaan komplementaarinen biotiinin kanssa; sitoutunut biotiini ”istuu” sitomiskohtaan täydellisesti. Jotkut  $\beta$ -juosteita yhdistävistä silmukoista (1 - 2, 3 - 4, 5 - 6, 7 - 8) osallistuvat biotiinin sitomiseen. Ne stabiloivat sitoutunutta biotiinia intra- ja intermolekulaaristen vuorovaikutuksien kautta. Biotiinin sitomiskohta säilyttää muotonsa ligandin puuttuessa, sillä sitomiskohtaan on tällöin sitoutunut viisi biotiinin muotoa jäljittelevää  $H_2O$ -molekyyliä. (Livnah ym. 1993.)

Biotiinin sitoutuessa muodostuu sitomiskohdan aromaattisten aminohappojen ja biotiinin välille hydrofobisia vuorovaikutuksia, mikä saa aikaan koko sitomistaskun muuttumisen hydrofobiseksi. Biotiinin sitomistaskussa sijaitsevien tryptofaanitähdeiden (Trp 70, 97 ja 110) ja fenyylialaniinitähdeiden (Phe 72 ja 79) on osoitettu olevan merkittävässä osassa hydrofobisen taskun muodostumisessa (Gitlin ym., 1988). Polaaristen aminohappojen ja biotiinin ureidorenkaan (s. 21, kuva 1,4) välille muodostuu puolestaan vetysidoksia. Yksi tärkeimmistä vetysidoksista syntyy biotiinin ureidorenkaan karbonyyliosan ja sitomistaskun pohjalla sijaitsevan tyrosiini 33:n välille. (Livnah ym. 1993.)

Silmukoiden osallistuminen biotiinin sitomiseen ”jäykistää”  $\beta$ -tynnyrin rakennetta. Monomeerien välistä yhteistoiminnallisuutta ei kuitenkaan ole havaittu eli biotiinin sitoutuminen yhteen monomeeriin ei lisää eikä vähennä muiden monomeerien kykyä sitoa biotiinia (Rosano ym., 1999).

### 1.1.5. Modifioidut avidiinikonstruktit

Avidiini-biotiini-teknologia on laajentunut vuosien saatossa työväliseksi monille tieteen eri osa-alueille. Vastatakseen uusien sovellusten asettamia vaatimuksia, villin tyyppin avidiinin ominaisuuksia on pyritty muokkaamaan paremmin tiettyyn sovellukseen sopivaksi. Lisäksi uusia avidiinin sukulaisproteiineja on pyritty eristämään ja valjastamaan avidiini-biotiini-teknologian käyttöön. Erilaisilla muutoksilla halutaan säädellä avidiinin ja sen sukulaisproteiinien fysiokemiallisia ominaisuuksia, monipuolistaa käyttöolosuhteita sekä laajentaa tietoisuutta avidiinin genettisistä ja kemiallisista ominaisuuksista kuten biotiinin sitomisesta sekä stabiilisuudesta. Avidiinin rakennetutkimuksissa esimerkiksi biotiinin sitomiseen osallistuvia aminohappoja on selvitetty muokkaamalla tiettyä aminohappoa ja seuraamalla muokkauksen vaikutuksia avidiinin kykyyn sitoa biotiinia (Wilchek ja Bayer 1989; Bayer ja Wilchek 1990; Livnah ym., 1993).

Muokkausta voi olla joko kemiallista tai geneettistä. Kemiallisessa tekniikassa käytetään aminohappospesifisiä kemikaaleja, jotka muokkaavat tiettyjä kemiallisia ryhmiä valmiista proteiinista (Lundblad ja Bradshaw, 1997). Proteiininmuokkaus rajoittuu kuitenkin proteiinin olemassaolevaan rakenteeseen ja ominaisuuksiin, minkä takia modifiointia ei voida kohdentaa tiettyyn aminohappoon kovin hyvin, sillä kemikaali vaikuttaa samoin myös proteiinin kaikkiin samanlaisiin aminohappoihin. Avidiinia voidaan muokata myös entsyymaattisesti, jolloin pystytään muun muassa muokkaamaan translaation jälkeisiä modifikaatioita. Avidiini voidaan esimerkiksi deglykolysoida entsyymaattisin keinoin (Bayer ym., 1995).

Geneettisellä modifikaatiolla muokataan proteiinin cDNA:ta ja tämän jälkeen tuotetaan rekombinanttisesti uutta mutanttia proteiinista. Menetelmällä voidaan kohdentaa mutaatio tiettyyn aminohappoon (pistemutaatio), korvata aminohappoja toisilla aminohapoilla sekä

tehdä suuria muutoksia proteiiniin poistamalla tai lisäämällä siihen rakenteita. Geneettisessä menetelmässä lähdetään liikkeelle aina DNA-tasolta ja lisäksi tarvitaan jokin ekspressiosysteemi. Geneettinen muokkausmenetelmä onkin usein työläämpi kuin kemiallinen muokkaus.

Geneettisellä muokkauksella avidiiniin ja streptavidiniin on tehty mutaatioita muun muassa biotiinin sitomiskohtaan (ks. yleiskatsaus Laitinen ym., 1996). Yleensä sitomiskohtaan tehdyt mutaatiot pyrkivät vähentämään avidiinin affiniteettiä biotiiniin, jolloin avidiini-biotiiniteknologian käyttö esimerkiksi erottelutekniikoissa on mahdollista. Villityyppi avidiinin affiniteetti biotiiniin on niin voimakas, että olosuhteet, joissa biotiini saataisiin irtoamaan sitomiskohdasta, myös denaturoivat avidiinin rakenteen (Green 1975 a). Jotta sitomisesta tulisi käänteistä, on sitomiskohtaa muokattu kohdennetulla mutageneesillä. Esimerkiksi Marttila ym. (2003) tekivät kokeen, jossa tärkeän vetysidoksen biotiinin kanssa muodostava tyrosiini 33 korvattiin toisella aminohapolla (alaniini, fenyyialaniini, glutamiini tai histidiini). Avidiinimutantit, joissa tyrosiini oli korvattu alaniinilla, glutamiinilla tai histidiinillä, sitoivat biotiinia heikommin kuin villityypin avidiini ja sitominen oli täten käänteistä.

Mutageneesiä on tehty myös aminohapoille, jotka muodostavat vuorovaikutuksia avidiinin monomeerien välipinnoilla. Mutaatioilla on pyritty esimerkiksi lisäämään kvaternäärirakenteen stabiiliutta. Norlund ym. (2003) muodostivat avidiinitetrameerin alayksiköiden välille rikkisiltoja, jolloin proteiinin lämmönkestävyys kasvoi. Joissain tapauksissa on pyritty hajoittamaan kvaternäärirakenne ja muodostamaan monomeerisiä tai dimeerisiä avidiineja. Laitinen ym. (2003) muuntivat tetrameerisen avidiinin monomeeriseksi mutatoimalla kahta välipintojen aminohappoa; monomeerien 1 ja 2 välipinnan tryptofaani 110 muutettiin lysiiniksi ja monomeerien 1 ja 4 välipinnalla sijaitseva aspargiini 54 muutettiin alaniiniksi (monomeerien numerointi kuten kuvassa 1,2). Mutaatioiden seurauksena modifioidun avidiinin affiniteetti biotiiniin laski villityypin avidiiniin verrattuna.

Avidiinin rakenteelle on tehty suuria muutoksia sirkulaarisella permutaatiolla. Kyseisillä kokeilla pyritään selvittämään sekundäärirakenteen merkitystä proteiinin laskostumiselle. Sirkulaarisessa permutaatioissa polypeptidiketjun N- ja C-pää liitetään yhteen

kovalenttisesti ja uudet päät muodostetaan katkaisemalla polypeptidiketju eri kohdasta (ks. yleiskatsaus Pan ja Uhlenbeck 1993). Liittämällä yhteen kaksi sirkulaarisesti permutoitua avidiinikonstruktiota, on saatu aikaan muun muassa niin sanottu ”dual-chain” -avidiiini eli avidiinipolypeptidi, jossa on kaksi biotiinin sitomiskohtaa (Norlund ym., 2004). Neljä biotiinin sitomiskohtaa sisältävä pseudotetrameerinen ”single-chain” -avidiiini on tehty liittämällä kaksi dual-chain avidiinia yhteen (Norlund ym., 2005). Avidiiini kestää hyvin sekundaarirakenteen muuttamista ja yleensä sirkulaarisesti permutoitu avidiinikonstrukti säilyttää biotiinin sitomiskykynsä sekä stabiiliutensa.

## 1.2 MUUT BIOTIINIA SITOVAT PROTEIINIT

### 1.2.1 Streptavidiiini

Avidiinin sukulaisproteiinia, streptavidiinia, on eristetty *Streptomyces avidinii* (Chaiet ja Wolf 1964) ja *Streptomyces venelazue* (Bayer 1995) -bakteerikannoista. Streptavidiiini tuotetaan 159 aminohapon polypeptidiketjuna, mutta se katkaistaan translaation jälkeen proteolyytisesti kummastakin päästä 125 – 127 aminohapon pituiseksi ydinmuodoksi (16 500 Da) (Argarana ym., 1986). Vaikka streptavidiiinin (ydin-muoto) ja avidiinin primäärirakenteet ovat vain 33 %:sti identtiset (Green 1990), streptavidiiini on kolmiulotteiselta rakenteeltaan ja ominaisuuksiltaan hyvin samankaltainen.

Streptavidiiinin sekundaarirakenteessa esiintyy  $\beta$ -juosteita ja silmukoita ja se laskostuu avidiinin lailla  $\beta$ -tynnyrirakenteeksi. Kuten avidiini, streptavidiiini esiintyy luonnossa neljän identtisen biotiinia sitovan alayksikön muodostamana tetrameerirakenteena. Avidiinin ja streptavidiiinin rakenteelliset erot sijaitsevat pääasiassa  $\beta$ -juosteita yhdistävillä silmukka-alueilla. (Hendrickson ym., 1989; Weber ym., 1989, Livnah ym., 1993; Pugliese ym., 1993).

Streptavidiiinin affiniteetti biotiiniin on erittäin voimakasta ( $K_d \sim 10^{-15}$ ) ja sen biotiininsitomiskohta muistuttaa avidiinin vastaavaa. Biotiinin sitomiskohdassa sijaitseekin konservoituneita alueita, tärkeimpänä mainittakoon tryptofaani-lysiinisekvenssit, jotka avidiinilla sijoittuvat primäärirakenteessa kohtiin 70 – 71 sekä 110 – 111 ja streptavidiinilla kohtiin 79 – 80 sekä 120 -121 (Gitlin ja Bayer 1990). Vaikka streptavidiiini ja avidiini ovat



hyvin samankaltaiset proteiinit, niin erojakin proteiinien välillä löytyy. Streptavidiinilla ei esimerkiksi ole hiilihydraattiosaa ja siltä puuttuu kysteiinitähteet, jotka avidiinissa muodostavat monomeerin sisäisen rikkisillan. Lisäksi streptavidiini on hieman hapan proteiini isoelektrisen pisteen asettuessa pH-asteikolla noin 5 – 6:een (Green 1990).

## 1.2.2 Bradavidiiini

Bradavidiiini on bakteeriperäinen biotiinia sitova proteiini, jota on eristetty soijapapukasvin juurinystryöissä elävästä *Bradyrhizobium japonicum* bakteerikannasta (Norlund ym., 2005). *B. japonicum* elää symbioosissa isäntäkasvin kanssa osallistuen sen typpiaineenvaihduntaan (Hennecke 1990). *B. Japonicum*-bakteerikannan tuottama bradavidiiini osallistuu mahdollisesti mikrobien ja muiden taudinaiheuttajien torjumiseen sitomalla vapaan biotiinin pois mikrobien käytöstä ja täten estämällä niiden kasvua (Green 1975b).

Norlund ym. (2005) tuottivat bradavidiiinia tutkiakseen sen ominaisuuksia. Sekvenssianalyysissä selvisi, että bradavidiiinin primäärirakenne on noin 30 %:sti identtinen verrattuna streptavidiiniiin ja avidiiniiin. Identtisyydet sijaitsivat pääasiassa biotiininsitomiseen osallistuvilta alueilla. Geelifiltraatiokromatografia osoitti bradavidiiinin esiintyvän (strept)avidiiinin lailla tetrameerirakenteena. Bradavidiiinin aminohapposekvenssin todettiin sisältävän kaksi kysteiinitähdettä, jotka pystyvät muodostamaan monomeerin sisäisen tai kahden monomeerin välisen rikkisillan. Monomeerien välistä rikkisiltaa bradavidiiiniin ei muodostunut, mutta yksi sisäinen rikkisilta on mahdollinen.

Biotiinin sitomisominaisuuksiltaan bradavidiiinin todettiin muistuttavan enemmän streptavidiiinia kuin avidiinia. Radiobiotiini dissosioitui bradavidiiinista nopeammin kuin avidiinista tai streptavidiinista. Sen sijaan fluorokromilla konjukoitua biotiinia bradavidiiini kykeni sitomaan kauemmin kuin avidiini.

Immunologisilta ominaisuuksiltaan bradavidiiini erosi avidiinista ja streptavidiinista. Norlund ym. (2005) suorittamissa ristiinreagoitikoikeessa avidiinin ja streptavidiiinin

vasta-aineet eivät merkittävästi tunnistaaneet bradavidiinia. Bradavidiinia voidaankin mahdollisesti hyödyntää tulevaisuudessa lääketieteellisissä sovelluksissa kuten kohdennetussa lääkehoidossa, geeniterapiassa ja kuvantamisessa. Bradavidiinia voitaisiin käyttää etenkin silloin, jos (strept)avidiinia ei voida antaa potilaalle esimerkiksi immuunivasteen takia.

### 1.2.3 ”Avidin related proteins” (AVR-proteiinit)

Kanalla (*Gallus gallus*) on perimässään avidiinin kanssa samaan geeniperheeseen kuuluvia geenejä, joiden tuottamia proteiineja kutsutaan AVR-proteiineiksi (Keinänen ym., 1988; Keinänen ym., 1994; Alroth ym., 2000). Avidiinia ja AVR-proteiineja koodaavat geenit (*avd*- ja *avr*-geenit) sijaitsevat kaikki samassa lokuksessa, kanan sukupuolikromosomissa Z. *Avr*-geenit ovat nukleotidijärjestykseltään keskenään lähes identtisiä, mutta *avd*-geeniin verrattuna, niissä esiintyy ei-synonyymisia nukleotidisubstituutioita. Tähän mennessä on löydetty seitsemän *avr*-geeniä (*avr1* – *7*), mutta geenien määrän on todettu vaihtelevan yksilöllisesti ja jopa saman yksilön solujen välillä. Molekulaarisella tasolla geenien erisuuruiseen määrään eri yksilöissä vaikuttaa crossing over ja sisarkromatidien vaihto. (Ahlroth ym., 2001).

AVR-proteiinien esiintymistä proteiinitasolla kanassa ei ole pystytty todistamaan, mutta AVR1 – 3 on todettu esiintyvän mRNA:n tasolla (Kunnas ym., 1993). Kunnas ym. (1993) tutkivat AVR mRNA:n esiintymistä kanan elimistössä bakteeri-infektion jälkeen. Tutkimuksissa havaittiin, että AVR2 mRNA:ta esiintyy pieninä pitoisuuksina munanjohtimessa ja AVR3 mRNA:ta esiintyy puolestaan suolistossa tulehduksen yhteydessä.

Kaikki *avr*-geenit (*avr1* – *avr7*) on kloonattu ja niiden nukleotidisekvenssit selvitetty (Keinänen ym., 1994; Ahlroth ym., 2000). *Avr4* ja *avr5* osoittautuivat nukleotidisekvensseiltään täysin identtisiksi lukuunottamatta yhtä guaniini/adeniini substituutiota. Muut *avr*-geenit ovat 94 % - 99 %:sti identtisiä verrattuna toisiinsa. Avidiinin geenin nukleotidisekvenssiin verrattuna, *avd*:in ja eri *avr*:ien välillä todettiin

olevan 91 % - 94 %:n identtisyys. Melkein kaikki biotiinin sitomiseen osallistuvat aminohapot ovat AVR-proteiineilla konservoituneita (Keinänen ym., 1994).

Laitinen ym. (2002) tuottivat rekombinantteja AVR-proteiineja hyönteissolutuottosysteemillä ja tutkivat AVR-proteiinien biokemiallisia ja toiminnallisia ominaisuuksia. Tutkimuksessa selvisi, että AVR:t muistuttavat rakenteellisesti ja toiminnallisesti hyvin paljon avidiinia. AVR3 – AVR7 -proteiinit osoittautuivat biotiininsitomiskyvyltään avidiinin veroisiksi sitomalla biotiinia erittäin vahvasti. AVR1:n ja AVR2:n affiniteetti biotiiniin oli matalampi ja biotiinin sitominen oli osittain revesiibeliä. Rakenteellisissa tutkimuksissa havaittiin, että kaikki AVR:t muodostavat avidiinin lailla stabiileja tetrameerirakenteita. Nukleotidisekvenssi paljasti, että kaikilla AVR-proteiineilla, paitsi AVR2:lla, on primaarirakenteessaan kysteiniitähteitä. Ne muodostavat tetrameerisiin AVR-proteiineihin monomeerien sisäisiä sekä niiden välisiä rikkisiltoja. Fysiokemiallisilta ominaisuuksiltaan AVR:t eroavat avidiinista alentuneen isoelektrisen pisteen sekä glykolysaation osalta. pI-arvoltaan AVR:t ovat neutraaleja tai hieman emäksisiä. AVR:t osoittautuivat avidiinin lailla hyvin kestäviksi proteiineiksi. AVR4 ja AVR5 ovat jopa selvästi lämmönkestävämpiä proteiineja kuin avidiini ja streptavidini (Hytönen ym., 2004).

AVR-proteiinien rooli elimistössä liittyy avidiinin tavoin mikrobien torjumiseen. Eri AVR-proteiinit mahdollisesti laajentavat biotiinia sitovien proteiinien kirjoa elimistön puolustusreaktioissa (Laitinen ym., 2002). Laitinen ym. (2002) pitivät myös mahdollisena, että AVR-proteiineilla on rooli kanan yksilönkehityksen alussa oligomeerisenä ”scaffold-” eli telineproteiinina.

#### 1.2.4 ”Biotin binding proteins“ (BBP:t)

Avidiinista eroavia biotiinia sitovia proteiineja (BBP) on löydetty vähäisiä määriä kananmunan keltuaisesta sekä kanan verioplasmasta (White ym., 1976; Mandella ym., 1978). BBP-I ja BBP-II edustavat kahta eri muotoa kyseisistä proteiineista (White ja Whitehead 1987). Myös kananmunan valkuaisesta on löydetty biotiinia sitovaa proteiinia,

joka eroaa immunologisesti avidiinista, mutta muistuttaa biokemiallisilta ominaisuuksiltaan keltuaisesta löydettyjä BBP:itä (Seshagiri ja Adiga 1987).

BBP:t eroavat avidiinista niin kemiallisesti kuin immunologisestikin. BBP:illä on avidiinia paljon matalampi isoelektrinen piste ( $pI = 4,6$ ) ja proteiinien aminohappokoostumus eroaa avidiinista. ”Avidiiniperheeseen” kuuluvien proteiinien lailla myös BBP:n biotiinin sitomiseen osallistuvat aminohapot ovat konservoituneita. BBP:t denaturoituvat matalammassa lämpötilassa kuin avidiini. BBP-I on stabiili  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  lämpötilassa ja BBP-II denaturoituu, kun lämpötila ylittää  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Subramanian ja Adiga 1995). Lisäksi BBP:t sitovat biotiinia heikommin kuin avidiini ( $K_d \sim 10^{-12}$ ). Biotiinin vapauttaminen on yli 1000 kertaa nopeampaa kuin avidiinilla (Meslar ym., 1978). Matalampi affiniteetti biotiiniin selittyy BBP:n roolilla kanan elimistössä (ks. alla).

BBP:n tuotto indusoituu hormonaalisesti estrogeenin vaikutuksesta, mutta myös käytettävissä olevan biotiinin määrä näyttäisi vaikuttavan proteiinin tuottoon, etenkin BBP-II:n tuottoon (White ja Whitehead 1987). BBP syntetisoidaan maksassa, josta se kulkeutuu veriplasman mukana kehittyvän munan keltuaiseen. BBP toimii kehittyvälle alkiolelle biotiinivarastona ja sen biotiinin sitomiskohdat ovatkin lähes aina kyllästettynä biotiinilla. Biotiini pääsee kuitenkin irtoamaan sitomiskohdasta suhteellisen vapaasti, jolloin vitamiinin vapauttaminen keltuaiseen mahdollistuu.

BBP-I:stä ja BBP-II:sta koodaa sama geeni. BBP-I on primaarinen geenituote (67 kDa) ja se muutetaan BBP-II:ksi proteolyttisellä pilkkomisella (19 kDa). BBP-I on pseudotetrameeri; sillä on neljä homologista biotiinin sitomiskohdan sisältävää aluetta yhdessä pitkässä polypeptidiketjussa. Homologisia alueita yhdistävät linkkerisekvenssit. (Bush ja White 1989). Samankaltainen rakenne on havaittu olevan myös valkuaisen BBP:llä (Seshagiri ja Adiga 1987). BBP-II on puolestaan tetrameeri; se muodostuu neljästä identtisestä monomeerista. BBP-I on glykoproteiini, kun taas BBP-II:lla ei ole hiilihydraattiosaa rakenteessaan.

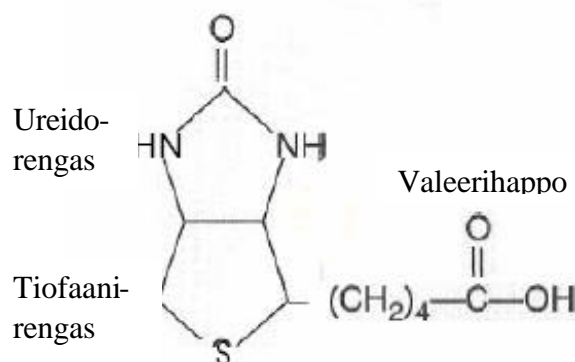
BBP-I:sen ja BBP-II:sen konsentraatiosuhde on suurempi keltuaisessa kuin plasmassa. BBP-II kulkeutuu BBP-I:stä tehokkaammin keltuaiseen, jossa sen konsentraatio onkin

huomattavasti suurempi. Tästä onkin päätelty, että BBP-I:n biologinen rooli on lähinnä ylläpitää sidotun biotiinin määrää veri-plasmassa, kun taas BBP-II:n tehtävänä on aktiivisesti kuljettaa biotiinia keltuaiseen. Päätelmää tukee myös se, että BBP-II:sta tuottuu vain munivilla kanoilla, kun taas BBP-I:stä on havaittu pieniä määriä myös ei-munivien kanojen veri-plasmassa. (White ja Whitehead 1987).

## 1.3 BIOTIINI

### 1.3.1 Biotiinin ominaisuudet ja sen biokemiallinen rooli

Biotiini (vitamiini H) on B-ryhmään kuuluva vitamiini. Sen molekyyli-massa on 244,31 Da ja se koostuu kahdesta toisiinsa yhdistyneestä renkaasta, ureidoryhmän sisältävästä imidatsoli- sekä tetrahydrothiofaanirenkaasta. Jälkimmäiseen renkaaseen on kovalenttisesti kiinnittynyt valeerihapposivuketju (kuva 1,4).



Kuva 1,4: Biotiinin rakenne. (Malli kuvaan otettu Pugliese ym. 1993).

Kahdesta mahdollisesta stereoisomeerimuodosta vain D-biotiini on vitamiinina aktiivinen. Biotiinin isoelektrinen piste on pH asteikolla 3,5, mutta se säilyttää aktiivisuutensa emäksisissä liuoksissa aina pH 9:ään asti. Biotiini kestää suuria lämpötiloja; sen sulamispiste on noin 232 °C.

Biotiini toimii sekä pro- että eukaryoottisoluisissa kofaktorina kuudelle eri karboksylaasientsyymille (asetyyli-KoA-, pyruvaatti-, metyylikrotonyyli-KoA-, propionyyli-KoA-, geranyyli-KoA- ja ureakarboksylaasi), jotka katalysoivat useita tärkeitä

aineenvaihduntareaktioita. Biotiini osallistuu rasvahappojen biosynteesiin, glukoneogeneesiin, aminohappojen metaboliaan, puriininukleotidien *de novo* synteesiin sekä energiametaboliaan osana Krebsin sykliä (Bonjour 1984). Lisäksi on esitetty, että biotiinilla olisi rooli myös geeniekpression säätelijänä sekä transkriptio- että translaatiotasolla (ks. yleiskatsaus Rodriquez-Melendez ja Zempleni 2003).

### 1.3.2 Biotiinin biosynteesi

Ihmiset ja eläimet eivät pysty tuottamaan tarvitsemaansa biotiinia, vaan saavat sen ravinnossaan. Monet mikrobit, kasvit ja sienet pystyvät biosyntetisoimaan tarvitsemansa biotiinin itse. Biotiinin synteesiin kykeneviä organismeja kutsutaan biotiini prototrofeiksi. Niillä on biotiinin biosynteesireitti ja sen entsyymejä koodava geeniryhmä (*bio*-geenit). Ekologisesta näkökulmasta katsottuna biotiinin biosynteesi on mahdollisesti siihen kykeneville maaperän mikrobeille valintaetu, sillä biotiinia ei ole vapaasti saatavilla useimmissa luonnon habitaateissa. *Bio*-geenejä on löydetty bakteereista, arkkibakteereista, hiivoista sekä joistakin eukaryooteista. (ks. yleiskatsaus Streit ja Entcheva 2003).

Biotiinin biosynteesin genetiikkaa on tutkittu eniten bakteereilla, muun muassa *E. colilla*, *B. subtilis* ja *B. sphaericuksella*. Mutaatio ja komplementaatiokokeiden perusteella on havaittu, että *bio*-geenit ovat järjestäytyneet bakteereilla operoneiksi. Operonien määrä ja rakenne, kuten myös *bio*-geenien määrä, vaihtelevat lajeittain. Esimerkiksi *E. colilla* on kaksisuuntainen *bio*-operoni ja yksi *bio*-geeneistä erillään operonista, kun taas *B. sphaericuksella* *bio*-geenit ovat järjestäytyneet kahdeksi erilliseksi operoniksi. *Bio*-geenien määrä vaihtelee lajeittain neljästä kahdeksaan geeniin. (ks. yleiskatsaus Streit ja Entcheva 2003).

*Bio*-geenien ekspressio on bakteereilla säädelty transkriptiotasolla. Biotiinin biosynteesiä säädellään tyypillisellä ”feedback”-inhibitiolla biotiinin saatavuuden mukaan. Säätelijänä toimii repressoriproteiini BirA (Bifunctional biotin biosynthesis protein) (ks. yleiskatsaus Beckett ja Matthews 1997). BirA pystyy kiinnittymään *bio*-operaattoriin N-terminaalaisella ”helix-turn-helix” -rakenteellaan. Todennäköisesti kaksi BirA-monomeeriä pystyy kiinnittymään yhtä aikaa 40 emäsparin pituiseen palindromiseen operaattoriin (*E. coli*).

BirA:n sitoutuminen operaattoriin voimistuu, kun siihen on sitoutunut korepressorina toimiva biotinyyli-5'-adenosiinimonofosfaatti (biotinyyli-5'-AMP) (Streaker ja Beckett 1998). Korkeat biotiinipitoisuudet solussa nostavat biotinyyli-5'-AMP pitoisuutta, jolloin korepressorin sitoutuminen BirA:han kasvaa. Seurauksena *bio*-geenien repressio voimistuu ja transkriptio sen seurauksena estyy. Repression purkamiseen tarvitaan biotiinikarboksylaasikantajaproteiineja (apo-BCCP), jotka ei-biotinyloituna (matalassa biotiinikonsentraatiossa) kilpailevat BirA:n kanssa paikasta *bio*-operaattorilla.

Biotiinin biosynteesi muodostuu neljästä entsyymattisesta välivaiheesta, jotka näyttävät olevan konservoituneita bakteereilla. D-biotiini syntetisoidaan sen kahdesta prekursorista, alaniinista ja pimeloyyli-KoA:sta. Biotiinin biosynteesi etenee seuraavien välituotteiden kautta: pimeolyyli-KoA, 7-keto-8-aminopelargonihappo (KAPA), 7,8-diaminopelargonihappo (DAPA), dethiobiotiini, biotiini. Reaktioita katalysoivat entsyymit samassa järjestyksessä ovat KAPA-syntetaasi, DAPA-syntetaasi, dethiobiotiinisyntetaasi sekä biotiinisyntetaasi. (Ks. yleiskatsaus Marquet ym., 2001). Kuitenkaan kaikki bakteerit eivät kykene biosyntetisoimaan biotiinia itse. Biotiiniauksotrofit bakteerit tarvitsevat ulkoisia biotiinilähteitä turvaamaan biotiinin saannin. Toisilla bakteereilla, biotiinibradytrofeilla, on puolestaan tehottomampi biotiinin biosynteesikoneisto verrattuna biotiiniauksotrofeihin. Biotiinin biosynteesi bradytrofeilla on biotiinin tarpeeseen suhteutettuna vähäistä tai ne syntetisoivat biotiinia vain tietyissä kasvuolosuhteissa. (Ks. yleiskatsaus Guillen-Navarro ym., 2005).

Paljoa ei tiedetä euryoottien biotiinin biosynteesistä, mutta joitain tutkimuksia on tehty hiivalla (*Saccharomyces cerevisiae*) ja kasveilla (muun muassa *Arabidopsis thaliana*). Hiivalla (*S. cerevisiae*) suurin osa *bio*-geeneistä on järjestäytynyt kromosomiin XIV konservoituneeksi geeniklusteriksi. Biotiinisyntaasia koodaava geeni sijoittuu kromosomiin VII ja se osoittautui suurilta osin homologiseksi bakteeriperäisen (*E. coli* ja *Bacillus sphaericus*) biotiinisyntetaasin kanssa (Zhang ym., 1994). Myös kasvipärisen (*A. thaliana*) biosyntetaasigeenin havaittiin olevan suurelta osin homologinen bakteeriperäisen biotiinisyntetaasin kanssa (Weaver ym., 1996). Eukaryooteilla biotiinin biosynteesi näyttäisi noudattavan samaa neljän entsyymattisen reaktion kaavaa kuin bakteereilla (ks.

yllä). Tämä on todettu mittaamalla biotiinin biosynteesin välituotteiden konsentraatioita soluviljelmistä (ks. yleiskatsaus Streit ja Entcheva 2003).

Arkkibakteerien biotiinin biosynteesiä on tutkittu jonkin verran. *Bio*-geenejä on sekvenssivertailulla löydetty arkkibakteerien genomista (ks. yleiskatsaus Streit ja Entcheva 2003), mutta niiden toimintaa ei ole vielä tutkittu. Vaikuttaa siltä, että myös arkkibakteerit kykenevät syntetisoimaan biotiinia. Suurimmalla osalla tutkituista arkkibakteereista biotiinin biosynteesikoneisto näyttäisi eroavan bakteerien vastaavasta.

#### 1.4 (STREPT)AVIDIINI-BIOTIINI TEKNOLOGIA

(Strept)avidini-biotiini teknologiaa käytetään hyväksi nykyään lukuisissa eri sovelluksissa. Avidiini-biotiini teknologia pohjautuu sen kahteen peruseriaatteen, jotka myös tekevät menetelmästä ainutlaatuisen. Ensinnäkin tekniikan pohjana on (strept)avidinin ”luonnottoman” voimakas affiniteetti biotiiniin. Toiseksi menetelmän vahvuutena on se, että monia molekyyliä on suhteellisen helppo leimata biotiinilla ja biotinylointi ei tuhoa biotiinin biologista aktiivisuutta eikä (strept)avidinin affiniteettiä biotiiniin. Lisäksi (strept)avidinin neljä biotiininsitomispaiikkaa mahdollistavat useamman biotiinimolekyylin sitomisen, jolloin signaali vahvistuu. (Wilchek ja Bayer 1990).

Avidiini-biotiini-menetelmällä voidaan esimerkiksi puhdistaa ja eristää aineita sekä havaita niitä näytteestä tai kudoksesta. Käytännössä useimmat sovellukset, joissa (strept)avidini-biotiini menetelmää käytetään perustuvat siihen, että biotinyloidun ligandin annetaan sitoutua kohdemolekyyliin. Sitoutumaton ligandi pestään pois ja lisätään leimattu avidiini, joka puolestaan sitoutuu biotinyloituun ligandiin. Leiman (esim. radioaktiivisen partikkelin) ansiosta voidaan määrittää kohdemolekyylin määrä ja sijainti näytteestä tai kudoksesta. (Ks. yleiskatsaus Wilchek ja Bayer 1999).

(Strept)avidini-biotiini-sovellusten kirjo on laaja ja ulottunut monelle eri tieteen alueelle. Sitä käytetään edelleen hyväksi biokemian perusmenetelmissä, kuten ELISA:ssa, affiniteetikromatografiassa ja immunoblottauksessa. Tekniikan kehittyttyä menetelmää on sovellettu myös muun muassa fysiikan, kemian ja lääketieteen aloille. Esimerkiksi



lääketieteessä avidiini-biotiini teknologiaa pystytään käyttämään hyväksi kuvantamisessa, kohdennetussa lääkehoidossa sekä geeniterapiassa.

## 1.5 KOHDENNETTU LÄÄKEHOITO

### 1.5.1 Kohdennetun lääkehoidon peruseriaatteen

Sairauksien hoidossa on pitkään ollut tavoitteena kohdentaa lääkehoito tiettyyn elimeen tai syöpäkasvaimen (ks. yleiskatsaus Langer 1998). Tällä tavalla pyritään parantamaan lääkehoidon tehokkuutta kohteessa sekä vähentämään lääkkeen haittavaikutuksia normaaleissa kudoksissa.

Lääkeaineen kohdentamisessa syöpäkasvaimen käytettiin ensimmäisenä monoklonaalisia vasta-aineita. Goldenberg ym. (1983) käyttivät radioleimattuja vasta-aineita rintasyöpäkasvaimen kuvantamisessa. Monoklonaalisia vasta-aineita on sen jälkeen sovellettu laajasti sekä syöpäkasvaimen *in vivo*-kuvantamiseen että hoitoon. Ideana tekniikassa on yhdistää kovalenttisesti syöpäkasvaimen pinta-antigeenin tunnistava vasta-aine kemoterapeuttiseen lääkeaineeseen tai radionuklidiin, jolloin terapeuttinen yhdiste kulkeutuu vasta-aineen mukana syöpäkasvaimen. Vasta-aineiden käytössä on useita ongelmia, jotka estävät tekniikan käyttöä laajamittaisesti sairauksien hoidossa. Suurin ongelma on se, että vain murto-osa lääkeannoksesta paikantuu itse kohteeseen. Esimerkiksi radioleimattuja vasta-aineita käytettäessä n. 0,001 - 0,01 % annoksesta pääsee kohteeseensa (ks. yleiskatsaus Sakahara ja Saga, 1999). Lääkeannoksen kasvattaminen ei tule kysymykseen, sillä lääke on usein haitallinen tai myrkyllinen normaalille kudokselle, etenkin maksalle, munuaisille ja luuytimelle. Lisäksi vasta-aineiden konsentroituminen kohteeseensa on hidasta; päivän tai parin kuluttua saavutetaan tarvittava lääkeaineen pitoisuus kohteessa. Kuvantamista häiritsee vapaana kiertävät radioleimatut vasta-aineet, jotka poistuvat elimistöstä useiden päivien jälkeen.

## 1.5.2 Sovelluksia

Monia eri sovelluksia on kehitelty yli 20 vuoden ajan kasvattamaan terapeuttisten vasta-aineiden määrää kohteessa suhteessa vapaana kiertäviin. Kokonaisia lääkeaineella tai radionuklidilla leimattuja vasta-aine molekyylejä (IgG) käytettäessä ongelmana on usein niiden suuri koko. Ne poistuvat hitaasti elimistöstä sekä tunkeutuvat huonosti syöpäkasvaimen sisään. Yksi tapa on käyttää entsyymaattisesti pilkottuja vasta-aine fragmentteja (Adams ym., 1993), jolloin kohteeseen konsentroituminen on nopeampaa ja tehokkaampaa niiden pienestä koosta johtuen. Toisaalta suuri osa lääkeannoksesta ei koskaan saavuta kohdettaan, sillä fragmenttien pieni koko aiheuttaa niiden nopean poistumisen elimistöstä. DNA-rekombinaatiotekniikalla on pystytty parantamaan vasta-aineiden tai vasta-aine-fragmenttien ominaisuuksia, kuten kestävyyttä ja toiminnallista affiniteettia, paremmin käyttötarkoitusta vastaavaksi (ks. yleiskatsaus Colcher ym., 1998; yleiskatsaus Reiter ja Pastan, 1996).

Eräs menetelmä on käyttää linkkeriä vasta-aineen tai vasta-ainefragmentin ja radionuklidin välissä (Arano ym., 1991; Gestin ym., 1993). Tarkoituksena on, että vasta-aine vapauttaa radionuklidin normaalissa kudoksessa, josta se poistuu nopeasti aineenvaihdunnan kautta, mutta ei syöpäkudoksessa. Ongelmana on ollut linkkerin epästabiilisuus. Radionuklideja pääsee ”vuotamaan” syöpäkasvaimesta, jolloin radioimmunoterapian teho laskee.

Edellisissä esimerkeissä vasta-aine tai muu kohdekudoksen tunnistava molekyyli on leimattu suoraan kemoterapeuttisella lääkeaineella tai radioimmunoterapeuttisella radionuklidilla. Parempi vaihtoehto on kohdentaa lääkehoito syöpäkasvaimen monivaiheisella metodilla. Ennalta kohdennetussa (”pretargeting”) lääkähoidossa hyödynnetään sekä pieniä että suuria molekyylejä lääkeaineen kohdentamisessa syöpäkasvaimen (Goodwin ja Meares 1997). Menetelmä vähentää taustaa sekä mahdollistaa lääkeaineen suuren pitoisuuden syöpäkasvaimessa minimoiden samalla normaaliin kudokseen kohdistuvat vauriot.

Ennalta kohdennetussa lääkähoidossa on sovelluksesta riippuen aina kaksi tai useampi vaihe. Esimerkkinä käytettävä Cremonesin ym. (1999) raportoima

radioimmunoterapiametodi on kolmivaiheinen. Ensimmäisessä vaiheessa potilaalle annetaan pitkään verenkierrossa kiertävää, syöpäkasvaimen pinta-antigeeniin kiinnittyvää kohdentajakonjugaattia (biotinyloitu mAb). Toisessa vaiheessa vapaana kiertävät kohdentajakonjugaatit poistetaan verenkierrosta. Tähän käytetään molekyyliä (avidiiini tai streptavidiiini), joka sitoutuu kohdentajakonjugaatteihin muodostaen kompleksin, joka poistuu elimistöstä. Myös syöpäkasvaimen pinnalle ensimmäisessä vaiheessa kiinnittyneihin kohdentajakonjugaatteihin sitoutuu avidiinimolekyyliä. Kolmannessa vaiheessa lisätään vaikuttajakonjugaatti (<sup>90</sup>Y-biotiini), joka tunnistaa spesifisesti kohdentajakonjugaatin syöpäkasvaimen pinnalta ja kiinnittyy siihen. Yleisimmät esikohdennetussa lääkehoidossa käytetyt menetelmät ovat avidiini/biotiini (Hnatowich ym., 1987; Paganelli ym., 1988) tai haptenei/vasta-aine (Reardan ym., 1985) -systemit. Näiden lisäksi on käytetty myös DNA/DNA- (Bos ym., 1994) sekä ”prodrug”/entsyymi-systeemiä (ks. yleiskatsaus Bagshawe 1989).

### 1.5.3 Avidiini-biotiini-systeemi

Avidiini-biotiini-systeemin hyödyntämistä kohdennetussa lääkehoidossa on tutkittu 1980-luvun lopulta asti. Ensimmäiset *in vivo*-kokeet tehtiin eläinmalleilla (Hnatowich ym., 1987; Paganelli ym., 1988). Kokeissa havaittiin, että perinteisiin metodeihin (vasta-aineen suora leimaus radionuklidilla) verrattuna avidiini-biotiini systeemin käyttö parantaa radionuklidin kertymistä kohteeseen sekä vähentää normaaliin kudokseen kohdistuvaa haittaa. Avidiini-biotiini-systeemin etuna on molekyylien välinen suuri affiniteetti sekä avidiinin mahdollisuus sitoa useampaa kuin yhtä biotiinimolekyyliä (Green 1975a). Lisäksi avidiinin sukulaisproteiinien, kuten streptavidiinien, sekä geneettisesti tai biokemiallisesti muokattujen (strept)avidiinikonstruktioiden (ks. yleiskatsaus Wilbur ym., 1999) hyödyntäminen laajentaa tekniikan käyttömahdollisuuksia.

Avidiinin ja streptavidiinien biokemiallisista eroista johtuen ne käyttäytyvät elimistössä eri tavalla. Avidiini on glykolysoitu ja sillä on korkea pI. Glykolysaatio aiheuttaa avidiinin kerääntymisen maksaan. Korkeasta pI:stä ja glykolysaatiosta johtuen avidiini poistuu elimistöstä suhteellisen nopeasti. (Rosebrough 1993; Yao ym., 1999). Streptavidiini kiertää verenkierrossa pidempään kuin avidiini ja kerääntyy pääasiassa munuaisiin (Schechter

ym., 1990; Rosebrough 1993). Streptavidiini on avidiinia antigeenisempi aiheuttaen elimistössä voimakkaamman immunogeenisen reaktion (Chinol ym., 1998). Avidiinin ja streptavidiinin käyttäytymiseroja *in vivo* voidaan hyödyntää esikohdennetun lääkehoidon eri vaiheissa. Esimerkiksi streptavidiinin pitkää kiertoaikaa verenkierrossa hyödynnetään käyttämällä sitä ennalta kohdennetun lääkehoidon viimeisessä vaiheessa viemään radionuklidi syöpäkasvaimen pinnalle. Avidiinin lyhyt kiertoaika mahdollistaa tehokkaan ja nopean biotinyloitujen vasta-aineiden poiston verenkierrosta ennen vaikuttajakonjugaatin lisäystä.

Avidiinin ja streptavidiinin biokemialliset ja immunologiset ominaisuudet usein kuitenkin rajoittavat niiden käyttöä kohdennetun lääkehoidon sovelluksissa. Eräs ratkaisu ongelmaan on muokata proteiinien ominaisuuksia optimaalisimmiksi joko biokemiallisilla modifikaatioilla tai mutageneesin avulla. Esimerkiksi antigeenisyyden vähentäminen on toivottavaa, jotta potilaalle voidaan antaa useita terapiakäsittelyitä peräkkäin ja täten parantaa lääkehoidon tehokkuutta. Myös proteiinin verenkierrossa kulkemaa aikaa on toisinaan tarve lyhentää tai pidentää käyttötarkoituksesta riippuen.

Avidiinin kiertoaikaa verenkierrossa voidaan pidentää deglykolysaatiolla ja/tai asetyloimalla lysiniähteet, jolloin avidiinin varaus neutralisoituu (Rosenbrouhg ja Hartley 1996). Myös polyetyleni glykoli (PEG) -konjugaatin kiinnittäminen avidiiniin lisää avidiinin kiertoaikaa sekä vähentää sen antigeenisyyttä elimistössä (Chinol ym., 1998). Toisaalta PEGylaatio vähentää avidiinin affiniteettia biotiiniin. Streptavidiiniin voidaan kovalenttisesti kiinnittää galaktoositähteitä, jolloin maksasolujen galaktoosireseptorit sitovat streptavidiinia tehokkaammin. Sen johdosta streptavidiinin kertyminen maksaan lisääntyy sekä poistuminen verenkierrosta nopeutuu (Rosenbrough ja Hartley, 1996). Meyer ym. (2001) onnistuivat vähentämään streptavidiinin antigeenisyyttä mutatoimalla sen pinta-aminohappoja. Tehokkaimmin antigeenisyyttä vähensi varautuneiden, aromaattisten tai isojen hydrofobisten pinta-aminohappojen korvaaminen pienillä neutraaleilla aminohapoilla.

Hytönen ym. (2003) etsivät tutkimuksessaan uusia potentiaalisia proteiineja, joita voitaisiin hyödyntää avidiinin ja streptavidiinin rinnalla kohdennetun lääkehoidon sovelluksissa.

Neljän eri siipikarjalinnun munanvalkuaisista eristettiin avidiinin kaltaisia proteiineja ja tutkittiin niiden ominaisuuksia. Kaikki eristetyt proteiinit olivat biotiinin sitomiskyvyltään avidiinin veroisia. Immunologiset kokeet osoittivat, että nämä ”uudet avidiinit” eivät ristiinreagoineet kanan avidiinin vasta-aineiden kanssa. Potilaiden seerumilla tehdyjen kokeiden perusteella kolme neljästä proteiinista aiheutti pienemmän immunologisen vasteen kuin esimerkiksi kanan avidiini. Tulosten perusteella ”uudet avidiinit” tarjoavat varteenotettavan mahdollisuuden hyödyntää niitä avidiinin ja streptavidiinin rinnalla niin kohdennetussa lääkehoidossa kuin muissakin lääketieteen sovelluksissa.

Avidiini-biotiini-systeemin joustavuus mahdollistaa monia eri tapoja kohdentaa terapeutti yhdiste syöpäkasvaimen. Eri metodeja on raportoitu kaksivaiheisesta viisivaiheiseen menetelmään asti. Italialainen Paganellin tutkimusryhmä on tehnyt kliinisiä kokeita avidiini-biotiini systeemillä lähes kahdenkymmenen vuoden ajan ja systeemiä on sovellettu jo monien eri syöpäsairauksien hoitoon sekä kuvantamiseen. Paganelli ym. ovat kehittäneet kolmivaiheisen metodin, jonka ensimmäisessä vaiheessa käytetään biotinyloitua vasta-ainetta, toisessa avidiinia ja kolmannessa radioleimattua biotiinia. Menetelmää testattiin kuvantamistarkoituksessa potilailla, joilla oli todettu keuhko-, rinta-, kilpirauhas- tai ruuansulatuskanavan syöpä (Paganelli ym., 1991). Vasta-aineena käytettiin kyseisten kasvainten tuottaman karsinoembryoonisen antigeenin (CEA) tunnistavaa anti-CEA:ta. Kasvaimet havaittiin tällä menetelmällä potilailta lähes 100 %:sti. Menetelmään perustuva terapeutti koe tehtiin aivokasvainpotilaille käyttäen radionuklidina <sup>90</sup>Y:tä (Paganelli ym., 1999). Tulokset olivat lupaavia. Jatkotutkimuksissa havaittiin, että Paganellin ym. esittelemä kolmivaiheinen radioimmunoterapia estää pahalaatuisen aivogliooman kehittymistä, pidentää sen uusiutumisaikaa sekä potilaan elinikää (Grana ym., 2002).

Yhdysvaltalainen NeoRx ryhmä on kehittänyt biotiiniin ja streptavidiniin perustuvan kolmivaiheisen menetelmän, jonka ensimmäisessä vaiheessa käytetään streptavidini-vasta-aine konjugaattia, toisessa biotiinialaktoosialbumiinkonjugaattia ja kolmannessa radioleimattua DOTA-biotiinia. Radioleimana on kuvantamistarkoituksessa <sup>111</sup>In ja radioimmunoterapiassa <sup>90</sup>Y. Vasta-aineena käytetään NR-LU-10:tä, joka tunnistaa monen epiteeliperäisen syövän, kuten keuhko-, paksusuoli-, rinta- ja munasarjasyövän,

ekspressoiman glykoproteiinantigeenin (Breiz ym., 2000). Menetelmää on testattu eläinkokeilla (Axworthy ym., 2000) sekä sitä on käytetty radioimmunoterapiana muun muassa paksusuolensyövän hoidossa (Knox ym., 2000). Toisessa NeoRx-ryhmän tutkimuksessa kolmivaiheista radioimmunoterapiaa sovellettiin non-Hodkinsin lymfooman (NHL:n) hoitoon (Weiden ym., 2000). Ensimmäisessä vaiheessa potilaille annettiin streptavidiinin konjukoitua kimeeristä IgG1, anti-CD20 vasta-ainetta (Rituximab), joka tunnistaa spesifisesti syöpäkasvaimen ekspressoiman antigeenireseptorin (CD20:n). Toisessa vaiheessa käytettiin biotiini-N-asetyyligalaktosamiinia poistamaan ylimääräiset streptavidiinivasta-aine konjugaatit elimistöstä. Lopuksi potilaille annettiin radioleimattua tetra-azacyclododecanetetra-aceticacid-biotiinia (DOTA-biotiinia). Tulokset olivat lupaavia: seisemästä <sup>90</sup>Y-DOTA-biotiinia saaneista potilaista kuudella todettiin syöpäkasvaimen regressiota. Lisäksi hoidosta aiheutuvat sivuvaikutukset normaalille kudokselle olivat vähäisiä.

Hnatowich ym. (1993) havaitsivat, että (strept)avidiiini kertyy myös ilman vasta-ainekonjugaattia syöpäkasvaimen pinnalle. Radioleimatun streptavidiinin biodistribuuatio elimistössä oli samankaltainen kuin radioleimatun spesifisen vasta-aineen, mutta tausta verenkierrossa oli vähäisempi. Tästä johtuen kasvain / normaali kudos radioaktiivisuussuhde parani leimattua streptavidiinin käytettäessä, vaikka streptavidiinin konsentroituminen syöpäkasvaimeen oli vähäisempää kuin leimatun spesifisen vasta-aineen. Yao ym. (1998) havaitsivat, että natiivi avidiini kertyy lektiinejä ekspressoivien syöpäkasvainten pinnalle. Avidiinin oligosakkaridiketju sisältää joihinkin lektiineihin sitoutuvia mannoosi- ja N-asetyyliglukosamiinitähteitä (Savage ym., 1992). Kokeissa havaittiin, että radioleimattu avidiini konsentroitui nopeasti ja tehokkaasti kasvaimen normaalin kudoksen radioaktiivisuustason pysyessä matalana. Hnatowichin ym. (1993) ja Yaon ym. (1998) tulosten perusteella voidaan streptavidiinia ja avidiinia pitää lupaavina kohdennetun lääkehoidon ”työkaluina” radionuklidien, lääkkeiden, toksiinien sekä terapeuttisten geenien viemisessä syöpäkasvaimeen.

Avidiini-biotiini-systeemiä on käytetty myös kuljettamaan lääkeaineita aivoihin aivoveriesteen läpi (ks. yleiskatsaus Bickel ym., 2001). Menetelmässä avidiini kiinnitetään kovalenttisesti aivoveriesteen läpäisevään kuljetusvektoriin, jolloin kyseistä

fuusioproteiinia voidaan käyttää lähes minkä tahansa biotinyloidun lääkeaineen kuljettamiseen aivoihin. Yoshikawa ja Pardridge (1992) konjukoivat avidiinin kovalenttisesti hiiren aivoveriesteen läpäisevään OX26 nimiseen monoklonaaliseen vasta-aineeseen. Konjugaattiin sitoutunut <sup>3</sup>H-biotiini kulki aivoveriesteen läpi samalla nopeudella kuin konjukoimaton OX26.

## 1.6 RHIZOBIA-BAKTEERIKANTA

*Rhizobia*-bakteerikanta kuuluu  $\alpha$ -proteobakteereihin ja sillä on kyky muodostaa symbioottinen suhde isäntäkasvin kanssa osallistumalla sen typpiaineenvaihduntaan muuttaen ilmakehän tyypeä kasville käyttökelpoiseksi ammoniakiksi. Toiminnallaan bakteeri tehostaa isäntäkasvin fotosynteesiä (Bethelenfalvay ym., 1978) ja saa vastineeksi fotosyntaattia. *Rhizobia*-bakteerikantaan kuuluvat muun muassa *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* ja *Sinorhizobium* bakteerilajit (ks yleiskatsaus Guillen-Navarro ym., 2005). Niiden isäntäkasveina toimivat palkokasvit, kuten herne, papu, apila tai alfa-alfa, jonka juuriin ne pystyvät tunkeutumaan. Pian *Rhizobia* infektion jälkeen isäntäkasvin juuriin muodostuu juurinystyrä, jossa bakteeri elää ja lisääntyy. (West ym., 2002).

*Rhizobia*-bakteerikannan infektiota isäntäkasvin juureen ja juurinystyröiden muodostumista säätelee useat geenit ja tapahtumasarja vaatii kasvin ja bakteerin vuorovaikutusta erilaisten kemiallisten signaalien välityksellä. Juurinystyröiden muodostumiseen osallistuvat bakteerin geenit (*nod*-geenit) aktivoituvat kasvin juurten välittämistä signaaleista, flavonoideista. Sen seurauksena bakteeri biosyntetisoi lipooligosakkaridi signaalimolekyylejä, jotka indusoivat juurinystyrämeristeemin kasvun alkamista ja edesauttavat bakteerien pääsyä meristeemin läpi. Meristeemin läpäistyään bakteerien typpiaineenvaihduntaan osallistuvat geenit aktivoituvat. (Ks. yleiskatsaus Downie 1994).

Useat *Rhizobia*-bakteerit kykenevät biotiinin biosynteesiin. Geneettiset analyysit ovat osoittaneet, että biotiinin syntetisointiin kykenevillä *Rhizobia*-bakteereilla on genomissaan biotiinin biosynteesiä koodaava geeniklusteri (*bio*-geenit), mutta geeniklusterin koko ja sen sisältämät geenit vaihtelevat lajeittain. Toisilla *Rhizobia*-bakteereilla on täydellinen

biosynteesikoneisto (ks. kappale 1.3.2, s. 22) ja toiset käyttävät biotiinin biosynteesiin vaihtoehtoisia keinoja. On esitetty, että biotiinin biosynteesiin kykenevät *Rhizobia*-bakteerit ”syventävät” symbioottista suhdettaan isäntäkasvin kanssa syntetisoimalla biotiinia isäntäkasvin tarpeisiin. Biotiinin kuljetus bakteerin solukalvon ja -seinän läpi vaatii biotiinin ”kuljetuskoneiston”. *Rhizobia*-bakteerit ovatkin ainoita prokaryootteja, joiden genomista on tunnistettu biotiinin kuljetusproteiinien geenejä. (Ks. yleiskatsaus Guillen-Navarro ym., 2005)

## **2 TUTKIMUKSEN TARKOITUS**

Pro Gradu -tutkimuksessa tuotettiin ja puhdistettiin bakteeriperäistä avidiinin sukulaisproteiinia, rhizavidiinia. Tarkoituksena oli saada tutkimustietoa rhizavidiinin ominaisuuksista kuten rakenteesta, stabiilisuudesta, biotiinin sitomisesta, lämmönkestävyydestä sekä immunologisista ominaisuuksista. Ominaisuuksia verrattiin avidiinin, streptavidiinin ja bradavidiinin ominaisuuksiin ja pohdittiin niiden yhtäläisyyksiä ja eroja.

## **3 MATERIAALIT JA MENETELMÄT**

### **3.1 RHIZAVIDIINIGEENIN DNA:N KÄSITTELY**

#### **3.1.1 Alukkeiden suunnittelu**

Rhizavidiinia koodaava geeni monistettiin polymeraasiketjureaktiolla (PCR) käyttäen templaattina *Rhizobium etli* cDNA:ta. Kohteena oli komplementaarinen juoste U80928.4: 293047-293586, johon alukkeet suunniteltiin:



```

293041 aggagattaa tcoctcaaga ggcttttgtt ctcagtcgtc ggcacgtact gaaagtgctc
293101 ttgtccttgc tcaatggccg gaccggagcc gccttcgtaa gcgagggtcc agtcctgac
293161 tatctcagtg ttggtgccgt tgacctgtgc gtagccggtc catccggttg cggaaattgca
293221 gttctccgtc gaattgttcc agccgaccga aaatgcgatg aacgtcccgt ttacccttcc
293281 tgttagcggg tagggcgagt tctggcatcc ggtgccctgg gctctgttta catattggcc
293341 ggagacattt ccgaacgagt cgacttgaat gatcatcgtc gagccggact ggttctgcca
293401 actgctggaa gccgatgcca tgcttgaaaa atccttgaag ttgcttgcat cgaagcaag
293461 agctgagggt gctacagcaa acacaagtgc tgcaactgca ttagtacgga tcatggtttt
293521 tcctcctgat gtgcccggac cgtcggcgat cgtaccgaag gttgcatata aactcgtaat
293581 aatcaatcaa

```

Rhizavidiinigeenillä on harvinainen translaation aloituskodoni (AAC), joten alukkeessa se muutettiin ATG:ksi.

Vastinjuoste, jossa aloituskodoni on muutettu tavalliseksi:

```

Atgattatta cgagtttata tgcaaccttc ggtacgatcg ccgacggctg gcgcacatca
ggaggaaaaa ccatgatccg tactaatgca gttgcagcac ttgtgtttgc ttagcaacc
tcagctcttg ctttcgatgc aagcaacttc aaggattttt caagcatcgc atcggcttcc
agcagttggc agaaccagtc cggctcgacg atgatcattc aagtcgactc gttcggaaat
gtctccggcc aatatgtaaa cagagcccag ggcaccggat gccagaactc gcctatccg
ctaacaggaa gggtaaaccg gacgttcacg gcattttcgg tcggctggaa caattcgacg
gagaactgca attccgcaac cggatggacc ggctacgcac aggtcaacgg caacaacact
gagatagtca cgagctggaa cctcgcttac gaaggcggct ccggtccggc cattgagcaa
ggacaagaca ctttcagta cgtgccgacg actgagaaca aaagcctctt gaaggattaa

```

Alukkeet suunniteltiin siten, että rhizavidiinigeeni monistui PCR:ssä pidempänä villin tyypin muotona (koko geeni) ja lyhyempänä ydinmuotona. Ydinmuodossa rhizavidiinigeenin signaalisekvenssi monistui lyhyempänä. Ennusteen mukaan myös lyhyempi signaalipeptidi oli toimiva. Se katkesi todennäköisesti samasta kohdasta kuin kuin villin tyypin pidempi signaalipeptidi eli valmis proteiini oli kummassakin muodossa identtinen. 5'-päiden alukkeisiin lisätty "cacc"-nukleotidipätkä oli TOPO-vektoriin kloonauksen kannalta oleellinen, jotta insertti ligoitui vektoriin oikein päin.

5'-aluke (villin tyypin muoto): "Rhiz wt5" 5'-caccATGATTATTACGAGTTTATATGC-3'

Tämä oligonukleotidi tunnistaa *Rhizobium etli* cDNA:n komplementaarista juosteesta nukleotidit 293586-293564

5'-aluke (ydinmuoto): "Rhiz core5" 5'-caccATGATCCGTAATAATGCAGTTGC-3'

Tämä oligonukleotidi tunnistaa *Rhizobium etli* cDNA:n komplementaarista juosteesta nukleotidit 293514-293492

3'-aluke: "Rhiz3end" 5`-TTAATCCTTCAAGAGGCTTTTGT-3`

Tämä oligonukleotidi tunnistaa *Rhizobium etli* cDNA:n vastinjuosteesta nukleotidit 293047-293069.

Alukkeet olivat TAG Copenhagen A/S:n valmistamia.

### 3.1.2 Rhizavidiinigeenin monistaminen

Rhizavidiinigeenin monistusta varten tehtiin kaksi eri reaktioseosta, joista toisessa käytettiin 5'-pään alukkeena "Rhiz wt5:tä" ja toisessa 5'-pään alukkeena "Rhiz core5:tä". Tarkoituksena oli monistaa rhizavidiinigeenistä kumpaakin muotoa – villin tyypin muotoa ja ydinmuotoa. Templaattina käytettiin rhizavidiinigeenin cDNA:ta. Polymeraasiketjureaktioissa käytettiin seuraavanlaisia reaktioseoksia:

#### Villin tyypin muoto:

10 µl dNTP-seosta

1 µl "Rhiz wt5" -aluketta (100 pmol)

1 µl "Rhiz 3end" -aluketta (100 pmol)

10 µl 10 x Pfu:n puskuria

1 µl templaatti DNA:ta

76 µl H<sub>2</sub>O

#### Ydinmuoto:

10µl dNTP-seosta

1µl "Rhiz" core5 –aluketta (100 pmol)

1 µl "Rhiz" 3end –aluketta (100 pmol)

10 µl 10 x Pfu:n puskuria

1 µl templaatti DNA:ta

76 µl H<sub>2</sub>O

Edelläkuvatuista reaktioseoksista tehtiin kaksi rinnakkaista putkea jakamalla molemmat reaktioseokset kahteen eri 100 µl:n PCR-putkeen. (50µl reaktioseosta/putki).

PCR monistukset suoritettiin seuraavasti: Putket asetettiin PCR-laitteeseen (Whatman BioMetra T-personal), jossa niitä pidettiin 10 min 95 °C:ssa. Tämän jälkeen putkiin lisättiin 1µl Pfu-entsyymiä. PCR-laitteen annettiin suorittaa seuraava ohjelma:

1. 1 min 94 °C
2. 1 min 50 °C

3. 1.5 min 72 °C
- 30 x kohdat 1-3
4. 10 min 72 °C
5. pause 4 °C

### 3.1.3 Agaroosigeelielektroforeesi ja DNA:n eristäminen geelistä

PCR monistuksen jälkeen PCR-tuotteet ajettiin agaroosigeelielektroforeesilla (AGE).

1.5 % agaroosigeeli valmistettiin seuraavasti: 3g agaroosia liuotettiin 200 ml:aan yksinkertaista TAE-puskuria ja liuoksen annettiin kiehahtaa mikroaaltouunissa. Kun liuos oli jäähtynyt noin 55 °C asteiseksi, liuokseen lisättiin 10 µl etidiumbromidia (EtBr) (10 mg/ml). EtBr lisäyksen jälkeen geeli valettiin elektroforeesilaitteen kelkkaan, jonka päät oli suljettu teipillä, näytekammat asetettiin paikoilleen ja geelin annettiin jähmettyä noin 30 minuuttia.

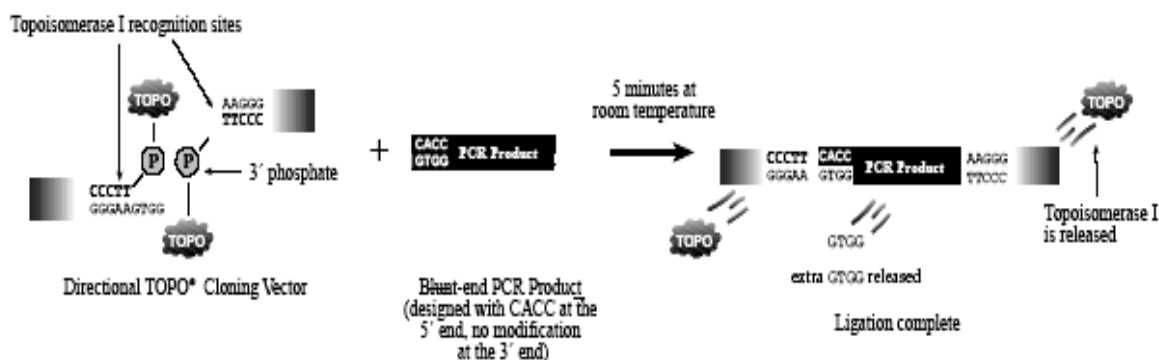
PCR-tuotteisiin (à 50 µl) lisättiin kymmenenkertaista AGE-näytepuskuria (10 x DNA LB) 6µl:aa.

Elektroforeesikelkan päistä poistettiin teipit, kelkka asetettiin elektroforeesilaitteeseen (Bio-Rad Subcell®GT) ja laite täytettiin yksinkertaisella TAE-puskurilla niin, että puskurin pinta oli pari millimetriä agaroosigeelin pinnan yläpuolella. Näytteet ja 100 emäsparin DNA-kokostandardi (Biolabs) pipetoitiin kaivoihin. AGE-laitteen kansi asetettiin paikoilleen ja näytteitä ajettiin noin 45 minuuttia (100V). AGE ajon jälkeen agaroosigeeli asetettiin UV-valopöydälle (Raiser RS2) ja geeli kuvattiin kameralla (Ikegami CCD). Oikean kokoiset DNA-vyöhykkeet leikattiin irti geelistä ja geelipalat asetettiin 1.5 ml:n Eppendorf putkiin. DNA eristettiin ja puhdistettiin käyttämällä Nucleospin Extract II® (Biotop) kittiä valmistajan ohjeiden mukaisesti. DNA:n eluointiin käytettiin 35 µl:aa H<sub>2</sub>O:ta.

### 3.1.4 TOPO<sup>®</sup>-kloonaus, ”heat shock” transformaatio ja solujen maljaus

PCR-tuotteiden kloonamiseen pET101/D-TOPO<sup>®</sup> -vektoreihin ja vektoreiden transformaatioon kompetentteihin *E. coli* TOP10<sup>™</sup> soluihin käytettiin TOPO<sup>®</sup> kloonaus kittiä (Invitrogen). PCR-tuotteet kloonattiin TOPO<sup>®</sup>-vektoreihin DNA topoisomeraasientsyymi I:sen aktiivisuuteen perustuvalla menetelmällä. Topoisomeraasi I toimii sekä restriksioentsyyminä että ligaasina. Se tunnistaa spesifisesti pentameerisen sekvenssin 5’-(C/T)CCTT-3’. TOPO<sup>®</sup>-vektori on suunniteltu siten, että linearisoidun vektorin kummankin pään 3’-fosfaattiin on kovalenttisesti kiinnitetty topoisomeraasientsyymi. Tämä mahdollistaa DNA-ketjujen ligation vektorin sisään. Kuva 3,1 havainnollistaa ligationreaktion kulun. pET101/D-TOPO<sup>®</sup>-vektori sisältää muun muassa insertti-DNA:n translaatiota ohjaavan T7/*lac*-operaattorin ja ampicilliiniresistanssigeenin.

Figure 3 – Directional TOPO<sup>®</sup> Cloning of blunt-end DNA



Kuva 3,1: (TOPO Cloning Kit Brochure) TOPO-kloonauksen vaiheet

Villityypin ja ydinmuodon PCR-tuotteista tehtiin erilliset TOPO<sup>®</sup>-kloonaukset. TOPO<sup>®</sup>-kloonauksissa käytettiin seuraavanlaisia reaktioseoksia:

2 µl PCR-tuotetta (villityyppi tai ydinmuoto), joiden 5'-päässä ”cacc”-sekvenssi

0.5 µl Salt solution (kitistä)

0.5 µl pET101/D-TOPO<sup>®</sup> -vektoria (kitistä)

TOPO<sup>®</sup>-kloonaus ja transformaatio kompetentteihin *E. coli* TOP-10<sup>™</sup> soluihin suoritettiin seuraavan ohjeen mukaan. Reaktioseokset pipetoitiin 1.5 ml:n Eppendorf putkiin ja seoksia inkuboitiin huoneenlämmössä 10 minuuttia. Inkuboinnin jälkeen seokset siirrettiin jäälle. Otettiin yksi TOP-10<sup>™</sup> soluputki (à 50µl) pakkasesta (-70 °C) jäälle sulamaan. Soluja sulatettiin sen verran, että ne pystyttiin hieman hileisinä jakamaan kahteen esijäähdytettyyn 1.5 ml:n Eppendorf putkeen (soluja 25 µl/putki). Pipetointi suoritettiin nopeasti ja varovasti putkien ollessa jäällä koko pipetoinnin ajan. TOP-10<sup>™</sup> solujen päälle lisättiin 3 µl edellä valmistettuja reaktioseoksia ja sekoitettiin varovasti pipetinkärjellä. Putkia inkuboitiin jäällä 30 minuuttia. Inkuboinnin jälkeen tehtiin ”heat shock” -transformaatio pitämällä putkia lämpöblokissa (42 °C, 30 s), jonka jälkeen putket siirrettiin takaisin jäälle. Putkiin lisättiin 250 µl:aa S.O.C.-liuosta ja putket siirrettiin lämpökaappiin (37 °C) tunniksi, minkä aikana putkia käytiin kääntelemässä pari kertaa.

Tämän jälkeen solut maljattiin LB<sub>amp</sub>-maljoille (ampisilliiniä 50 µg/ml). Kumpikin 250 µl:n transformaatioseos jaettiin kahdelle LB<sub>amp</sub>-maljalle. Toiselle maljalle maljattiin 100 µl ja toiselle 150µl transformaatioseosta. Maljaukset suoritettiin laminaarissa. Tämän jälkeen LB<sub>amp</sub>-maljat siirrettiin lämpökaappiin (37 °C) ja niitä kasvatettiin yön yli.

### 3.1.5 Liemikasvatukset ja plasmidi-DNA:n eristys

LB<sub>amp</sub>-maljoille kasvaneista pesäkkeistä tehtiin jatkosiirrostukset 5 ml:n LB-elatusainetta, johon oli lisätty 5 µl:aa ampisilliinia (100 µg/ml). Liemikasvatuksiin valittiin 4 pesäkettä kummastakin geenimuodosta (ydin ja villityyppi). Kasvatusputkina käytettiin 50 ml:n Nunc-putkia. Jatkosiirrostukset liemikasvatuksiin tehtiin laminaarissa. Tämän jälkeen Nunc-putket siirrettiin tasoravistelijaan (Forma Scientific Orbital Shaker) (37 °C, 225 rpm). Liemiviljelmien annettiin kasvaa yön yli, jonka jälkeen plasmidi-DNA eristettiin ja puhdistettiin NucleoSpin<sup>®</sup>-kitillä (Biotop) valmistajan ohjeiden mukaan. Plasmidi-DNA:n eluointiin käytettiin 50 µl:aa esilämmitettyä (70 °C) H<sub>2</sub>O:ta.

### 3.1.6 PCR sekvensointia varten, DNA:n etanolisaostus ja sekvensointi

Jotta pystyttiin selvittämään, missä klooneissa oikea insertti sijaitsee, plasmidi-DNA:t sekvensoitiin. Villityypin muodon insertin sekä ydinmuodon insertin sisältävät pET101/D-TOPO<sup>®</sup>-vektorit sekvensoitiin. Sekvensointi suoritettiin ABI 310 Genetic Analyzer -sekvensointilaitteella.

Plasmideita monistettiin sekvensointireaktioita varten PCR:llä. Alukkeina PCR-reaktioissa käytettiin TOPO<sup>®</sup>-kitin alukkeita (pET101forw ja pET101rev), jotka tunnistivat alueet pET101/D-TOPO<sup>®</sup>-vektorissa sijaitsevan insetin kummaltakin puolelta.

PCR-reaktioseoksen ainesosia laimennettiin seuraavasti; templaattia (plasmidi-DNA:ta) laimennettiin 1:10 H<sub>2</sub>O:lla ja alukkeita laimennettiin pitoisuuteen 1.6 µM H<sub>2</sub>O:lla. Kaupallinen TRR-seos (BigDye<sup>®</sup> Terminator v 3.1 Sequencing RR-100, Applied Biosystems) laimennettiin 1:2 Tris-MgCl<sub>2</sub>-puskurilla (200 mM Tris, 5 mM Mg Cl<sub>2</sub>, pH 9). TRR-seos sisältää puskurin, entsyymin, deoksynukleotidit ja leimatut terminaattorit oikeassa suhteessa. Pipetoitiin kaksi reaktioseosta, joissa toisessa käytettiin ”forward-” ja toisessa ”reverse” –aluketta, 0.5 ml:n Eppendorf-putkiin:

”Forward” –reaktioseos:

5 µl laimennettua templaattia  
1 µl pET101forw (1.6 µM)  
4 µl laimennettua TRR- mixiä

”Reverse” –reaktioseos:

5 µl laimennettua templaattia  
1 µl pET101rev (1.6 µM)  
4 µl laimennettua TRR- mixiä

PCR-laitteen (Whatman Biometra T-personal) annettiin suorittaa seuraavanlainen ohjelma:

1. 30 s 96 °C
  2. 15 s 50 °C
  3. 4 min 60 °C
- 25 kertaa kohdat 1-3
4. pause 4 °C

Ennen DNA-sekvensointia PCR:lla monistettu plasmidi-DNA saostettiin etanolisaostuksella. Etanolisaostuksella päästiin eroon PCR-tuotteeseen jääneistä vapaista fluoresenssileimatuista terminaattoreista, jotka olisivat voineet aiheuttaa haitallista taustaa sekvensointiajossa.

PCR-tuotteiden etanolisaostus suoritettiin seuraavan ohjeen mukaan. PCR-tuotteiden sekaan pipetoitiin 1 µl Na-asettaattia (3 M, pH 5.2) ja 25 µl:aa 94 %:sta etanolia. Tuotteiden annettiin saostua huoneenlämmössä 15 minuuttia. Tämän jälkeen putkia sentrifugoitiin mikrosentrifuugilla (Eppendorf Centrifuge 5415D) 20 minuuttia (13 200 rpm). Putket asetettiin mikrosentrifuugiin siten, että korkkien saranapapit osoittivat ulospäin. Tämä tehtiin siksi, että tiedettiin, mille reunalle näkymätön sakka kerääntyy sentrifugoinnin aikana. Sentrifugoinnin jälkeen neste poistettiin vesi-imulla sakan vastakkaiselta puolelta. Tämän jälkeen putkiin pipetoitiin 200 µl 70 % etanolia ja putkia sentrifugoitiin 5 min (13 200 rpm). Etanoli poistettiin vesi-imulla ja sakkaa kuivattiin putkien korkkien ollessa auki niin pitkään, että putkessa ei enää näkynyt nestettä. Sakka suspensioitiin 12 µl:aan kaupallista TSR-seosta (Template Suppression Reagent, Applied Biosystems). Näytteet denaturoitiin PCR-laitteessa (Whatman Biometra T-personal) (92 °C, 2 min), jonka jälkeen putket siirrettiin jäälle. Lopuksi putkia vielä sentrifugoitiin lyhyesti (n. 10 s), jotta kaikki nestepisarot saatiin putkien pohjille.

DNA sekvensointia varten näyteputkista leikattiin korkit pois ja tilalle laitettiin kumiset septat. Näyteputket asetettiin ABI 310 Genetic Analyzeriin ja sekvensointiohjelma käynnistettiin.

## 3.2 RHIZAVIDIININ TUOTTAMINEN JA PUHDISTAMINEN

### 3.2.1 Rhizavidiinin tuottaminen bakteerisolusysteemillä

Rhizavidiinigeenin kumpaakin muotoa (villityyppi ja ydinmuoto) pyrittiin tuottamaan. Proteiiniekspressiossa käytettiin *E. coli* BL-21-AI<sup>TM</sup> (Invitrogen) soluja. Rhizavidiinigeenin sisältämät pET101/D-TOPO<sup>®</sup>-vektorit transformoitiin BL21-AI<sup>TM</sup>

-soluihin "heat shock" –transformaatiolla, joka suoritettiin kuten edellä. Solut maljattiin laminaarissa LB<sub>amp+tet</sub>-maljoille joihin oli lisätty ennen maljausta 55 µl:aa 2 M glukoosia (0,1 % w/v). Maljoja kasvatettiin lämpökaapissa (37 °C) yön yli.

Maljoilta siirrostettiin pesäkkeet 10 ml:n siemenkasvatukseen. Elatusaineena käytettiin 10 ml:aa LB-elatusliuosta, johon oli lisätty 10 µl:aa ampicilliiniä (100µg/ml) ja 10 µl:aa 2 M:sta glukoosia. Siemenkasvatukset suoritettiin 100 ml:n Erlenmayer-pulloissa tasoravistelijassa (26 °C, 220 rpm) yön yli.

Seuraavana aamuna siemenet siirrettiin tuottokasvatukseen. Ensimmäiset proteiinin tuottokasvatukset tehtiin 500 ml:n tilavuudessa. Myöhemmin tehtiin myös 2.5 litran tuottokasvatuksia. 500 ml:n tuottokasvatuksessa kasvatusmediumina käytettiin 500 ml:aa LB-elatusliuosta, johon oli lisätty ampicilliinia (100 µg/ml) 500 µl ja 2 M:sta glukoosia 500 µl:aa. Tuottokasvatukset suoritettiin 2 l:n Erlenmayer-pulloissa tasoravistelijassa (26 °C, 220 rpm), kunnes soluviljelmästä mitattu OD<sub>600</sub>-arvo oli 0.2 – 0.3. Bakteritiheyden mittaamiseen käytettiin spektrofotometriä (Perkin Elmer MBA 2000). Kun riittävä bakteritiheys saavutettiin, kasvatatus indusoitiin L(+)-arabinoosilla (Sigma) (0.2 % w/v). Indusointi suoritettiin siten, että L(+) arabinoosi liuotettiin pieneen määrään LB-elatusainetta ja liuos kaadettiin tuottokasvatuksen sekaan, minkä jälkeen kasvatuksia inkuboitiin tasoravistelijassa (26 °C, 225 rpm) yön yli. Proteiinin tuotot pysäytettiin sentrifugoimalla Sorval RC5 -sentriguugilla solut pohjaan (10 min, 5000 rpm).

### 3.2.2 Rhizavidiinin puhdistaminen affiniteettikromatografialla

Proteiinin puhdistus suoritettiin affiniteettikromatografialla. Resiininä pylväässä käytettiin agarosiin immobilisoitua 2-iminobiotiinia (Affiland 2-iminobiotin-Sepharose® 4 Fast Flow). Menetelmä perustuu rhizavidiinin kykyyn sitoutua resiinin 2-iminobiotiinimolekyyleihin pH:ssa 11 ja irrota happamassa pH:ssa. Proteiinin puhdistus suoritettiin seuraavasti:



#### Pylvään valmistus ja resiinin esikäsitteleminen:

1. Pylvääseen pipetoitiin proteiinin tuoton tilavuudesta riippuen sopiva määrä resiiniä (1-5 ml).
2. Resiiniä tasapainotettiin juoksuttamalla 50 ml:aa pH 11-puskuria pylvään läpi.

#### Bakteerisolujen hajotus:

1. Tuoton pysäytyksen jälkeen (ks. edellä) bakteeripelletti suspensoitiin Set-puskuriin. Set-puskuria käytettiin 4 ml / 100 ml:aa tuottokasvatusviljelmää.
2. Solususpensioon lisättiin lysotsyymia (5 mg/ml) 50 µl / 100 ml:aa tuottokasvatusviljelmää.
3. Solususpensiota inkuboitiin jäällä 30 min tai suspensio pakastettiin (-20 °C) myöhempää puhdistusta varten.
4. Jos solususpensio oli pakastettu, se sulatettiin vesihauteessa. Sulaan solususpensioon lisättiin HilloI-puskuria 10 ml / 100 ml:aa tuottokasvatusviljelmää.
5. Solususpensiota sonikoitiin 50 ml:n Nunc-putkissa jäähauhteessa 2 x 60 s (Sonic VibraCell™-laite, 40 % amplitudi, "1s on / 1 s off" -ohjelma). Sonikointikertojen välissä putkia pidettiin jäähauhteessa.
6. Lysaatista otettiin 100 µl:n näyte (T) SDS-PAGE analysointia varten. Tämän jälkeen lysaatti siirrettiin 250 ml:n Sorval RC5-ultrasentrifuugin sentrifuugiputkiin ja putket tasapainotettiin sentrifugointia varten H<sub>2</sub>O:lla. Lysaattiliuosta sentrifugoitiin 2 x 15 min GSA-roottorissa Sorval RC5 -sentrifuugilla (15 000 g, 4 °C).

#### Lysaatin suodatus ja pH:n tasapainotus:

1. Sentrifugaation jälkeen supernatantti suodatettiin Miracloth-suodatinkankaan läpi. Suodatuksen jälkeen supernatantista otettiin 300 µl:n näyte (L1) SDS-PAGE-analyysia varten. Pelletti suspensoitiin 50 ml:aan PBS-puskuria ja siitä otettiin 300 µl:n näyte (S). Pelletti pakastettiin (-20 °C).
2. Supernatantin tilavuus mitattiin ja siihen lisättiin tilavuudeltaan yhtä suuri määrä pH 11 -puskuria.
3. Liuoksen pH säädettiin 1 M:lla NaOH:lla tarkasti pH-arvoon 11. Ph:n mittaamiseen käytettiin Metrohm 744 pH Meter -laitetta.

Sitoutus resiiniin, resiinin pesu ja eluutio:

1. Liuos kaadettiin 50 ml:n Nunc-putkiin ja pH 11 -puskurilla tasapainotettu 2-iminobiotiini-agarosiresiini jaettiin pylväästä putkiin.
2. Resiinin sisältämiä liuoksia inkuboitin tunti kylmähuoneessa (4 °C) ”rolling shaker” -laitteessa (Stuart Roller Mixer SRT1).
3. Inkubaation jälkeen resiini sentrifugoitiin (Hettich Rotina 48R) putkien pohjille (5 min, 500 g). Supernatantista otettiin 300 µl:n näyte (L2) SDS-PAGE-analyysia varten, jonka jälkeen supernatantti pakastettiin (-20 °C). Putkien pohjalle jäänyt 2-iminobiotiini-agarosii pestiin pH 11-puskurilla täyttämällä Nunc-putket 50 ml:aan asti puskurilla ja kääntelemällä putkia pari kertaa. Putket sentrifugoitiin (5 min, 500 g) ja supernatantti poistettiin, jonka jälkeen pesu toistettiin.
4. Viimeisen pesun jälkeen supernatantti poistettiin ja 2-iminobiotiini-agarosii pipetoitiin Nunc-putkista pylvääseen.
5. Resiiniä pestiin pylväässä pH 11 -puskurilla (n. 20 ml).
6. Koetuotot eluotitiin pH 4 -puskurilla, mutta myöhemmin eluutio suoritettiin 0.1 M:lla etikkahapolla (ks. kappale 3.3, s. 44). Eluointi suoritettiin siten, että 1 ml etikkahappoa pipetoitiin pylvääseen ja annettiin sen kulkea pylvään läpi. Fraktioita kerättiin, kunnes absorbanssi (280 nm) laski lähelle nollaa. Yleensä fraktioita kerättiin 10 – 20 kappaletta. Jokaisesta fraktiosta otettiin 20 µl:n näytteet SDS-PAGE-analyysia varten.
7. Fraktioita säilytettiin aluksi pakastimessa (-20 °C), mutta myöhemmin jääkaapissa (4 °C) (ks. kappale 3.3, s. 44).

### 3.2.3 Proteiinkonsentraation määrittäminen ja SDS-PAGE-analyysi

Fraktioiden absorbanssit (280 nm) mitattiin spektrofotometrillä (GeneQuant) ja niiden proteiinkonsentraatiot määritettiin käyttäen rhizavidiinille laskettua molaarista absorbtiviteettia ( $\epsilon$ )  $29160 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  280 nm:ssa sekä laskettua molekyylipainoa (MW) 14446 Da.

Puhdistusprosessin aikana otetuista näytteistä ja eluutiofraktionäytteistä valmistettiin näytteet SDS-PAGE-analyysia varten lisäämällä niiden joukkoon kaksinkertaista

SDS-PAGE-puskuria näytetilavuuden verran. Näytteitä kuumennettiin lämpöblokissa (95 °C, 15 min) ja siirrettiin jälle odottamaan geeliin pipetointia.

SDS-PAGE analyysi tehtiin Bio-Rad mini-PROTEAN® Cell -laitteella. SDS-PAGE:ssa käytettiin 15 %:n erottelugeeliä ja 5 %:n konsentroitigeeliä. Yksi SDS-PAGE geeli valmistettiin seuraavasti:

Erottelugeeli (15 %):	Konsentroitigeeli (5 %):
1.1 ml H <sub>2</sub> O	0.68 ml H <sub>2</sub> O
2.5 ml akryyliamidiseos	0.17 ml akryyliamidiseos
1.3 ml 1,5 M Tris (pH 8.8)	0.13 ml Tris (pH 6.8)
0.05 ml 10 % SDS	0.01 ml 10 % SDS
0.05 ml 10 % ammoniumpersulfaatti	0.01 ml 10 % ammoniumpersulfaatti
0.002 ml TEMED	0.001 ml TEMED

Ensin valmistettiin erottelugeeli ja pipetoitiin se SDS-PAGE-lasien väliin. Erottelugeelin päälle pipetoitiin muutama tippa vettä ja geelin annettiin jähmettyä noin 20 minuuttia. Geelin jähmetyttyä valmistettiin ylägeeli, vesi imettiin varovasti erottelugeelin päältä imupaperia käyttäen ja ylägeeli pipetoitiin erottelugeelin päälle. SDS-PAGE-näytekampa asetettiin paikoilleen ja ylägeelin annettiin jähmettyä noin 20 minuuttia. Tämän jälkeen näytekampa poistettiin ja SDS-PAGE-laite koottiin käyttövalmiiksi. Ajopuskurina käytettiin 1 x PAGE-ajopuskuria.

Kaivoihin pipetoitiin 16 µl:aa näytteitä ja 5 µl:aa markkereita. Molekyylipainomarkkerina käytettiin PAGERuler®-markkeria (Fermentas). Lisäksi käytettiin 15 600 Da:n kokoista avidiinimarkkeria. Näytteitä ajettiin konsentroitigeelissä 120 V:n jännitteellä niin kauan, että ne ajautuivat erottelugeelin pintaan (n. 15 min). Jännitettä nostettiin 180 V:iin ja ajoa jatkettiin, kunnes PAGE-näytepuskuri saavutti geelin alapinnan (n. 45 min).

Ajon jälkeet geeli irrotettiin varovasti lasista ja värjättiin Coomassie Brilliant Blue -värjäyksellä keinoituksessa yön yli. Coomassien Brilliant Blue -väri poistettiin kaatamalla

geelin päälle värinpoisto ("destaining") -liuosta, jonka annettiin vaikuttaa keinutuksessa noin 4 tuntia.

### 3.3 RHIZAVIDIININ KONSENTRINTI JA PUSKURIN VAIHTO

Rhizavidiinin eluutiofraktioiden konsentrinti oli tarpeellista, sillä eräitä proteiinilla tehtäviä kokeita varten tarvittiin suurempia konsentraatioita, joita eluutiofraktioihin oli saatu. Puskurin vaihto oli tarpeen, sillä havaittiin, että rhizavidiini sakkaantui pakastuksen jälkeen etikkahapossa. Lisäksi etikkahappo häiritsi joitain kokeita antaen haitallista taustaa.

Puskurin vaihto suoritettiin dialyysillä. Eluutiofraktiot pipetoitiin valmiiseen dialyysiletkuun, jonka päät suljettiin sulkijoilla ja letku upotettiin puskurin. Ulkoliuoksen tilavuutena käytettiin satakertaista tilavuutta sisäliuoksen tilavuuteen nähden. Dialyysi suoritettiin kylmähuoneessa (4 °C) magneettisekoituksessa. Kahden tunnin dialysoinnin jälkeen vaihdettiin ulkoliuos uuteen ja dialysointia jatkettiin vielä yön yli.

Konsentrinti lyofilisoinnilla suoritettiin seuraavasti: Haluttu määrä dialysoitua rhizavidiiniliuosta pipetoitiin 2 ml:n Eppendorf-putkiin ja putkien suille asetettiin rei'itetty parafilmi ja folio. Liuokset jäädettiin pakastimessa (-70 °C), minkä jälkeen putket asetettiin lyofilisaattoriin (GWB Edwards Freeze Dryer Super Modulo) ja lyofilisoinnin annettiin jatkua yön yli. Lyofilisoidut näytteet liuotettiin sopivaan määrään puskuria tai vettä.

### 3.4 RHIZAVIDIININ OMINAISUUKSIEN MÄÄRITTÄMINEN

Kaikki kokeet tehtiin rhizavidiinin ydinmuodolla, koska kyseistä proteiinia saatiin tuotettua kokeisiin vaadittava määrä.

### 3.4.1 Koko ja rakenne

Rhizavidiinin kokoa ja esiintymistä di- ja tetrameerina analysoitiin geelifiltraatiolla High Performance Liquid Chromatography (HPLC) -metodilla. Kokeen suoritti FM Juha Määttä Jyväskylän Yliopiston bio- ja ympäristötieteiden laitoksella (Liite A).

### 3.4.2 Alayksiköiden välisten rikkisiltojen havaitseminen

Proteiiniin voi muodostua rakennetta vahvistavia alayksikön sisäisiä tai välisiä rikkisiltoja kysteiinitähteiden välille. Jotta rhizavidiinimonomeerien välille olisi teoriassa mahdollista muodostua rikkisiltoja, sen aminohapposekvenssin tulisi sisältää vähintään yksi kysteiinitähde.

SDS-PAGE-näytepuskuri sisältää mahdolliset alayksiköiden väliset rikkisillat pelkistävää  $\beta$ -merkaptotetanolia. Jotta alayksiköiden väliset rikkisillat voidaan havaita, ajetaan SDS-PAGE näytepuskurissa, joka ei sisällä  $\beta$ -merkaptotetanolia. Jos alayksiköiden välillä sijaitsee rikkisiltoja, proteiini ajautuu kokeessa SDS-PAGE:ssa isompana kompleksina, koska rikkisillat pitävät alayksiköt yhdessä.

Koe suoritettiin seuraavasti. SDS-PAGE:ssa käytettiin 15 %:n ajogeeliä ja 5 %:n konsentrintigeeliä. Geeli valmistettiin kuten edellä (kappale 3.2.3, s. 42) Näytteinä käytettiin rhizavidiinieluutiiofraktioita, joiden konsentraatiot olivat 0.3 – 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Näytteet SDS-PAGE analyysiin valmistettiin lisäämällä 20  $\mu\text{l}$ :aan eluutiiofraktiota 20  $\mu\text{l}$ :aa SDS-PAGE-näytepuskuria, joka ei sisältänyt  $\beta$ -merkaptotetanolia. Näytteet kuumennettiin lämpöblokkissa (95 °C, 15 min) ja siirrettiin jäälle ennen geeliin pipetointia. Molekyylipainomarkkereina käytettiin Pageruler<sup>®</sup>- (Fermentas) ja avidiinimarkkeria. Näytteet pipetoitiin SDS-PAGE-geeliin siten, että markkerikaivojen ja näytekaivojen väliin jätettiin kolme tyhjää kaivoa. Markkerit sisältävät  $\beta$ -merkaptotetanolia, joten haluttiin varmistaa, ettei  $\beta$ -merkaptotetanoli pääse leviämään näytekaivoihin. SDS-PAGE-ajo ja Coomassien Brilliant Blue -värjäys suoritettiin kuten edellä (kappale 3.2.3, s. 42).

### 3.4.3 Rhizavidiinin lämmönkestävyyden määrittäminen

Rhizavidiinin lämmönkestävyyttä määritettiin Enzyme-linked Immunosorbent Analysis (ELISA) ja Differential Scanning Calorimetry (DSC) -metodeilla. DSC-kokeen suoritti FM Katrin Halling Åbo Akademin biokemian ja farmasian laitoksella (Liite B).

#### Lämpöstabiilisuuskoe ELISA:lla

Rhizavidiinia ja avidiinia laimennettiin pitoisuuteen 5 µg/ml Na-fosfaattipuskurilla (50 mM, Ph 7,0), joka sisälsi 100 mM NaCl:a. Proteiiniliuokset pipetoitiin 0,5 ml:n Eppendorf-putkiin ja niitä lämmitettiin PCR-laitteessa 80, 90 ja 100 °C:ssa ja siirrettiin jäälle eri aikapisteissä (1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30 min). Tehtiin kaksi rinnakkaista sarjaa. Nollanäytteitä ei kuumennettu vaan niiden annettiin olla jäällä kuumennuksen ajan.

Näytteitä pipetoitiin 50 µl:aa Maxisorp<sup>®</sup>96-kuoppalevyille ja levyä inkuboitiin lämpökaapissa (37 °C) 1,5 tuntia. Negatiivisena kontrollinäytteenä käytettiin PBS-tweeniä. Inkubaation jälkeen kuoppia pestiin 300 µl:lla PBS-tweeniä (3 x 1 min). Pesujen jälkeen kuoppiin pipetoitiin 300 µl:aa BSA:ta (1 % v/w) sisältävää PBS-puskuria (blokkauksliuos) ja levyä inkuboitiin tunti lämpökaapissa (37 °C). Kuopat pestiin inkuboinnin jälkeen 300 µl:lla PBS-tweeniä (3 x 1 min). Kuoppiin pipetoitiin PBS-tweenillä 1:2000 laimennettua biotinyloitua alkaalista fosfataasia (AP) ja inkuboitiin lämpökaapissa (37 °C) yksi tunti. Kuopat pestiin 300 µl:lla PBS-tweeniä (3 x 1 min).

Substraattina alkaaliselle fosfataasille käytettiin para-nitrofenyyli fosfaattia (PNPP). PNPP-liuos (1 mg/ml) valmistettiin liuottamalla yksi 5 mg:n PNPP-tabletti (Sigma#104-105) 5 ml:aan DEA-puskuria (0,5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9,8) foliolla suojatussa putkessa huoneenlämmössä enintään kaksi tuntia ennen käyttöä. Substraattiliuosta pipetoitiin monikanavapipetillä nopeasti kuoppiin (50 µl / kuoppa) ja absorbanssi (405 nm) mitattiin ELISA-laitteella (Labsystems Multiscan<sup>®</sup> Plus) minuutin välein. Näytekaivojen antamista absorbansseista (keskiarvo rinnakkaisista näytteistä) vähennettiin kontrollikaivojen antama absorbanssi (keskiarvo rinnakkaisista näytteistä). Nämä absorbanssiarvot sijoitettiin kaavioon keittoajan funktiona ja pisteiden kautta vedettiin viiva, jonka leikkauspiste y-

akselin kanssa määrittä sitä arvoa, jossa proteiinilla on 100 %:n aktiivisuus. Tämän arvon avulla laskettiin aktiivisuus (%) myös aikapisteille 1, 3, 15 ja 30 min. Kaaviot piirrettiin Excel-ohjelmalla.

#### 3.4.4 Biotiinin sitominen

Rhizavidiinin kykyä sitoa biotiinia määritettiin Isothermal Titration Calorimetry (ITC) -metodilla. Kokeen suoritti FM Satu Helppolainen Tampereen Yliopiston Lääketieteellisen teknologian instituutissa (IMT) (Liite C). Rhizavidiinin dissosiaatiokerroin ( $K_{diss}$ ) biotiinille määritettiin radiobiotiinimäärityskokeella. Kokeen suoritti Juha Määttä Tampereen Yliopiston Lääketieteellisen teknologian instituutissa (IMT) (Liite D).

#### 3.4.5 Ristiinreagointikokeet

Ristiinreagointikokeilla haluttiin määrittää, tunnistaako avidiinia ja streptavidiinia vastaan hiissä tuotetut vasta-aineet rhizavidiinin.

#### Immunoblottaus

Rhizavidiininäytteet (n. 1mg/ml) ajettiin SDS-PAGE:lla kuten edellä (kappale 3.2.3, s. 42). SDS-PAGE ajon jälkeen proteiinit siirrettiin nitroselluloosakalvolle Bio-Rad Mini Trans-Blot® -laitteella valmistajan ohjeen mukaan. Siirrossa käytettiin 100 V:n jännitettä ja sirtoaika oli 60 minuuttia. Nitroselluloosakalvo värjättiin Ponceau S -värjäyksellä kaatamalla Ponceau S -väriä (0,2 % Ponceau S, 3 % TCA) nitroselluloosakalvon päälle ja sen annettiin vaikuttaa 5 minuuttia keinutuksessa. Tämän jälkeen ylimääräinen väri pestiin kalvolta pois tislattulla vedellä. Nitroselluloosakalvo siirrettiin blokkauksliuokseen (5 % w/v maitojauhe TBS:ssä) ja blokkauks suoritettiin keinutuksessa kylmähuoneessa (4 °C) yön yli.

Kalvo pestiin noin 10 ml:lla TBS-tweeniä (3 x 3 min). Primääri (1°) vasta-aine (polyklonaalinen hiissä tuotettu anti-avidini ja polyklonaalinen anti-streptavidiini) laimennettiin 1:5000 5 %:a maitojauhetta sisältävällä TBS-tweenillä ja liuos kaadettiin

nitroselluloosakalvolle. Kalvoa inkuboitiin tunnin ajan keinutuksessa huoneenlämmössä, minkä jälkeen kalvoa pestiin TBS-tweenillä (3 x 3 min). Sekundääri (2<sup>o</sup>) vasta-aine GAR-AP (Goat Anti-Mouse-alkaline-Phosphatase) laimennettiin 1:2000 5 %:a maitojauhetta sisältävällä TBS-tweenillä ja liuos kaadettiin kalvon päälle. Kalvoa inkuboitiin tunnin ajan keinutuksessa huoneenlämmössä. Inkuboinnin jälkeen kalvoa pestiin TBS-tweenillä (3 x 3 min). Pesujen jälkeen kalvo siirrettiin APA-puskuriin viideksi minuutiksi tasapainottumaan. Proteiinien detektointi perustui sekundääriseen vasta-aineeseen linkitetyn alkaalisen fosfataasin kykyyn katalysoida alkaalisessa liuoksessa para-nitrofenyylifosfaatin (PNPP) hydrolyysia. Reaktiossa muodostuu värillistä tuotetta, jonka intensiteetti on suoraan verrannollinen alkaalisen fosfataasin aktiivisuuteen (määrään) kalvolla. (Blake ym., 1984). Värjäysliuos valmistettiin foliolla suojattuun putkeen lisäämällä 6 ml:aan APA-puskuria 60 µl:aa Nitro Blue Tetrazolium (NBT) -liuosta ja 60 µl:aa "5-Bromo-4-chloro-3-indolyl Phosphate" (BCIP) -liuosta. Väriä annettiin muodostua kalvolla n. 10 minuutin ajan, minkä jälkeen reaktio pysäytettiin tislattulla vedellä.

#### Ristiinreagoitikoel ja ELISA-levyn proteiinin sitomistehokkuuskoe

Avidiinin ja streptavidiinin vasta-aineiden kykyä tunnistaa rhizavidiiniä tutkittiin myös käyttäen ELISA-menetelmää. Lämpöstabiilisuuskoe suoritettiin Nunc Immobilizer Amino<sup>®</sup>-levyllä. Ennen ELISA-kokeita levyn proteiinin sitomistehokkuus testattiin seuraavasti:

Rhizavidiinia, avidiinia ja streptavidiniä laimennettiin Na-fosfaatti-puskurilla (100 mM, pH 7) pitoisuuteen 10 µg/ml. Kutakin proteiiniliuosta pipetoitiin 50 µl:aa kolmeen rinnakkaiseen testikuoppaan sekä kahteen rinnakkaiseen kontrollikuoppaan Nunc Immobilizer Amino<sup>®</sup>-levylle. Levyä inkuboitiin kaksi tuntia lämpökaapissa (37 °C). Inkuboinnin jälkeen kuopista imettiin haravapipetillä proteiiniliuokset pois ja kuoppia pestiin 300 µl:lla PBS-tweeniä (2 x 1 min + 1 x 15 min). Pesujen jälkeen testikuoppiin pipetoitiin 50 µl:aa PBS-tweenillä 1:2000 laimennettua biotinyloitua-AP:tä. Kontrollikuoppiin ei lisätty biotinyloitua-AP:tä, vaan inkuboinnin ajaksi kuoppiin lisättiin 50 µl:aa PBS-tweeniä. Levyä inkuboitiin tunti lämpökaapissa (37 °C). Inkuboinnin jälkeen kuopat pestiin PBS-tweenillä (2 x 100 µl + 2 x 200 µl + 2 x 300 µl). Kuoppiin pipetoitiin



50 µl:aa PNPP-DEA-liuosta (1mg/ml) ja absorbanssi (405 nm) mitattiin ELISA-laitteella (Labsystems Multiscan® Plus) minuutin välein. Näytekaivojen antamista absorbansseista (keskiarvo rinnakkaisista näytteistä) vähennettiin kontrollikaivojen antama absorbanssi (keskiarvo rinnakkaisista näytteistä). Tulokset piirrettiin pylväsdiagrammiksi Excel-ohjelmalla.

Ristiinreagointikoe suoritettiin seuraavasti. Rhizavidiini, avidiini ja streptavidiini laimennettiin Na-fosfaatti-puskurilla (100 mM, pH 7) pitoisuuteen 10 µg/ml. Rhizavidiiniliuosta pipetoitiin 50 µl:aa kuuteen testikuoppaan sekä kahteen kontrollikuoppaan Nunc Immobilizer Amino®-levylle. Avidiini- ja streptavidiiniliuosta pipetoitiin kumpaakin 50 µl:aa kolmeen rinnakkaiseen testikuoppaan sekä kahteen kontrollikuoppaan. Levyä inkuboitiin kaksi tuntia lämpökaapissa (37 °C). Inkuboinnin jälkeen kuopista imettiin haravapipetillä proteiiniliuokset pois ja pestiin 300 µl:lla PBS-tweeniä (2 x 1 min + 1 x 15 min). 1° vasta-aine avidiinille (polyklonaalinen Rabbit anti-avidini) laimennettiin 1:2000 PBS-tweenillä ja 50µl:aa vasta-aineliuosta pipetoitiin avidiinilla koutattuihin testikuoppiin sekä kolmeen rhizavidiinilla päällystettyyn testikuoppaan. 1° vasta-aine streptavidiinille (Rabbit anti-streptavidin antiserum) laimennettiin 1:2000 PBS-tweenillä ja 50 µl:aa vasta-aineliuosta pipetoitiin streptavidiinilla päällystettyihin testikuoppiin sekä kolmeen rhizavidiinilla päällystettyyn testikuoppaan. Kontrollikuoppiin ei lisätty 1° vasta-ainetta vaan inkubaation ajaksi kuoppiin pipetoitiin 50 µl:aa PBS-tweeniä. Levyä inkuboitiin tunti lämpökaapissa (37 °C). Inkubaation jälkeen kuopat pestiin 300µl:lla PBS:tweeniä (3 x 1min). Alkaalisen fosfataasin sisältämä 2° vasta-aine (vuohessa tuotettu Anti-Rabbit IgG-alkaline phosphatase) laimennettiin 1:2000 PBS-tweenillä ja vasta-aineliuosta pipetoitiin kaikkiin kuoppiin 50 µl:aa. Levyä inkuboitiin lämpökaapissa (37 °C) tunti, jonka jälkeen kuopat pestiin PBS-tweenillä (2 x 100 µl + 2 x 200 µl + 2 x 300 µl). Kuoppiin pipetoitiin 50 µl:aa PNPP-DEA-liuosta (1 mg/ml) ja absorbanssi (405 nm) mitattiin ELISA-lukulaitteella (Labsystems Multiscan® Plus) minuutin välein. Näytekaivojen antamista absorbansseista (keskiarvo rinnakkaisista näytteistä) vähennettiin kontrollikaivojen antama absorbanssi (keskiarvo rinnakkaisista näytteistä). Tuloksia analysoitiin pylväsdiagrammilla Excel-ohjelmalla.

### 3.4.6 Seerumianalyysi

Rhizavidiinin immunologisia ominaisuuksia tutkittiin edelleen avidiinille ja streptavidiinille altistettujen syöpäpotilaiden seeruminäytteiden avulla. Italialainen professori Giovanni Paganellin tutkimusryhmä tarjosi kokeeseen positiiviset seeruminäytteet sekä negatiiviset kontrolliseerumit potilailta, jotka eivät olleet altistuneet (strept)avidiinille.

Streptavidiini, avidiini ja rhizavidiini laimennettiin Na-fosfaatti-puskurilla (100 mM, pH 7,0) pitoisuuteen 10 µg/ml. Kutakin proteiinilaimennosta pipetoitiin 50 µl:aa 16:een testikuoppaan (kaksi rinnakkaista kahdeksan kuopan sarjaa) ja kahteen rinnakkaiseen kontrollikuoppaan. Levyä inkuboitiin lämpökaapissa (37 °C) yksi tunti. Inkuboinnin jälkeen kuopat pestiin 300 µl:lla PBS-tweeniä (2 x 3 min + 1 x 15 min). Seerumit (viisi positiivista ja kolme negatiivista) laimennettiin 1:100 PBS-tweenillä ja pipetoitiin testikuoppiin (50 µl:aa / kuoppa) niin, että kutakin seerumilaimennosta tuli kahteen rinnakkaiseen testikuoppaan / proteiini. Kontrollikuoppiin ei pipetoitu seerumilaimennosta vaan 50 µl:aa PBS-tweeniä. Levyä inkuboitiin lämpökaapissa (37 °C) yksi tunti, jonka jälkeen kuopat pestiin 300 µl:lla PBS-tweeniä (3 x 3 min). Alkaalisen fosfataasin sisältämä 2<sup>o</sup> vasta-aine (Anti-human polyvalent-AP) laimennettiin 1:6000 PBS-tweenillä ja laimennosta pipetoitiin (50 µl / kuoppa) kaikkiin kuoppiin. Levyä inkuboitiin lämpökaapissa (37 °C) tunti, jonka jälkeen kuopat pestiin PBS-tweenillä (2 x 100 µl + 2 x 200 µl + 2 x 300 µl). Kuoppiin pipetoitiin 50 µl:aa PNPP-DEA-liuosta (1mg/ml) ja absorbanssi (405 nm) mitattiin ELISA-laitteella minuutin välein. Näytekaivojen antamista absorbansseista (keskiarvo rinnakkaisista näytteistä) vähennettiin kontrollikaivojen antama absorbanssi (keskiarvo rinnakkaisista näytteistä). Tulokset analysoitiin pylväsdiagrammilla Excel-ohjelmalla.

### 3.5 PROTEIINIENAMINOHAPPOSEKVENSSIEN VERTAILU JA EPITOOPPIANALYYSI

Proteiinien aminohapposekvenssien vertailu tehtiin EMBOSS (European Molecular Biology open Software Suite) -ohjelmistopakettin ClustalW-ohjelmalla. Fylogeneettinen puu proteiinien geenisekvensseistä muodostettiin MEGA v. 3.1 -ohjelmistopakettilla.

## 4 TULOKSET

### 4.1 RHIZAVIDIGEENIN DNA:N KÄSITTELY

#### 4.1.1 Polymeerasiketjureaktiot ja monistettujen DNA-fragmenttien eristäminen agarosigeelistä

Polymeerasiketjureaktioissa tarkoituksena oli monistaa rhizavidiinigeenin villityypin muotoa (540 bp) sekä ydinmuotoa (468 bp). Jotta pystyttiin arvioimaan PCR:n onnistumista, PCR-tuotteet ajettiin agarosigeelissä (kuva 4,1).



Kuva 4,1: PCR:n onnistumisen tarkistusgeeli. Kummastakin muodosta on kaksi rinnakkaista näytettä. Markkerina 100:n emäsparin DNA-kokostandardi (Biolabs).

Agarosigeelitarkistuksen jälkeen oikean kokoiset bandit leikattiin ja erotettiin geelistä.

#### 4.1.2. Tuottovektoriin kloonattujen DNA-inserttien varmistussekvensoinnit

Insertin (rhizavidiinigeenin) sisältämät pET101/D-TOPO<sup>®</sup>-vektorit sekvensoitiin ja sekvensointituloksia verrattiin rhizavidiinin nukleotidisekvenssiin (ks. alh. keskimäinen rivi), jotta oikeat kloonit voitaisiin havaita. Sekvensointitulokset olivat seuraavat:

Rhizavidiinin villin tyypin muoto:

Rhiz_wt1_forw	.....TCCCCTCTCNNAATAATTTTGTTTA	25
RhizAvd	atgattattacgagtTtataTgcaacctTcggTacGaTcg	40
Consensus	t t t t g t	

Rhiz_wt1_forw	ACTTTAAGAAGGNCTTCAGGGAGCCCTTACCATGATCCG	65
RhizAvd	cCgacggtcgGcgCacatcaGgaggaaaaACCATGATCCG	80
Consensus	c g c g accatgatccg	
Rhiz_wt1_forw	TAACTAATGCAGTTGCAGCACTTGTGTTTGCTGTAGCAAC	105
RhizAvd	T.ACTAATGCAGTTGCAGCACTTGTGTTTGCTGTAGCAAC	119
Consensus	t actaatgcagttgcagcacttgtgtttgctgtagcaac	
Rhiz_wt1_forw	CTCAGCTCTTGCTTTTCGATGCAAGCAACTTCAAGGATTTT	145
RhizAvd	CTCAGCTCTTGCTTTTCGATGCAAGCAACTTCAAGGATTTT	159
Consensus	ctcagctcttgcttttcgatgcaagcaacttcaaggatTTT	
Rhiz_wt1_forw	TCAAGCATCGCATCGGCTTCCAGCAGTTGGCAGAACCAGT	185
RhizAvd	TCAAGCATCGCATCGGCTTCCAGCAGTTGGCAGAACCAGT	199
Consensus	tcaagcatcgcatcggcttccagcagttggcagaaccagt	
Rhiz_wt1_forw	CCGGCTCGACGATGATCATTCAAGTCGACTCGTTCGGAAA	225
RhizAvd	CCGGCTCGACGATGATCATTCAAGTCGACTCGTTCGGAAA	239
Consensus	ccggctcgacgatgatcattcaagtcgactcgTTCGGAAA	
Rhiz_wt1_forw	TGTCTCCGGCCAATATGTAAACAGAGCCCAGGGCACCGBA	265
RhizAvd	TGTCTCCGGCCAATATGTAAACAGAGCCCAGGGCACCGBA	279
Consensus	tgtctccggccaatatgtaaacagagcccagggcaccgga	
Rhiz_wt1_forw	TGCCAGAACTCGCCCTATCCGCTAACAGGAAGGGTAAACG	305
RhizAvd	TGCCAGAACTCGCCCTATCCGCTAACAGGAAGGGTAAACG	319
Consensus	tgccagaactcgccctatccgctaacaggaagggtaaacg	
Rhiz_wt1_forw	GGACGTTTCATCGCATTTCGGTCGGCTGGAACAATTCGAA	345
RhizAvd	GGACGTTTCATCGCATTTCGGTCGGCTGGAACAATTCG.A	358
Consensus	ggacgttcatcgcatTTTCGGTCGGCTGGAACAATTCG a	
Rhiz_wt1_forw	CGGAGAACTGCAATTCCGCAACCGGATGGACCGGCTACGC	385
RhizAvd	CGGAGAACTGCAATTCCGCAACCGGATGGACCGGCTACGC	398
Consensus	cggagaactgcaattccgcaaccggatggaccggctacgc	
Rhiz_wt1_forw	ACAGGTCAACGGCAACAACACTGGAANATAGTTCACGAGCT	425
RhizAvd	ACAGGTCAACGGCAACAACACTGAgatag.TCACGAGCT	436
Consensus	acaggtcaacggcaacaactga tcacgagct	
Rhiz_wt1_forw	GGAACCTCGCTTACGAAGGCGGCTCNGGTCCGGCCATTGA	465
RhizAvd	GGAACCTCGCTTACGAAGGCGGCTCcgGTCCGGCCATTGA	476
Consensus	ggaacctcgcttacgaaggcggctc ggtccggccattga	
Rhiz_wt1_forw	GCAAGGACAAGAACTT.....	481
RhizAvd	GCAAGGACAAGAcacTttccagtagctgccgacgactgag	516
Consensus	gcaaggacaaga t	
Rhiz_wt1_forw	.....	481
RhizAvd	aacaaaagcctcttgaaggattaa	540

Rhizavidiinin villityypin muodosta saatiin sekvensointitulokset vain yhteen suuntaan (forw) sekvensoituna. Inserttiseen alku ei näytä kovin hyvin vastaavan rhizavidiiniseen nukleotidisekvenssiä ja geenin loppua ei saatu sekvensoitua.

Rhizavidiinin ydinmuoto:

RhizAvd	..ACCATGATCCGTTACTAATGCAGTTGCAGCACTTGTGTT	38
Rhiz_cl_forw	tCACCATGATCCGTTACTAATGCAGTTGCAGCACTTGTGTT	40
Reverse_Complement_	.....	0
Consensus		

RhizAvd	TGCTGTAGCAACCTCAGCTCTTGCTTTTCGATGCAAGCAAC	78
Rhiz_cl_forw	TGCTGTAGCAACCTCAGCTCTTGCTTTTCGATGCAAGCAAC	80
Reverse_Complement_	.....AagcAn	6
Consensus	a a	
RhizAvd	TTCAAGGATTTTTCAAGCATCGCATCGGC.TTCCAGCAGT	117
Rhiz_cl_forw	TTCAAGGATTTTTCAAGCATCGCATCGGC.TTCCAGCAGT	119
Reverse_Complement_	TTCAAGGATTTTTCAAGcTnGCATCGGcTnCCAGCAGT	46
Consensus	ttcaaggatTTTTcaagc t gcatcggc t ccagcagt	
RhizAvd	TGGCAGAACCAGT.CCGGCTCGACGATGATCATTCAAGTC	156
Rhiz_cl_forw	TGGCAGAACCAGT.CCGGCTCGACGATGATCATTCAAGTC	158
Reverse_Complement_	TGGCAGAACCAGTcCCGGCTCGACGATGATCATTCAAGTC	86
Consensus	tggcagaaccagt cgggctcgacgatgatcattcaagtc	
RhizAvd	GACTCGTTCGGAAATGTCTCC.GGCCAATATGTAAACAGA	195
Rhiz_cl_forw	GACTCGTTCGGAAATGTCTCC.GGCCAATATGTAAACAGA	197
Reverse_Complement_	GACTCGTTCGGAAATGTCTCCgGGCCAATATGTAAACAGA	126
Consensus	gactcgttcggaaatgtctcc ggccaatatgtaaacaga	
RhizAvd	GCCCAGGGCACC GGATGCCAGAACTCGCCCTATCCGCTAA	235
Rhiz_cl_forw	GCCCAGGGCACC GGATGCCAGAACTCGCCCTATCCGCTAA	237
Reverse_Complement_	GCCCAGGGCACC GGATGCCAGAACTCGCCCTATCCGCTAA	166
Consensus	gcccagggcaccggatgccagaactcgccctatccgctaa	
RhizAvd	CAGGAAGGGTAAACGGGACGTTTCATCGCATTTTTCGGTCGG	275
Rhiz_cl_forw	CAGGAAGGGTAAACGGGACGTTTCATCGCATTTTTCGGTCGG	277
Reverse_Complement_	CAGGAAGGGTAAACGGGACGTTTCATCGCATTTTTCGGTCGG	206
Consensus	caggaagggtaaacgggacgttcatcgcattttcggtcgg	
RhizAvd	CTGGAACAATTCGACGGAGAAGTCAATTCCGCAACC GGA	315
Rhiz_cl_forw	CTGGAACAATTCGACGGAGAAGTCAATTCCGCAACC GGA	317
Reverse_Complement_	CTGGAACAATTCGACGGAGAAGTCAATTCCGCAACC GGA	246
Consensus	ctggaacaattcgacggagaactgcaattccgcaaccgga	
RhizAvd	TGGACCGGCTACGCACAGGTCAACGGCAACAACACTGAGA	355
Rhiz_cl_forw	TGGACCGGCTACGCACAGGTCAACGGCAACAACACTGAnA	357
Reverse_Complement_	TGGACCGGCTACGCACAGGTCAACGGCAACAACACTGAGA	286
Consensus	tggaccggctacgcacaggtcaacggcaacaacactga a	
RhizAvd	TAGTCACGAGCTGGAACCTCGCTTACGAAGGCGGCTCCGG	395
Rhiz_cl_forw	TAGTCACGAGCTGGAACCTCGCTTACGAAnGCGGCTCCGG	397
Reverse_Complement_	TAGTCACGAGCTGGAACCTCGCTTACGAAGGCGGCTCCGG	326
Consensus	tagtcacgagctggaacctcgcttacgaa gcggctccgg	
RhizAvd	TCCGGCCATTGAGCAAGGACAAGACACTTTCCAGTACGTG	435
Rhiz_cl_forw	TCCGGCCATTGAGCAgGGAnAAGACACTTTtCnGTACGTG	437
Reverse_Complement_	TCCGGCCATTGAGCAAGGACAAGACACTTTCCAGTACGTG	366
Consensus	tccggccattgagca gga aagacacttt c gtacgtg	
RhizAvd	CCGACGACTGAGAACAAAAGCCTCTTGAAGGATTAA	471
Rhiz_cl_forw	CCGACnAaTGAAaA.....	451
Reverse_Complement_	CCGACGACTGAGAACAAAAGCCTCTTGAAGGATTAA	402
Consensus	ccgac a tga aa	

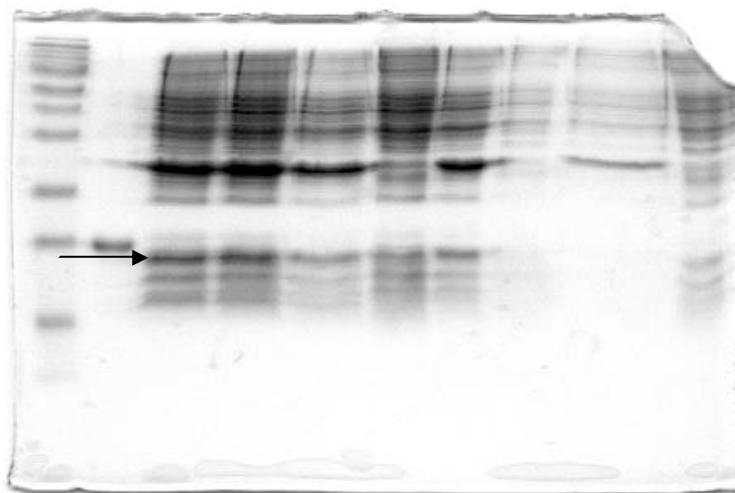
Ydinmuotoinsertti saatiin sekvensoitua kumpaankin suuntaan lähes kokonaan ja sen nukleotidijärjestys osoittautui oikeaksi.

## 4.2 RHIZAVIDIININ TUOTTAMINEN JA PUHDISTUS

Rhizavidiinin villin tyypin muotoa ja ydinmuotoa tuotettiin bakteerisolusysteemillä ja tuotetut proteiinit puhdistettiin affiniteetikromatografialla. Aluksi proteiinit tuotettiin 0,5 litran tilavuudessa. Tuotot eluoiitiin pH 4 -puskurilla. Ydinmuodon eluutiofraktioiden proteiinikonsentraatiot olivat 0,03 – 0,07 mg/ml välillä ja yhteensä puhdistettua proteiinia saatiin noin 0,5 mg. Villityypin eluutiofraktioihin saatiin proteiinia yhteensä vain n. 0,01 mg.

Konsentraatioiden perusteella ydinmuoto oli tuottunut jonkin verran, mutta villin tyypin muoto ei tuottunut lähes ollenkaan. Proteiinipuhdistuksen aikana otetut näytteet ja eluutiofraktionäytteet ajettiin vielä varmuuden vuoksi SDS-PAGE:lla. Spesifistä vasta-aineisiin perustuvaa immunoblottausta ei pystytty tekemään, koska rhizavidiinille ei ole tuotettu vasta-aineita. SDS-PAGE-kuvissa (kuva 4,2, 4,3, ja 4,4) näkyvän n. 14,5 kDa kokoisen proteiinibandin oletettiin koon perusteella olevan rhizavidiinia.

Stand. Avd T (y) T (wt) L1 (y) L1(wt) S (y) S (wt) L2(y) L2 (wt)

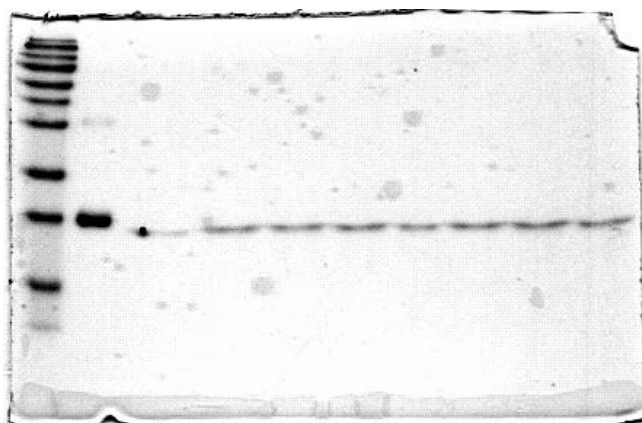


Kuva 4,2: Puhdistusvaiheista otetut näytteet. T tarkoittaa solujen hajotuksen jälkeen otettua näytettä, L1 sentrifugaamisen jälkeen suodatetusta supernatantista otettua näytettä, S sentrifugaamisen aikana muodostuneesta sakasta otettua näytettä ja L2 resiiniin sidotuksen jälkeen liuoksesta otettua näytettä. Suluisissa puhdistusnäytteen jälkeen lukee, onko näyte otettu villityypin (wt) puhdistuksesta vai ydinmuodon (y) puhdistuksesta. Nuoli kuvassa osoittaa rhizavidiinibandeja (MW ~ 14 500 kDa).

Kuvasta 4,2 voidaan havaita, että T-näytteissä on eniten rhizavidiinia. Ydinmuodon S-näyte osoittaa, että osa rhizavidiinista jäi vielä sentrifugaamisen jälkeen solupellettiin. Voidaan todeta, että kaikki pylvääseen laitettu proteiini on hyvin todennäköisesti

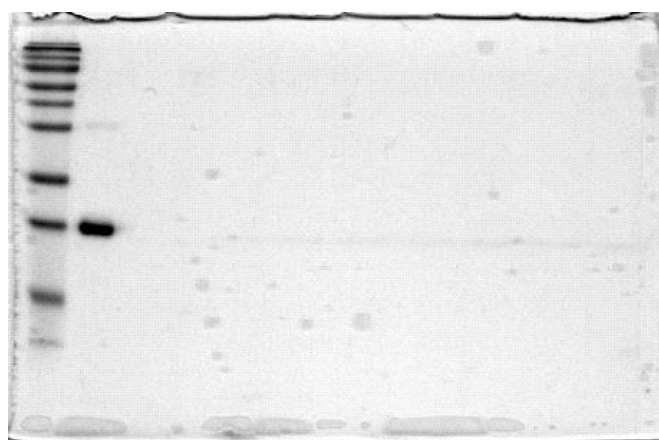
sitoutunut resiiniin, koska resiiniin sidotuksen jälkeen otetussa näytteessä (L2) ei enää rhizavidiinia esiinny. Kuva 4,3 osoittaa, että rhizavidiinin ydinmuodon kokoista proteiinia on tuottunut ja se on pystytty puhdistamaan. Kuva 4,4 osoittaa, että eluutiofraktiot sisältävät vain hyvin pienen määrän villityypin rhizavidiinia.

Stand. Avd F1 F2 F3 F4 F5 F6 F7 F8



Kuva 4,3: Rhizavidiinin ydinmuodon 2-iminobiotiini-puhdistuksen eluutiofraktioista otetut näytteet.

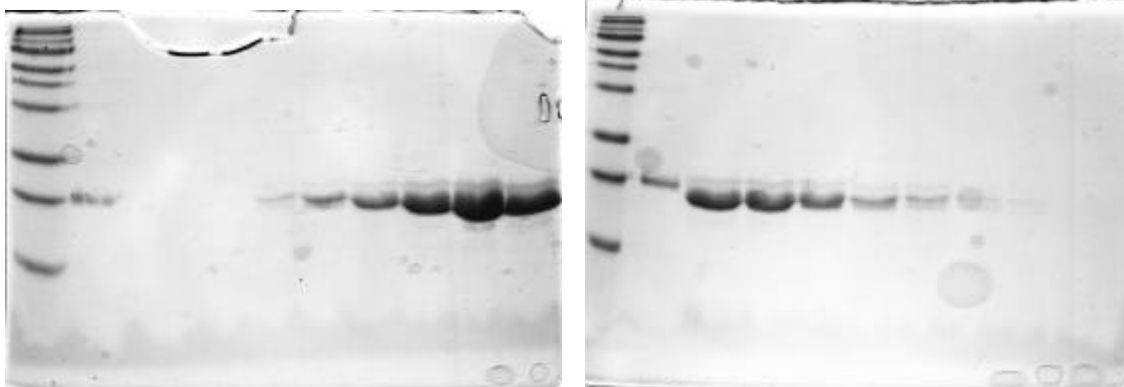
Stand. Avd F1 F2 F3 F4 F5 F6 F7 F8



Kuva 4,4: Rhizavidiinin villityypin muodon 2-iminobiotiini-puhdistuksen eluutiofraktioista otetut näytteet.

0,5 litran proteiinin tuottojen jälkeen päätettiin kokeita jatkaa rhizavidiinin ydinmuodolla. Kokeita varten sitä tuotettiin 2.5-litran tuottotilavuudessa. Eluointivaiheessa havaittiin, ettei proteiini enää irronnut pylvästä pH 4-puskurilla. Tämän vuoksi pylvästä koitettiin eluoida 0,1 M etikkahapolla. Etikkahappoeluution jälkeen saatujen fraktioiden proteiinipitoisuudet olivat 0,1 – 2,7 mg/ml. Yhteensä rhizavidiinia saatiin puhdistettua 13,7 mg. Näytteet fraktioista ajettiin SDS-PAGE:lla.

Stand. Avd F1 F2 F3 F4 F5 F6 F7 F8 F9      Stand. Avd F10 F11 F12 F13 F14 F15 F16 F17



Kuva 4,5: Rhizavidiinin ydinmuodon 2,5 l:n tuotto. 0,1 M etikkahapolla eluoidut fraktiot 1-9.

Kuva 4,6: Rhizavidiinin ydinmuodon 2,5 l:n tuotto. 0,1 M etikkahapolla eluoidut fraktiot 10-17.

Kuvista 4,5 ja 4,6 havaitaan, että 0,1 M etikkahappo irroitti rhizavidiinia pylvästä suurina pitoisuuksina. Suurimmat proteiinipitoisuudet SDS-PAGE-kuvien perusteella saatiin fraktioihin 7-9. Koska rhizavidiini irtosi resiinistä 0,1 M:lla etikkahapolla huomattavasti paremmin kuin pH 4-puskurilla, käytettiin sitä vastaisuudessaakin rhizavidiinin eluointiin.

### 4.3 RHIZAVIDIININ OMINAISUUKSIEN MÄÄRITTÄMINEN

#### 4.3.1 Alayksiköiden välisten rikkisiltojen havaitseminen

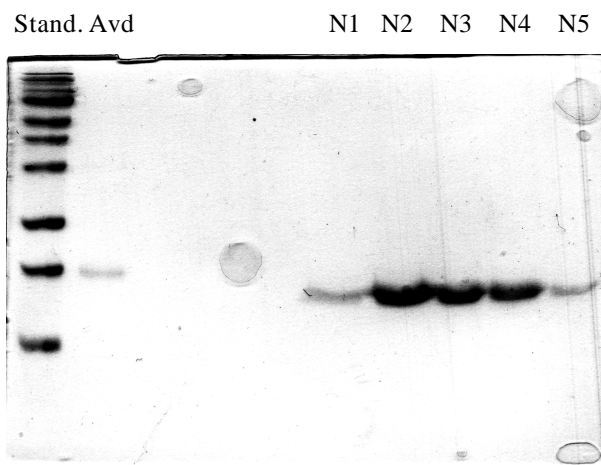
Rhizavidiinin aminohapposekvenssistä voidaan havaita, että se sisältää kaksi mahdollisen rikkisillan muodostumiseen vaadittavaa kysteiinitähdettä (C).

Rhizavidiinin aminohapposekvenssi, jossa kysteiinitähteet on alleviivattu:

MIITSLYATFGTIADGRRRTSGGKTMIRTNVAALVFAVATSALAFDASNFKDFSSIA  
 SASSSWQNQSGSTMIIQVDSFGNVSGQYVNRAQGTGCQNSPYPLTGRVNGTFIAFS  
 VGWNNSTENCNSATGWTGYAQVNGNNTTEIVTSWNLAYEGGSGPAIEQGQDQTFQ  
 YVPTTENKSLKLD\*

Kuvasta 4,1 voidaan havaita, että rhizavidiini kulki geelissä monomeerina, eikä esiintynyt useamman alayksikön kompleksina. Rhizavidiini ei tulosten perusteella sisällä alayksiköiden välisiä rikkisiltoja.



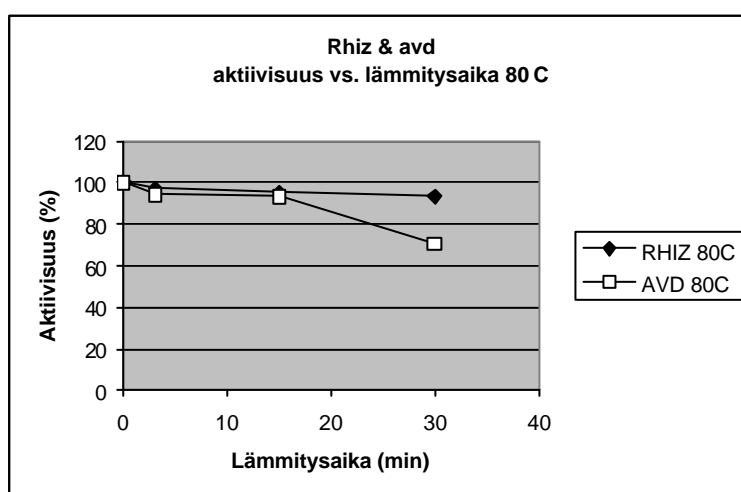


Kuva 4,7: SDS-PAGE ilman  $\beta$ -merkaptotoetanolia. Näytteet N1-N5 ovat rhizavidiininäytteitä eri pitoisuuksina.

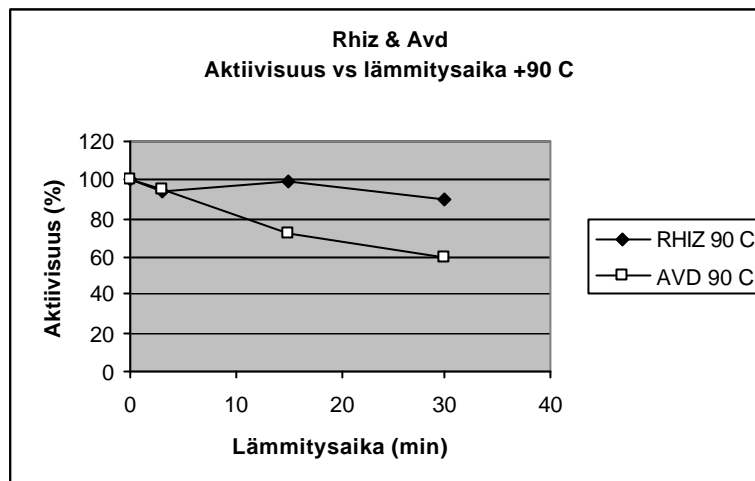
### 4.3.2 Lämpöstabiilisuuden määrittäminen

#### ELISA:

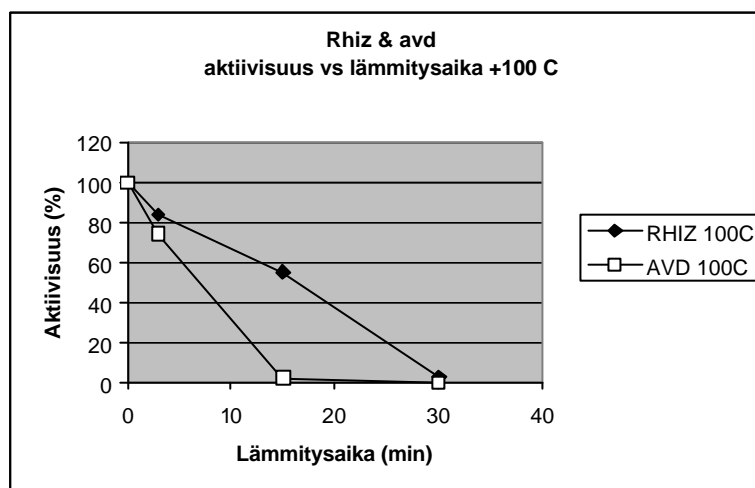
Rhizavidiinin aktiivisuuden säilymistä eri lämpötiloissa (80 °C, 90 °C ja 100 °C) tutkittiin kuumentamalla proteiinilaimennosta 1-30 minuuttia. Aktiivisuuden ”mittana” käytettiin proteiinien kykyä sitoa biotinyloitua alkaalista fosfataasia eri lämpötiloissa eri aikapisteiden kohdalla. Myös avidiinin lämpöstabiilisuus määritettiin samalla metodilla, jotta voitaisiin verrata rhizavidiinin lämpöstabiilisuutta avidiinin lämpöstabiilisuuteen. Tulokset kaavioiksi piirrettynä olivat seuraavat:



Kaavio 4,1: Rhizavidiinin ja avidiinin aktiivisuus (%) 80 °C lämpötilassa. Kaavioon valitut aikapisteet ovat 0, 3, 15 ja 30 min.



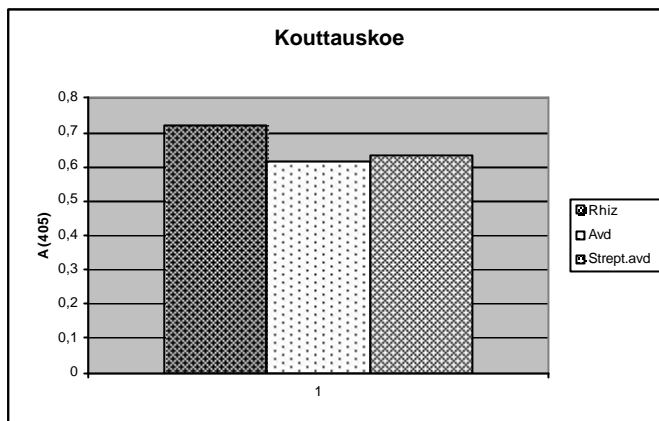
Kaavio 4,2: Rhizavidiinin ja avidiinin aktiivisuus (%) 90 °C lämpötilassa. Kaavioon valitut aikapisteet ovat 0, 3, 15 ja 30 min.



Kaavio 4,3: Rhizavidiinin ja avidiinin aktiivisuus (%) 100 °C lämpötilassa. Kaavioon valitut aikapisteet ovat 0, 3, 15, 30 min.

### 4.3.3 ELISA-levyn proteiinin sitomistehokkuuskoe

Ristiinreagointikoe ja seerumikoe suoritettiin Nunc Immobilizer®96-kuoppalevyllä. Ennen kokeiden suorittamista varmistettiin, että kokeissa käytettävät proteiinit (avidini, streptavidini ja rhizavidiini) sitoutuvat levyn kuoppin riittävän tehokkaasti. Kaavion 4,4 korkeat absorbanssiarvot osoittavat, että Nunc Immobilizer®-levyn kapasiteetti on hyvä eli se sitoo kokeissa käytettäviä proteiineja riittävästi, eikä suuria eroja proteiinien välillä ole.



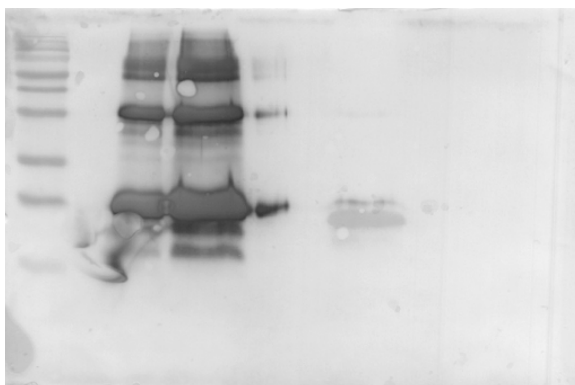
Kaavio 4,4: Nunc Immobilizer®-levylle sitoutettujen proteiinien antamat absorbanssiarvot ELISA:ssa

#### 4.3.4 Ristiinreagoitikoheet

##### Immunoblottaus:

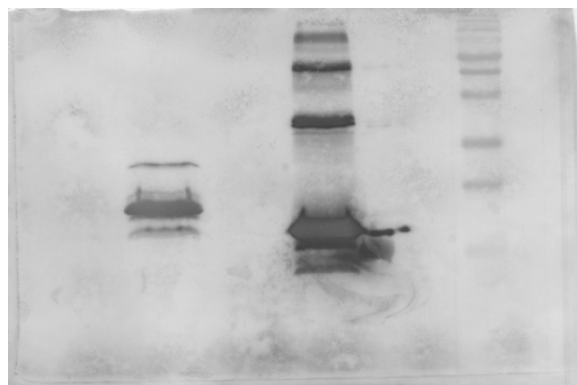
Nitroselluloosakalvoille siirrettyihin proteiineihin (avidini, streptavidini ja rhizavidini) sitoutettiin avidiinin ja streptavidinin polyklonaalisia vasta-aineita ja sitoutumisen voimakkuutta analysoitiin värjäämällä proteiinibandit 2<sup>o</sup> vasta-aineisiin sidotun alkaalisen fosfataasin avulla. Nitroselluloosakalvolle syntyvän värin intensiteetistä voitiin päätellä, kuinka hyvin 1<sup>o</sup> vasta-aineet tunnistivat kalvolla olevat proteiinit. Immunoblottauskoetehtiin kahdelle kalvolle, joista toiselle siirrettiin avidiini ja rhizavidini ja immunovärjäyksessä käytettiin primäärivasta-aineena hiiressä tuotettua avidiinin polyklonaalista vasta-ainetta. Toiselle kalvolle siirrettiin streptavidini ja rhizavidini ja immunovärjäyksessä primäärivasta-aineena käytettiin hiiressä tuotettua polyklonaalista streptavidinin vasta-ainetta.

Stand. Avd Avd Rhiz



Kuva 4,8: Immunoblottauskalvo, jossa primäärivasta-aineena on käytetty polyklonaalista anti-avidiniä.

Rhiz St.avd Stand.



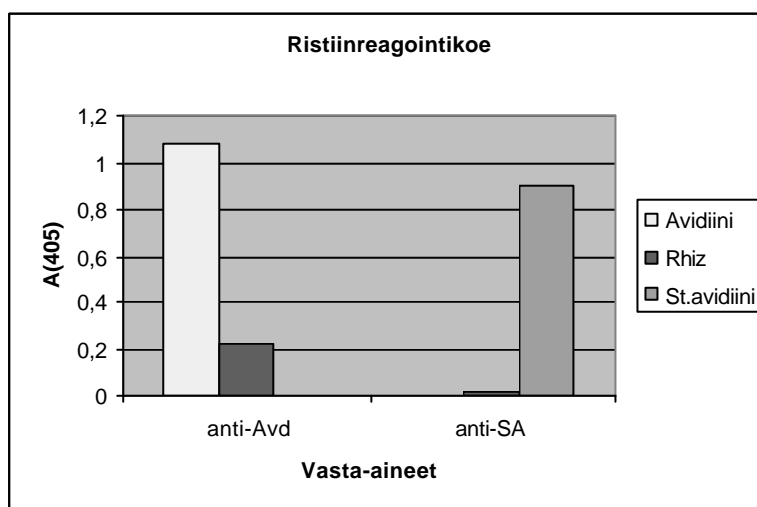
Kuva 4,9: Immunoblottauskalvo, jossa primääri-aineena on käytetty polyklonaalista anti-streptavidiniä.

Kuvat 4,8 ja 4,9 osoittavat, että sekä avidiinin että streptavidiinin polyklonaaliset vasta-aineet tunnistivat rhizavidiinin eli ristiinreagoivat jonkin verran rhizavidiinin kanssa. Anti-streptavidiini näyttäisi tulosten perusteella tunnistaneen rhizavidiinin voimakkaammin kuin anti-avidini. Anti-avidini tunnisti rhizavidiinin heikosti.

### ELISA:

Ristiinreagoitokokeessa käytettiin avidiinin ja streptavidiinin polyklonaalisia vasta-aineita 1<sup>o</sup> vasta-aineena. 2<sup>o</sup> vasta-aineeseen sidottu alkaalinen fosfataasi katalysoi reaktiossa substraatin kanssa lopputuotetta, joka aiheuttaa absorbanssiarvon nousun 405 nm:ssä. Absorbanssin suuruus kertoo, kuinka hyvin primäärivasta-aine tunnistaa kuoppaan koutatun proteiiniin.

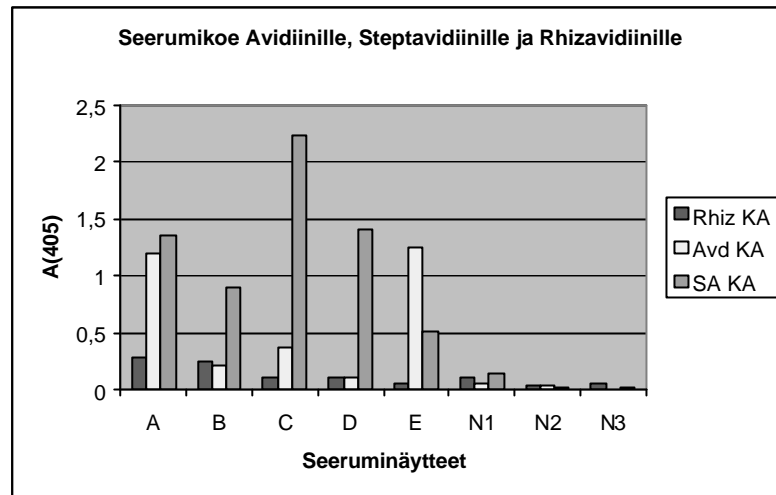
Kaavio 4,5 osoittaa, että avidiinin ja streptavidiinin vasta-aineet olivat ristiinreagoineet jonkin verran rhizavidiinin kanssa. Anti-avidinin ristiinreagointi rhizavidiinin kanssa näyttäisi olevan tulosten perusteella voimakkaampaa kuin anti-streptavidiinin.



Kaavio 4,5: Polyklonaalisen anti-avidinin kyky tunnistaa avidiini ja rhizavidiini sekä polyklonaalisen anti-streptavidiinin kyky tunnistaa streptavidiini ja rhizavidiini.

### 4.3.5 Seerumikoe

Seerumikokeen avulla tutkittiin, tunnistako avidiinille ja streptavidiinille altistuneiden syöpäpotilaiden seerumin vasta-aineet rhizavidiinin.



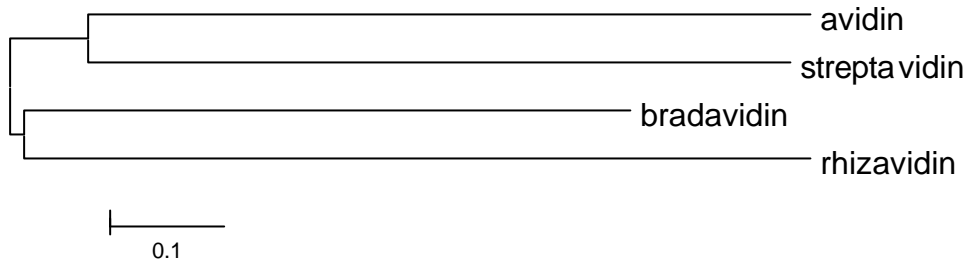
Kaavio 4.6: Avidiinille ja streptavidiinille kohdennetussa lääkähoidossa altistuneiden potilaiden seeruminäytteet on merkitty A-E. Negatiiviset kontrolliseerumit on merkitty N1-N3. Absorbanssipylväiden korkeus kuvaa tunnistuksen intensiteettiä eli sitä, kuinka voimakkaasti seerumien vasta-aineet tunnistavat kunkin proteiinin suhteessa toisiinsa.

## 4.4 AVIDIINIEN AMINOHAPPOSEKVENSSIEN VERTAILU JA EPITOOPPIANALYYSI

### 4.4.1 Aminohapposekvenssien vertailu



Kuva 4.10: Avidiinien aminohappovertilu. Nuolet osoittavat  $\beta$ -juosteiden kohtia avidiinin sekvenssissä. Biotiinin sitomiseen ja tunnistamiseen osallistuvat homologiset alueet on ympäröity laatikolla ja biotiinin kanssa suorassa kontaktissa olevat aminohapot on lihavoitu. Konservoituneet aminohapot on merkitty tähdellä (\*), vahvasti samankaltaiset aminohapot kaksoispisteellä (: ) ja vähemmän samankaltaiset pisteellä (.) . ( $\beta$ -juosteet ja homologiset alueet on merkitty kuten Livnah ym. 1993.)



Kuva 4,11: Proteiinien aminohapposekvensien evolutiiviset sukulaissuhteet fyleogeneettisen puun muodossa.

#### 4.4.2 Epitooppianalyysi

Epitooppianalyysissa rhizavidiinin aminohapposekvenssiä verrattiin avidiinin ja streptavidiinin aminohapposekvensseihin, joista etsittiin yhteisiä lineaariepitooppeja. Sekvenssivertailuihin (ks. alhaalla) on merkitty mahdolliset lineaariepitoopit lihavoidulla fontilla. Mahdollinen lineaariepitooppi on kolmen tai useamman identtisen tai vahvasti samankaltaisen aminohapon sarja. Risuaitamerkein (#) aminohappojen yläpuolelle on merkitty sellaiset lineaariepitoopit, jotka ovat ainutlaatuisia rhizavidiinin ja kyseisen vertailusekvenssin välillä eli samankaltaisuutta juuri sillä kohdalla ei esiinny rhizavidiinin ja toisen vertailusekvenssin välillä. Sekvenssien alapuolelle on identtiset (konservoituneet) aminohapot merkitty tähti-merkillä (\*), vahvasti samankaltaiset kaksoispisteellä (: ) ja heikosti samankaltaiset pisteellä (.).

Avidiini vs. rhizavidiini:

```

#####      ###
avidin      MVHATSPLLLLLLLLSLALVAPGLS-----ARKCSLTGKWTNDLGSNMTIGAVNSRGEFTG
rhizavidin  MIRTNAVAALVFAVATSALAFDASNFKDFSSIASASSWQNQSGSTMI I-QVDSFGNVSG
*:::.:      *::: : : : * . *      : . * :..* * : **.* * * : * * :.:*

avidin      TYITAVTATSNEIKESPLHGTENTINKRTQPTFGFTVNWKFSESTTVFTGQCFIDRNGKE
rhizavidin  QYVNRAQGTGCQNSPYPLTGRVN--GTFIAFSVGWNNSTENCSATGWTGYAQVNGNNTTE
*:. . .*. : . ** * * ..      :.*. . : :***: ** . : : *..*

avidin      VLKTMWLLRSSVNDIGDDWKATRVGINIFTRLRTOKE-----
rhizavidin  IVTSWNLAYE-----GGSGPAIEQQQDTFFQYVPTTENKSLKLD
::: : * .      *.. * . * : * : * : :

```

## Streptavidiniin vs. rhizavidiini:

```

#####   #####   ###
streptavidin  -MRKIVVAAIAVSLTTVSITASASADPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGA
rhizavidin    MIRTNAVAALVFAVATSALAFDASN--FKDFSSIASASS-----WQNQSGSTMIIQVDS
               :* . ***:..:::* ::: .*  ** .: .*:.:  * ** ***:*. .:

#####   #####   ##### #
streptavidin  DGALTGTYES---AVGNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTW
rhizavidin    FGNVSGQYVNRAQGTGCQNSPYPLTGRVN-----GTFIAFVSGWNNSTENCNSATGW
               * :.* * . ..* :* * **** :          ** :.:*.*:*. .*:*** *

#####   #####   #####
streptavidin  SG- QYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAASIDAAKKAGVNNG
rhizavidin    TGYAQVNGNNTTEIVTSWNLAY---EGGSGPAIEQGQDTFQYVPTTEN-----KSLLKD-
               :*  *.* :.:* *.* *:  *.: :  *:* ** * .:  * :.:

streptavidin  NPLDAVQQ
rhizavidin    -----

```

Epitooppivertailuista havaittiin, että streptavidiniin ja rhizavidiiniin välillä esiintyy paljon enemmän sellaisia lineaariepitooppeja, joita ei esiinny avidiinin ja rhizavidiiniin välillä.

## 4.5 PROTEIINIEN FYSIKAALISET OMINAISUUDET

Taulukko 4,1: Yhteenveto proteiinien fysikaalisista ominaisuuksista. Suluissa olevat arvot on määritetty biotiinin kanssa.

Proteiini	Koko (kDa) (geelifiltraatio- koe)	Denaturoituminen kuumennettaessa $T_m$ (°C) (DSC-koe)	Radiobiotiinin dissosiaationope- us [ $K_{diss}$ (s <sup>-1</sup> )]	pI- arvo	Kysteini- tähteiden määrä
Rhizavidiini- ydinmuoto	54,0 (31.0)	74,75 (100.50)	$1,11 \times 10^{-4}$	4,5	2
Avidiini	64,0 <sup>a</sup> (63.1) <sup>a</sup>	83,0 <sup>b</sup> (117.0) <sup>b</sup>	$8 \times 10^{-8}$ <sup>c</sup>	9,5	2
Streptavidini	51,1 <sup>a</sup> (53.4) <sup>a</sup>	75,0 <sup>b</sup> (112.0) <sup>b</sup>	$8 \times 10^{-6}$ <sup>c</sup>	6,1	0
Bradavidiini- ydinmuoto	45,3 <sup>a</sup> (49.2) <sup>a</sup>	-	$2 \times 10^{-4}$ <sup>c</sup>	4,1	2
Bradavidiini	50,0 <sup>a</sup> (57.5) <sup>a</sup>	-	$2 \times 10^{-4}$ <sup>c</sup>	6,3	2

<sup>a</sup> Nämä arvot on raportoitu Norlund ym., 2005

<sup>b</sup> Nämä arvot on raportoitu Gonzalez ym., 1999

<sup>c</sup> Arvot on silmämääräisesti arvioitu kuvasta D1 (Liite D)

## 5 TULOSTEN TARKASTELU

### 5.1 RHIZAVIDIINIGEENIN DNA:N KÄSITTELY

Alukkeiden suunnittelussa otettiin huomioon rhizavidiinigeenin harvinainen alotuskodoni (AAC) ja se muutettiin alukkeessa yleisemmäksi alotuskodoniksi (ATG). Tämä tehtiin siksi, että harvinainen alotuskodoni ei myöhemmin häiritsisi rhizavidiinin tuottumista bakteerisoluiissa. 5'-pään alukkeisiin lisättiin myös nukleotidit CACC TOPO®-kloonausta varten. Villityypin rhizavidiinigeenin lisäksi alukkeet suunniteltiin myös N-terminaalistaan lyhyemmälle *rhiz*-geenille (ydinmuoto), jonka translaatio alkaa aloituskodonin jälkeen seuraavasta metioniinista. Näin ollen rhizavidiinin ydinmuoto tuottuu signaalisekvensiltään 24 aminohappoa lyhyempänä polypeptidinä kuin rhizavidiinin villityypin muoto. Lyhyemmän signaalisekvenssin arvioitiin tuottavan identtisen ”mature”-proteiinin kuten pidempikin signaali, koska signaaliptidin katkaisukohta oli ennusteen mukaan sama. Myös bakteeriperäisestä bradavidiinista oli aiemmassa tutkimuksessa (Norlund ym., 2005) tuotettu lyhyemmän signaalisekvenssin omaavaa ydinmuotoa, eikä haitallisia vaikutuksia proteiinin tuottumiseen tai toimintaan havaittu.

Rhizavidiinigeenin ydin- ja villityypin muotoa monistettiin polymeerasiketjureaktiolla, jossa templaattina käytettiin *Rhizobium etli* DNA:ta. Kuvasta 4,1 voidaan havaita, että PCR on hyvin todennäköisesti onnistunut, sillä PCR-tuotteet ovat oikeankokoisia rhizavidiinigeenien nukleotidiketjujen pituuksiin nähden. Kuvasta 4,1 voidaan myös havaita ydinmuodon ja villin tyyppin nukleotidiketjujen kokoerot.

TOPO-kloonauksen ja vektoreiden transformaation jälkeinen pesäkekasvatus onnistui hyvin ja pesäkkeitä kasvoi maljoille runsaasti. Vaikka antibioottiselektiossa käytetty ampisilliini oli tappanut maljalta vektorittomat solut, oli mahdollista, että kloonien joukossa oli itsensä kanssa ligoituneita vektoreita tai vektoreita, joissa insertti oli väärinpäin. Kloonit seulottiin DNA-sekvensoinnilla väärin kloonien eliminoimiseksi. DNA-sekvensointi osoittautui luultua hankalammaksi, sillä usein tuloksena saatiin sekvenssi vain toiseen suuntaan tai sekvenssi oli muuten puutteellinen. Luultavasti syynä



oli sekvensoitavan DNA-templaatin pieni pitoisuus; sitä laimennettiin virheellisten ohjeiden mukaan 1 : 10. Lopulta kuitenkin rhizavidiinin ydinmuoto saatiin sekvensoitua täydellisesti. Villityypin muodosta saatiin sekvensointitulokset vain toiseen suuntaan osittain sekvensoituna.

## 5.2 RHIZAVIDIININ TUOTTAMINEN JA PUHDISTUS

Inserttien sisältämien vektoreiden transformaatio *E.coli* (BL21-AI™) tuottosoluihin onnistui hyvin ja pesäkkeitä kasvoi maljoille runsaasti. Proteiinin tuotto-olosuhteita (esim. indusointisolutiheys, tuottolämpötila) ei optimoitu vaan proteiinia tuotettiin samoissa olosuhteissa kuin muita avidiinin kaltaisia proteiineja oli aiemmin tuotettu. Tuoton optimoinnilla olisi voitu saavuttaa paremmat proteiinin saannot, vaikka rhizavidiinin ydinmuoto tuottui kohtuullisesti myös tällä metodilla.

Proteiinin puhdistuksessa hankalaksi vaiheeksi osoittautui lyysatun solumassan erottaminen lyaattiliuoksesta. Jos solujen lyysaus oli ollut puutteellista, ei solumassa erottunut sentrifugauksessa pelletiksi vaan jäi osaksi supernatanttiin. Tämä puolestaan heikensi proteiinin saantoa. Havaittiin, että tehokas sonikointi hajotti solut parhaiten ja edesauttoi solumassan pelleteoitumista sentrifugauksen aikana. Kuva 4,2 osoittaa, että sekä ydinmuoto että villityypin muoto proteiinista tuottui, koska puhdistusvaiheita läpikäymättömässä näytessä (T-näyte) on havaittavissa oikean kokoista proteiinia.

Rhizavidiinin eluoiminen pH 4-puskurilla osoittautui tehottomaksi. Rhizavidiini mahdollisesti sitoutuu 2-iminobiotiiniin voimakkaammin kuin pH 4-puskurilla hyvin 2-iminobiotiiniresiinistä irtoavat avidiini ja streptavidiini. Arvoitukseksi kuitenkin jäi, miksi rhizavidiinin ydinmuoto eluoi ensimmäisellä puhdistuskerralla pH 4-puskurilla, mutta myöhemmin eluointi pH-4 puskurilla osoittautui heikoksi; pylvästä irtosi vain pieniä määriä proteiinia. Myöhemmin havaittiin, että rhizavidiinin ydinmuoto irtoaa 2-iminobiotiiniresiinistä 0,1 M etikkahapolla, jota on aiemmin käytetty muun muassa AVR-proteiinien eluutioon D-biotiiniresiinistä (Hytönen ym., 2005).

Rhizavidiinin villityypin proteiinia saatiin eluutiofraktioihin hyvin heikosti, kun eluutioon käytettiin pH 4-puskuria. Myöhemmin pylvästä huuhdottiin myös 0,1 M etikkahapolla,

mutta eluutionäytteisiin ei tämänkään käsittelyn jälkeen saatu proteiinia. Mahdollisesti villin tyypin rhizavidiini oli hävinnyt puhdistusvaiheiden aikana tai se oli sitoutunut resiiniin niin vahvasti, ettei käytetyt eluointimenetelmät pystyneet irrottamaan sitä resiinistä. Kuvasta 4,2 voidaan havaita, että proteiinia oli tuottunut, sillä se näkyi bandina puhdistamattomassa T-näytteessä. Koska villin tyypin rhizavidiinia ei saatu tuotettua, päädyttiin biokemiallisten ominaisuuksien määrityskokeissa käyttämään rhizavidiinin ydinmuotoa. Jatkossa villityypin rhizavidiinin eluomista voisi koettaa vahvemmallalla etikkahappoliuoksella (esim. 0,5 M), mutta vaarana on, että käsittely denaturoi proteiinin.

Rhizavidiinifraktioiden pakastamisen ja sulatuksen jälkeen havaittiin, että rhizavidiini muodosti liukenemattoman sakan nesteeseen. Etikkahapon vaihtaminen dialyysillä esimerkiksi veteen tai natriumasetaattipuskuriin ei auttanut liukenemista. Ainoastaan suolan lisääminen puskuriin (1 M NaCl PBS:ssä) sai rhizavidiinin liukenemaan. Arveltiin, että rhizavidiinin liukoisuus saattaa olla heikompaa kuin esimerkiksi avidiinilla tai streptavidiinilla. Jäätymisessä vapaat vesimolekyylit poistuvat proteiinin ympäriltä ja syntyy jääkiteitä. Tällöin proteiinit pääsevät muodostamaan interaktioita keskenään ja kiteiden muodostuminen mahdollistuu. Jokin varausten välinen interaktio rhizavidiinimolekyylien välillä voisi olla mahdollinen, sillä korkeammassa suolapitoisuudessa proteiini on liukoinen. Mahdollisesti rhizavidiini on hydrofobisempi kuin edellä mainitut proteiinit. Jäätymisessä rhizavidiinien hydrofobisten alueiden välille muodostuneet vuorovaikutukset aiheuttavat rhizavidiinimolekyylien sitoutumisen yhteen ja ovat mahdollisesti hajoitettavissa hydrofobisia vuorovaikutuksia rikkovilla aineilla, kuten suoloilla tai detergenteillä.

### 5.3 RHIZAVIDIININ OMINAISUUKSIEN MÄÄRITTÄMINEN

#### 5.3.1 Rhizavidiinin koko ja rakenne

HPLC-kokeestn (Liite A) tulokset osoittivat, että rhizavidiini oli kooltaan 54 kDa:n kokoinen ilman biotiinia, mutta biotiinin kanssa mitattaessa rhizavidiini esiintyi 31 kDa:n kokoisena molekyylinä. Tuloksista pääteltiin, että rhizavidiini muuttaa mahdollisesti

konformaatiotaan tiiviimmäksi, globulaariseksi muodoksi sitoessaan biotiinia ja eluoituu geelifiltraatiokromatografiassa pienemmän kokoisena proteiinina kuin ilman biotiinia. Myös avidiinin ja streptavidinin tunnetaan muuttavan konformaatiotaan vähäisesti biotiinin sitoutuessa sitomistaskuun (Livnah ym., 1993; Rosano ym., 1999). Tarkemmista rhizavidinin rakennemäärityksistä biotiinin kanssa sekä ilman biotiinia selviäisi, pitääkö päätelmä rhizavidinin konformaatiomuutoksesta paikkansa.

Ilman rikkisiltoja tuhoavaa  $\beta$ -merkaptoetanolia tehdyssä SDS-PAGE-kokeessa selvisi, ettei rhizavidini sisällä alayksiköiden välisiä rikkisiltoja. Tulos ei kuitenkaan poissulje sisäisen rikkisillan olemassaolon mahdollisuutta. Rhizavidinilla on polypeptidiketjussaan rikkisillan muodostumisen mahdollistavat kysteinitähteet. Onkin mahdollista, että rhizavidiniin muodostuu avidiinin lailla (Green 1990) yksi monomeerin sisäinen rikkisilta rakennetta stabiloimaan.

### 5.3.2 Lämpöstabiilisuuden määrittäminen

Rhizavidinin lämmönkestävyyttä määritettiin Differential scanning calorimetry DSC (Liite B) ja ELISA -metodeilla. DSC-kokeella saatiin rhizavidinille sulamislämpötilaksi ( $T_m$ ) ilman biotiinia 74.75 °C sekä biotiinin kanssa 100.50 °C. Verrattuna avidiinin aiemmin raportoituihin  $T_m$ -arvoihin (83 ja 117 °C) rhizavidini kestää hieman heikommin kuumennusta. Arvot eivät kuitenkaan ole aivan suoraan verrattavissa, sillä avidiinin määrittäminen on tehty fosfaattipuskurissa ja rhizavidinin etikkahapossa. Kaiken kaikkiaan tuloksista voidaan päätellä, että rhizavidini on muiden avidiinin kaltaisten proteiinien lailla varsin lämpöstabiili proteiini ja biotiinin sitominen lisää lämmönkestävyyttä.

Lämmitysajan vaikutusta rhizavidinin aktiivisuuteen, biotinyloidun alkaalisen fosfataasin sitomiskykyyn, tutkittiin ELISA:lla kolmessa eri lämpötilassa. Avidiinia käytettiin kontrollina, jotta voitiin verrata proteiinien lämmönkestävyyttä toisiinsa. Tulokset olivat päinvastaiset DSC-kokeeseen verrattuna, sillä niiden mukaan rhizavidini on avidiinia kestävämpi. 80 ja 90 °C:en kuumennus ei vaikuttanut rhizavidinin aktiivisuuteen juuri lainkaan. 100 °C:ssa aktiivisuudesta säilyi 50 % 15 minuutin kuumennuksen jälkeen, kun avidiinin aktiivisuus oli tässä vaiheessa laskenut jo nollaan. Tämän kokeen tulosten mukaan rhizavidini kestäisi kuumennusta pidempään kuin avidiini. Ristiriitaiset tulokset

DSC:n ja ELISA:lla tehdyn lämpöstabiilisuuskokeen välillä voivat selittyä sillä, että proteiini on menetelmissä eri konformaatioissa. Proteiinit voivat muuttaa konformaatiotaan sitoutuessaan levyn pintaan, mikä saattaa vaikuttaa niiden käyttäytymiseen. ELISA:ssa proteiini sitoutuu levyn pintaan, DSC:ssä se pysyy luonnollisessa konformaatioissaan niin kauan, kunnes denaturoituu ja menettää biologisen aktiivisuutensa. Mahdollisesti immobilisoitu rhizavidiini on kestävämpi kuin avidiini. Tulokset antavat viitteitä siitä, että rhizavidiinilla on varsin hyvä lämmönkestävyys.

### 5.3.3 Biotiinin sitominen

Isothermal titration calorimetry (ITC) -koe (Liite C) osoitti, että rhizavidiinilla on suuri affiniteetti D-biotiinia kohtaan. Ongelmana ITC-mittauksissa vahvan affiniteetin kanssa on se, että ITC-laitteella pystytään mittaamaan affiniteettia vain n.  $K_d = 10^{-8} - 10^{-9}$  asti, joten tarkkoja mittaustuloksia ei affiniteetin osalta saatu. Rhizavidiinin affiniteetti biotiiniin ylitti ITC-laitteen kapasiteetin, joten se osoittaa affiniteetin olevan suurempi kuin  $K_d = 10^{-8} - 10^{-9}$ . Lisäksi rhizavidiinin mittaustulokset olivat hyvin samankaltaisia kontrollina käytetyn avidiinin kanssa, jonka affiniteetti D-biotiinia kohtaan tiedetään olevan  $K_d = 10^{-15}$  (Green 1975).

Rhizavidiini-biotiini kompleksin dissosiaatiokinetiikkaa tutkittiin radiobiotiini-dissosiaatiokokeella (Liite D). Rhizavidiinille mitatut dissosiaationopeudet viittaavat siihen, että rhizavidiinilla on heikompi affiniteetti biotiinia kohtaan kuin avidiinilla ja streptavidiinilla, mutta samaa luokkaa bradavidiinin affiniteetin kanssa.

Rhizavidiini ja bradavidiini ovat hernekasvien juurinystyröissä elävien, samaan *Rhizobia*-bakteerisukuun kuuluvien bakteerien (*Rhizobium etli* ja *Bradyrhizobium japonicum*) ekspressoimia proteiineja (ks. yleiskatsaus Guillen-Navarro ym., 2005). Onkin mahdollista, että proteiinien avidiinia heikompi affiniteetti biotiiniin on kuitenkin tarpeeksi vahva täyttämään proteiinien biologisen tehtävän edellä mainituissa bakteereissa. Avidiinin kaltaisten proteiinien biologisen roolin on arveltu liittyvän mikrobien torjuntaan (Green 1990; Norlund ym., 2005). Norlund (2005) esitti hypoteesin, että bradavidiinin biologinen rooli on sitoa biotiini pois muiden organismien käytöstä, jonka seurauksena

bakteeriyhteisön ympärille muodostuu yhteisöä suojaava antimikrobinen alue. Jos hypoteesi on oikea, mahdollisesti myös rhizavidiinin rooli biotiinin sitojana liittyy *Rhizobium etli* -bakteerien suojaamiseen muilta organismeilta. Kummatkin edellä mainituista bakteerilajeista kykenevät jossain määrin biotiinin biosynteesiin, joten biotiinin saanti omaan käyttöön on näillä bakteereilla turvattu. Biotiinin sitojaproteiinin tuottaminen saattaa olla suurikin valintaetu siihen kykeneville bakteereille, sillä maaperä harvoin sisältää vapaata biotiinia. Mielenkiintoista olisi tehdä rhizavidiini ”knock-out” *Rhizobium etli* -bakteerikanta ja tarkastetella vaikutuksia bakteerien elinkykyyn maaperässä.

Norlund ym., (2005) pohtivat tutkimuksessaan bradavidiiniin mahdollisesti muodostuvan motiivin vaikutusta biotiinin sitomiseen. Avidiinin ja streptavidiinin eroja biotiinin sitojana on selitetty muun muassa  $\beta$ -juosteita 3 ja 4 yhdistävän silmukan rakenteellisilla eroilla (Weber ym., 1989; Livnah ym., 1993 ja Pazy ym., 2002). Silmukassa on todettu tapahtuvan pieni konformaatiomuutos biotiinin sitoutuessa; se ikään kuin lukitsee biotiinin sitomistaskun sisään. Bradavidiinilla  $\beta$ -juosteiden 3 ja 4 välinen silmukka on poikkeuksellinen; se sisältää kysteiniitähteen, joka voi muodostaa sisäisen rikkisillan  $\beta$ -juosteiden 5 ja 6 välisen silmukan kysteiniitähteen kanssa. Rikkisillalla saattaa olla jokin vaikutus silmukan toimimiseen biotiininsitomistaskun kantena. Myös rhizavidiinin kysteiniitähteet ovat sijoittuneet samoihin silmukoihin ja lähes identtisiin kohtiin kuin bradavidiinilla. Mahdollisesti tämä rakenteellinen yhtäläisyys selittää proteiinien samansuuruiset dissosiaationopeudet radiobiotiinikokeessa. Biotiinin on siten helpompi irrota sitomistaskusta ja siksi bradavidiinin ja rhizavidiinin affiniteetti biotiiniin on heikompi kuin esimerkiksi avidiinilla.

#### 5.3.4 Rhizavidiinin immunologisten ominaisuuksien määrittäminen

Avidiinin ja streptavidiinin vasta-aineiden kykyä tunnistaa rhizavidiini tarkasteltiin ristiinreagointikokeilla sekä seerumikokeella. Ristiinreagointikokeissa havaittiin mielenkiintoinen asia. Immunoblottauksessa streptavidiinin vasta-aineet tunnistivat rhizavidiinin voimakkaammin kuin avidiinin vasta-aineet. ELISA:lla tehdystä kokeesta saatiin päinvastaiset tulokset; anti-avidini tunnisti rhizavidiinin suuremmalla intensiteetillä. Kummassakin kokeessa käytettiin samoja vasta-aineita. Erot immunoblottauksen ja

ELISA-ristiinreagointikokeen välillä saattavat johtua proteiinin konformaatiosta kokeen aikana. Immunoblottauksessa proteiinit ovat pääasiassa denaturoituneessa muodossa, kun taas ELISA-kokeessa ne säilyttävät laskostuneen rakenteensa.

Vasta-aineet tunnistavat spesifisesti tietyn epitoopin antigeenin pinnalta ja kiinnittyvät siihen. Lineariepitoppi on muutaman aminohapon mittainen pätkä proteiinin primaarirakenteessa, jonka vasta-aine tunnistaa. Kun proteiini on denaturoituneessa muodossa, vain lineariepitootit ovat mahdollisia vasta-aineiden tunnistuskohtia. Konformaationaaliset epitoopit, jotka syntyvät proteiinin laskostuessa kolmiulotteiseen muotoonsa, voivat puolestaan sisältää aminohappoja eri puolilta aminohappoketjua. Konformaationaalinen epitooppi voi siten olla monimutkaisempikin rakenne. Vasta-aineet kykenevät tunnistamaan konformaationaaliset epitoopit vain silloin, kun proteiini on laskostuneessa muodossa.

Epitooppianalyysissa (kappale 4.4.2, s.62) selviteltiin rhizavidiinin primäärirakenteessa sijaitsevia lineariepitoopeja, jotka esiintyvät myös streptavidiinin ja avidiinin primäärirakenteessa. Havaittiin, että yhteisiä lineariepitoopeja rhizavidiinilla oli enemmän streptavidiinin kanssa kuin avidiinin kanssa. Havainto saattaa selittää sen, miksi immunoblottauksessa streptavidiinin vasta-aineet tunnistivat rhizavidiinin voimakkaammin kuin avidiinin vasta-aineet. ELISA-kokeessa lineariepitootit voivat hautautua proteiinin sisään, jolloin vasta-aineet eivät pääse kiinnittymään kyseisiin epitoopeihin. Avidiinilla ja rhizavidiinilla on mahdollisesti enemmän yhteisiä konformaationaalisia epitoopeja kuin rhizavidiinilla ja streptavidiinilla, mikä aiheuttaa voimakkaamman vasten ELISA-ristiinreagointikokeessa anti-avidinia käytettäessä. Eli toisin sanoen rhizavidiinin laskostumisessa muodostuvat rakenteet muistuttavat enemmän avidiinin rakenteita kuin streptavidiinin rakenteita.

Seerumikokeessa avidiinille ja streptavidiinille altistuneiden potilaiden seeruminäytteiden sisältämät vasta-aineet tunnistivat avidiinin ja streptavidiinin, pääasiassa streptavidiinin voimakkaammin. Streptavidiinin onkin havaittu olevan avidiinia antigeenisempi proteiini (Chinol ym., 1998). Yksikään seeruminäytteistä ei tunnistanut rhizavidiinia merkittävästi. Seerumikokeen tulos on rohkaiseva muun muassa kohdennetun lääkehoidon sovellusten

kannalta. Rhizavidiinia voitaisiin mahdollisesti käyttää tulevaisuudessa avidiini- ja streptavidiinihoitojen rinnalla. Potilaalle ei voida antaa montaa hoitoa samalla proteiinilla, koska hoidossa käytettävää proteiinia vastaan muodostuu immuunivaste; avidiinia vastaan muutaman hoitokerran jälkeen ja rhizavidiinia vastaan jopa yhden hoitokerran jälkeen (Hytönen ym., 2003).. Tämän seurauksena immuunivaste tuhoaa terapeuttista yhdistettä kantavan proteiinin ennen syöpäkasvaimen pääsyä sekä saattaa aiheuttaa vakavia sivuvaikutuksia, jotka voivat johtaa potilaan kuolemaan. Proteiinia, jota immuunipuolustus ei tunnista, voitaisiin käyttää jatkossa potilaan terapiahoidoissa (strept)avidiinikäsittelyn jälkeen, jolloin hoitokertojen määrä lisääntyisi sekä hoito tehostuisi.

### 5.3.5 Proteiinien aminohapposekvenssien vertailu ja evolutiiviset suhteet

Kun rhizavidiinin aminohapposekvenssiä verrataan avidiinin, streptavidiinin ja bradavidiinin aminohapposekvensseihin (kuva 4,7) havaitaan, että eniten yhtäläisyyksiä sekvenssien väliltä löytyy biotiinin sitomiseen osallistuvilta homologisilta alueilta. Suurin osa suoraan biotiinin kanssa kontaktissa olevista aminohapoista on konservoituneita proteiinien välillä. Esimerkiksi biotiininsitomistaskun pohjalla sijaitseva, tärkeän vetysidoksen biotiinin kanssa muodostava tyrosiini-33 (numerointi avidiinin aminohapposekvenssin mukaan) on konservoitunut. Sen sijaan joitainkin mutaatioita on tapahtunut aminohapoissa tryptofaani 70 sekä fenyylialaniini 72 ja 79. Kyseiset aminohapot ovat tärkeitä biotiinin sitomisen kannalta, sillä ne tekevät biotiinin sitomistaskusta hydrofobisen. Vastakkaiseen monomeeriin sitoutuneen biotiinin kanssa vuorovaikutuksia muodostava tryptofaani 110 on rhizavidiinilla mutatoitunut proliiniksi. Gitlin ym. (1988) havaitsivat, että mutaatio tryptofaani 110:ssä (tai tryptofaani 70:ssä) alentaa huomattavasti avidiinin affiniteettia biotiiniin. Kyseisellä mutaatiolla saattaa olla heikentävää vaikutusta myös rhizavidiinin kykyyn sitoa biotiinia.

Kuva 4,8 havainnollistaa avidiinin, streptavidiinin, bradavidiinin ja rhizavidiinin aminohapposekvenssien fylogeneettisiä sukulaisuhteita. Avidiini ja streptavidiini muodostavat puun toisen haaran ja rhizavidiini ja bradavidiini toisen. Rhizavidiinin ja bradavidiinin kehittyminen samasta kantalajista ei ole kovin yllättävää, sillä kyseisiä proteiineja ilmentävät bakteerilajit ovat sukulaisia keskenään (kuuluvat *Rhizobia-*

bakteerikantaan). Proteiinit ovat kuitenkin erottuneet omiksi lajeikseen varsin varhaisessa vaiheessa, joka mahdollisesti selittää proteiinien primäärirakenteen erilaisuuden; aminohappoketjujen välillä on vain 22.2 % identtisyttä. Voidaan kuitenkin ajatella, että bradavidiinin ja rhizavidiinin biologinen rooli kyseisissä bakteerilajeissa on hyvin samantapainen. Fysikaalisilta ominaisuuksiltaan ne muistuttavat enemmän toisiansa kuin avidiinia tai streptavidiinia.



## 6 LÄHDELUETTELO

- Adams, G.P., J.E. McCartney, M.S. Tai, H. Oppermann, J.S. Huston, W.F. Stafford 3rd, M.A. Bookman, I. Fand, L.L. Houston, and L.M. Weiner. 1993. Highly specific in vivo tumor targeting by monovalent and divalent forms of 741F8 anti-c-erbB-2 single chain. *Fv. Cancer Res.* Sep 1;53(17):4026-34.
- Ahlroth, M.K., P. Ahlroth, and M.S. Kulomaa. 2001. Copy-number fluctuation by unequal crossing-over in the chicken avidin gene family. *Biochem Biophys Res Commun.* Oct 26;288(2):400-6.
- Ahlroth, M.K., E.H. Kola, D. Ewald, J. Masabanda, A. Sazanov, R. Fries, and M.S. Kulomaa. 2000. Characterization and chromosomal localization of the chicken avidin gene family. *Anim Genet.* Dec;31(6):367-75.
- Arano Y., H. Matsushima, M. Tagawa, M. Koizumi, K. Endo, J. Konishi, and A. Yokoyama. 1991. A novel bifunctional metabolizable linker for the conjugation of antibodies with radionuclides. *Bioconjug Chem.* Mar-Apr;2(2):71-6.
- Argarana, C.E., I.D. Kuntz, S. Birken, R. Axel, and C.R. Cantor. 1986. Molecular cloning and nucleotide sequence of the streptavidin gene. *Nucleic Acids Res.* Feb 25; 14(4):1871-82.
- Axworthy, D.B., J.M. Reno, M.D. Hylarides, R.W. Mallett, L.J. Theodore, L.M. Gustavson, F. Su, L.J. Hobson, P.L. Beaumier, and A.R. Fritzberg. 2000. Cure of human carcinoma xenografts by a single dose of pretargeted yttrium-90 with negligible toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Feb 15;97(4):1802-7.
- Bagshawe, K.D. 1989. The First Bagshawe lecture. Towards generating cytotoxic agents at cancer sites. *Br J Cancer.* Sep;60(3):275-81. Review.
- Bayer, E.A., F. De Meester, T. Kulik, and M. Wilchek. 1995. Preparation of deglycosylated egg white avidin. *Appl Biochem Biotechnol.* Apr;53(1):1-9.
- Bayer, E.A., T. Kulik, R. Adar and M. Wilchek. 1995. Close similarity among streptavidin-like, biotin-binding proteins from Streptomyces. *Biochim Biophys Acta.* Jul 25;1263(1):60-6.
- Bayer, E.A., and M. Wilchek. 1990. Application of avidin-biotin technology to affinity-based separations. *J Chromatogr.* Jun 27;510:3-11. Review.
- Bayer, E.A., and M. Wilchek. 1980. The use of the avidin-biotin complex as a tool in molecular biology. *Methods Biochem Anal.* 26:1-45.
- Beckett, D., and B.W. Matthews. 1997. Escherichia coli repressor of biotin biosynthesis. *Methods Enzymol.* 279:362-76. Review.
- Bethlenfalvay, G.J., S.S. Abu-Shakra, and D.A. Phillips. 1978. Interdependence of Nitrogen Nutrition and Photosynthesis in Pisum sativum L: II. Host Plant Response to Nitrogen Fixation by Rhizobium Strains. *Plant Physiol.* Jul;62(1):131-133.
- Bicke, U., T. Yoshikawa, and W.M. Pardridge. 2001. Delivery of peptides and proteins through the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev.* Mar 1;46(1-3):247-79. Review.
- Bisgrove, B. W., M.E Andrews, and R.A. Raff. 1995. Evolution of the fibropellin gene family and patterns of fibropellin gene expression in sea urchin phylogeny. *J Mol Evol.* Jul;41(1):34-45.
- Blake, M.S., K.H. Johnston, G.J. Russell-Jones, and E.C. Gotschlich. 1984. A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. *Anal Biochem.* Jan;136(1):175-9.

- Boas, M.A. 1927. The effect of desiccation nutritive properties of egg white. *Biochem. J.*, 21:712-724.
- Bonjour, J-P. 1984. Biotin. In Machlin, LJ, ed. Handbook of Vitamins. Nutritional, Biochemical and Clinical Aspects. New York, NY: Marcel Dekker, Inc. 403-435.
- Bos, E.S., W.H. Kuijpers, M. Meesters-Winters, D.T. Pham, A.S. de Haan, A.M. van Doornmalen, F.M. Kaspersen, C.A. van Boeckel, and F. Gougeon-Bertrand. 1994. In vitro evaluation of DNA-DNA hybridization as a two-step approach in radioimmunotherapy of cancer. *Cancer Res.* Jul 1;54(13):3479-86.
- Breitz, H.B., P.L. Weiden, P.L. Beaumier, D.B. Axworthy, C. Seiler, F.M. Su, S. Graves, K. Bryan, J.M. Reno. 2000. Clinical optimization of pretargeted radioimmunotherapy with antibody-streptavidin conjugate and 90Y-DOTA-biotin. *J Nucl Med.* Jan;41(1):131-40.
- Bush, L., and H.B. White 3rd. 1989. Conversion of domains into subunits in the processing of egg yolk biotin-binding protein I. *J Biol Chem.* Apr 5;264(10):5741-5.
- Chalet, L., T.W. Miller, F. Tausig, and F.J. Wolf. 1963. Antibiotic MSD-235. II. Separation and purification of synergistic components. *Antimicrobial Agents Chemother.* 161:28-32.
- Chalet, L., and F. Wolf. 1964. The Properties of Streptavidin, a Biotin-Binding Protein Produced by Streptomycetes. *Arch Biochem Biophys.* 106:1-5.
- Chinol, M., P. Casalini, M. Maggiolo, S. Canevari, E.S. Omodeo, P. Caliceti, F.M. Veronese, M. Cremonesi, F. Chiolerio, E. Nardone, A.G. Siccardi, and G. Paganelli. 1998. Biochemical modifications of avidin improve pharmacokinetics and biodistribution, and reduce immunogenicity. *Br J Cancer.* Jul;78(2):189-97.
- Colcher, D., G. Pavlinkova, G. Beresford, B.J. Booth, A. Choudhury, and S.K. Batra. 1998. Pharmacokinetics and biodistribution of genetically-engineered antibodies. *Nucl Med.* Dec;42(4):225-41. Review.
- Goodwin, D.A., and C.F. Meares. 1997. Pretargeting: general principles; October 10-12, 1996. *Cancer.* Dec 15;80(12 Suppl):2675-80.
- Cremonesi, M., M. Ferrari, M. Chinol, M.G. Stabin, C. Grana, G. Prisco, C. Robertson, G. Tosi, and G. Paganelli. 1999. Three-step radioimmunotherapy with yttrium-90 biotin: dosimetry and pharmacokinetics in cancer patients. *Eur J Nucl Med.* Feb;26(2):110-20.
- DeLange, R.J., and T.S. Huang. 1971. Egg white avidin. Sequence of the 78-residue middle cyanogen bromide peptide. Complete amino acid sequence of the protein subunit. *J Biol Chem.* Feb 10;246(3):698-709.
- Denison, R.F., and T. Kiers. 2004. Why are most rhizobia beneficial to their plant hosts, rather than parasitic? *Microbes Infect.* Nov;6(13):1235-9. Review.
- Donovan, J.W., K.D. Ross. 1973. Increase in the stability of avidin produced by binding of biotin. A differential scanning calorimetric study of denaturation by heat. *Biochemistry.* Jan 30;12(3):512-7.
- Downie, J.A. 1994. Signalling strategies for nodulation of legumes by rhizobia. *Trends Microbiol.* Sep;2(9):318-24. Review.
- Eakin, R. E., Snell, E. E., and Williams, R. J. 1941. The Concentration and Assay of Avidin, the Injury-producing Protein in Raw Egg White *J. Biol. Chem.* 140: 535-543.
- Elo, H.A., and J. Korpela. 1984. The occurrence and production of avidin: a new conception of the high-affinity biotin-binding protein. *Comp Biochem Physiol B.*;78(1):15-20. Review.
- Flower, D.R. 1996. The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem J.* Aug 15;318 (Pt 1):1-14. Review.

- Gestin, J.F., A. Faivre-Chauvet, R.C. Mease, C. Sai-Maurel, P. Thedrez, M. Slinkin, G.E. Meinken, S.C. Srivastava, and J.F. Chatal. 1993. Introduction of five potentially metabolizable linking groups between  $^{111}\text{In}$ -cyclohexyl EDTA derivatives and  $\text{F(ab')}_2$  fragments of anti-carcinoembryonic antigen antibody-I. A new reproducible synthetic method. *Nucl Med Biol.* Aug;20(6):755-62.
- Gitlin, G., E.A. Bayer, and M. Wilchek. 1988. Studies on the biotin-binding site of avidin. Tryptophan residues involved in the active site. *Biochem J.* Feb 15;250(1):291-4.
- Gitlin, G., E.A. Bayer, and M. Wilchek. 1990. Studies on the biotin-binding sites of avidin and streptavidin. Tyrosine residues are involved in the binding site. *Biochem J.* Jul 15;269(2):527-30.
- Goldenberg, D.M., F.H. DeLand, S.J. Bennett, F.J. Primus, M.O. Nelson, R.C. Flanigan, J.W. McRoberts, A.W. Bruce, and D.E. Mahan. 1983. Radioimmuno-detection of prostatic cancer. In vivo use of radioactive antibodies against prostatic acid phosphatase for diagnosis and detection of prostatic cancer by nuclear imaging. *JAMA.* Aug 5;250(5):630-5.
- Gonzalez, M., C.E. Argarana, and G.D. Fidelio. 1999. Extremely high thermal stability of streptavidin and avidin upon biotin binding. *Biomol Eng.* Dec 31;16(1-4):67-72.
- Goodwin D.A., and C.F. Meares. 1997. Pretargeting: general principles; October 10-12, 1996. *Cancer.* Dec 15;80(12 Suppl):2675-80.
- Gope, M.L., R.A. Keinanen, P.A. Kristo, O.M. Conneely, W.G. Beattie, T. Zarucki-Schulz, B.W. O'Malley, and M.S. Kulomaa. 1987. Molecular cloning of the chicken avidin cDNA. *Nucleic Acids Res.* Apr 24;15(8):3595-606.
- Grana, C., M. Chinol, C. Robertson, C. Mazzetta, M. Bartolomei, C. De Cicco, M. Fiorenza, M. Gatti, P. Caliceti, and G. Paganelli. 2002. Pretargeted adjuvant radioimmunotherapy with yttrium-90-biotin in malignant glioma patients: a pilot study. *Br J Cancer.* Jan 21;86(2):207-12.
- Green, N.M. 1975a. Avidin. *Adv Protein Chem.* 29:85-133.
- Green, N.M. 1975b. Avidin. In *Advances in Protein Chemistry*, Academic Press, New York, (Eds. Anfinsen, C.B.; Edsall, J.T.; Richards, F. M.). 29:85-133.
- Green N.M. 1990. Avidin and streptavidin. *Methods Enzymol.* 184:51-67.
- Guillen-Navarro, K., S. Encarnacion, M.F. Dunn. 2005. Biotin biosynthesis, transport and utilization in rhizobia. *FEMS Microbiol Lett.* May 15;246(2):159-65. Review.
- Gyorgy, P., C.S. Rose, R. E. Eakin, E.E. Snell, and R.J. Williams. 1941. Egg-white injury as the result of nonabsorption or inactivation of biotin. *Science.* 93:477-478.
- Hendrickson, W.A., A. Pahler, J.L. Smith, Y. Satow, E.A. Merritt and R.P. Phizackerley. 1989. Crystal structure of core streptavidin determined from multiwavelength anomalous diffraction of synchrotron radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Apr;86(7):2190-4.
- Hennecke, H. 1990. Nitrogen fixation genes involved in the Bradyrhizobium japonicum-soybean symbiosis. *FEBS Lett.* Aug 1;268(2):422-6. Review.
- Hertz, R., and W. H. Sebrell. 1942. Occurrence of avidin in the oviduct and secretions of the genital tract of several species. *Science.* 96:257.
- Hnatowich D.J., B. Fritz, F. Virzi, G. Mardirossian, and M. Rusckowski. 1993. Improved tumor localization with (strept)avidin and labeled biotin as a substitute for antibody. *Nucl Med Biol.* Feb;20(2):189-95.

- Hnatowich, D.J., F. Virzi, and M. Rusckowski. 1987. Investigations of avidin and biotin for imaging applications. *J. Nucl. Med.* Aug;28(8):1294-302.
- Hytönen, V.P., O.H. Laitinen, A. Grapputo, A. Kettunen, J. Savolainen, N. Kalkkinen, A.T. Marttila, H.R. Nordlund, T.K. Nyholm, G. Paganelli, and M.S. Kulomaa. 2003. Characterization of poultry egg-white avidins and their potential as a tool in pretargeting cancer treatment. *Biochem J.* May 15;372(Pt 1):219-25.
- Hytonen, V.P., J.A. Maatta, H. Kidron, K.K. Halling, J. Horha, T. Kulomaa, T.K. Nyholm, M.S. Johnson, T.A. Salminen, M.S. Kulomaa, and T.T. Airene. 2005. Avidin related protein 2 shows unique structural and functional features among the avidin protein family. *BMC Biotechnol.* Oct 7;5:28.
- Hytonen, V.P., Nyholm T.K., O.T. Pentikainen, J. Vaarno, E.J. Porkka, H.R. Nordlund, M.S. Johnson, J.P. Slotte, O.H. Laitinen, and M.S. Kulomaa. 2004. Chicken avidin-related protein 4/5 shows superior thermal stability when compared with avidin while retaining high affinity to biotin. *J. Biol. Chem.* Mar 5;279(10):9337-43.
- Jones, P.D., and M.H. Briggs. 1962. The distribution of avidin. *Life Sci.* Nov;11:621-3.
- Keinänen, R.A., M.L. Laukkanen, and M.S. Kulomaa. 1988. Molecular cloning of three structurally related genes for chicken avidin. *J. Steroid Biochem.* 30(1-6):17-21.
- Keinanen, R.A., M.J. Wallen, P.A. Kristo, M.O. Laukkanen, T.A. Toimela, M.A. Helenius, and M.S. Kulomaa. 1994. Molecular cloning and nucleotide sequence of chicken avidin-related genes 1-5. *Eur J Biochem.* Mar1;220(2):615-21.
- Knox, S.J., M.L. Goris, M. Tempero, P.L. Weiden, L. Gentner, H. Breitz, G.P. Adams, D. Axworthy, S. Gaffigan, K. Bryan, D.R. Fisher, D. Colcher, I.D. Horak, and L.M. Weiner. 2000. Phase II trial of yttrium-90-DOTA-biotin pretargeted by NR-LU-10 antibody/streptavidin in patients with metastatic colon cancer. *Clin Cancer Res.* Feb;6(2):406-14.
- Korpela, J.K., Kulomaa M.S., H.A. Elo, and P.J. Tuohimaa. 1981. Biotin-binding proteins in eggs of oviparous vertebrates. *Experientia.* Oct 15;37(10):1065-6.
- Kunnas, T.A., M.J. Wallen, M.S. Kulomaa. 1993. Induction of chicken avidin and related mRNAs after bacterial infection. *Biochim Biophys Acta.* Dec14;1216(3):441-5.
- Laitinen, O.H., V.P. Hytonen, M.K. Ahlroth, O.T. Pentikainen, C. Gallagher, H.R. Nordlund, V. Ovod, A.T. Marttila, E. Porkka, S. Heino, M.S. Johnson, K.J. Airene, and M.S. Kulomaa. 2002. Chicken avidin-related proteins show altered biotin-binding and physico-chemical properties as compared with avidin. *Biochem J.* May 1;363(Pt 3):609-17.
- Laitinen, O.H., H.R. Nordlund, V.P. Hytönen, S.T. Uotila, A.T. Marttila, J. Savolainen, K.J. Airene, O. Livnah, E.A. Bayer, M. Wilchek, and M.S. Kulomaa. 2003. Rational design of an active avidin monomer. *J Biol Chem.* Feb7;278(6):4010-4.
- Laitinen O.H., V.P. Hytonen, H.R. Nordlund, and M.S. Kulomaa. 2006. Genetically engineered avidins and streptavidins. *Cell Mol Life Sci.* Dec;63(24):2992-3017. Review.
- Langer R. 1998. Drug delivery and targeting. *Nature.* Apr 30;392(6679 Suppl):5-10. Review
- Livnah, O., E.A. Bayer, M. Wilchek, and J.L. Sussman. 1993. Three-dimensional structures of avidin and the avidin-biotin complex. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A.* Jun 1;90(11):5076 - 5080.
- Lundblad R.L., and R.A. Bradshaw. 1997. Applications of site-specific chemical modification in the manufacture of biopharmaceuticals: I. An overview. *Biotechnol Appl Biochem.* Dec;26 ( Pt 3):143-51. Review.

- Mandella R.D., H.W. Meslar, and H.B. White 3rd. 1978. Relationship between biotin-binding proteins from chicken plasma and egg yolk. *Biochem J.* Nov 1;175(2):629-33.
- Marquet, A., B.T. Bui, and D. Florentin. 2001. Biosynthesis of biotin and lipoic acid. *Vitam Horm.*;61:51-101. Review.
- Marttila, A.T., V.P. Hytönen, O.H. Laitinen, E.A. Bayer, M. Wilchek, and M.S. Kulomaa. 2003. Mutation of the important Tyr-33 residue of chicken avidin: functional and structural consequences. *Biochem J* Jan 15;369(Pt 2):249-54.
- Meslar, H.W., S.A. Camper, and H.B. White 3rd. 1978. Biotin-binding protein from egg yolk. A protein distinct from egg white avidin. *J. Biol. Chem.* Oct 10;253(19):6979-82.
- Meyer, D.L., J. Schultz, Y. Lin, A. Henry, J. Sanderson, J.M. Jackson, S. Goshorn, A.R. Rees, and S.S. Graves. 2001. Reduced antibody response to streptavidin through site-directed mutagenesis. *Protein Sci.* Mar;10(3):491-503.
- Nordlund, H.R., V.P. Hytonen, J. Horha, J.A. Maatta, D.J. White, K. Halling, E. Porkka, J.P. Slotte, O.H. Laitinen, and M.S. Kulomaa. 2005. Tetravalent single chain avidin: From subunits to protein domains via circularly permuted avidins. *Biochem J.* Dec 15;392(Pt 3):485-91.
- Nordlund, H.R., V.P. Hytönen, O.H. Laitinen, and M.S. Kulomaa. 2005. Novel avidin-like protein from a root nodule symbiotic bacterium, *Bradyrhizobium japonicum*. *J Biol Chem.* Apr 8;280(14):13250-5.
- Nordlund, H.R., O.H. Laitinen, V.P. Hytönen, S.T. Uotila, E. Porkka, and M.S. Kulomaa. 2004. Construction of a dual chain pseudotetrameric chicken avidin by combining two circularly permuted avidins. *J Biol Chem.* Aug 27;279(35):36715-9.
- Nordlund, H.R., O.H. Laitinen, S.T. Uotila, T. Nyholm, V.P. Hytönen, J.P. Slotte, and M.S. Kulomaa. 2003. Enhancing the thermal stability of avidin. Introduction of disulfide bridges between subunit interfaces. *J Biol Chem.* Jan 24;278(4):2479-83.
- Paganelli, G., C. Grana, M. Chinol, M. Cremonesi, C. De Cicco, F. De Braud, C. Robertson, S. Zurrada, C. Casadio, S. Zoboli, A.G. Siccardi, and U. Veronesi. 1999. Antibody-guided three-step therapy for high grade glioma with yttrium-90 biotin. *Eur. J. Nuc.l Med.* Apr;26(4):348-57.
- Paganelli G., P. Magnani, F. Zito, E. Villa, F. Sudati, L. Lopalco, C. Rossetti, M. Malcovati, F. Chiolerio, E. and Seccamani. 1991. Three-step monoclonal antibody tumor targeting in carcinoembryonic antigen-positive patients. *Cancer Res.* Nov 1;51(21):5960-6.
- Paganelli, G., P. Riva, G. Deleide, A. Clivio, F. Chiolerio, G.A. Scassellati, M. Malcovati, and A.G. Siccardi. 1988. In vivo labelling of biotinylated monoclonal antibodies by radioactive avidin: a strategy to increase tumor radiolocalization. *Int J Cancer Suppl.*;2:121-5.
- Pan, T., and O.C. Uhlenbeck. 1993. Circularly permuted DNA, RNA and proteins--a review. *Gene.* Mar 30;125(2):111-4. Review.
- Pazy, Y., T. Kulik, E.A. Bayer, M. Wilchek, and O. Livnah. 2002. Ligand exchange between proteins. Exchange of biotin and biotin derivatives between avidin and streptavidin. *J Biol Chem.* Aug 23;277(34):30892-900.
- Pennington, P., E.E. Snell, and R.E. Eakin. 1942. Crystalline avidin. *J. Amer. Chem. Soc.* 64:469.
- Pugliese, L., A. Coda, M. Malcovati, and M. Bolognesi. 1993. Three-dimensional structure of the tetragonal crystal form of egg white avidin in its functional complex with biotin at 2.7 Å resolution. *J Mol Biol.* Jun 5;231(3):698-710.

- Reardan, D.T., C.F. Meares, DA. Goodwin, M. McTigue, G.S. David, MR. Stone, JP. Leung, RM. Bartholomew, and J.M. Frincke. 1985. Antibodies against metal chelates. *Nature*. Jul 18-24;316(6025):265-8.
- Reiter, Y., and I. Pastan. 1996. Antibody engineering of recombinant Fv immunotoxins for improved targeting of cancer: disulfide stabilized Fv immunotoxins. *Clin Cancer Res*. Feb;2(2):245-52. Review.
- Rodriguez-Melendez R, and J. Zempleni. 2003. Regulation of gene expression by biotin (review). *J Nutr Biochem*. Dec;14(12):680-90. Review.
- Rosano C., P. Arosio, and M. Bolognesi. 1999. The X-ray three-dimensional structure of avidin. *Biomol Eng*. Dec 31;16(14):5-12.
- Rosebrough, S.F., and D.F. Hartley. 1996. Biochemical modification of streptavidin and avidin: in vitro and in vivo analysis. *J. Nucl. Med*. Aug;37(8):1380-4.
- Rosebrough, S.F. 1993. Pharmacokinetics and biodistribution of radiolabeled avidin, streptavidin and biotin. *Nucl Med Biol*. Jul;20(5):663-8.
- Sakahara, H., and T. Saga. 1999. Avidin-biotin system for delivery of diagnostic agents. *Adv. Drug. Deliv. Rev*. Apr 5;37(13):89-101.
- Samols, D., C.G. Thornton, V.L. Murtif, G.K. Kumar, F.C. Haase, and H.G. Wood. 1988. Evolutionary conservation among biotin enzymes. *J. Biol Chem*. May 15;263(14):6461-4. Erratum in: *J Biol Chem* 1988 Sep 5;263(25):12792.
- Savage, M. D., G Mattson, S. Desai, G. W. Nielander, S. Morgansen, and E. J Conklin. 1992. Avidin Biotin Chemistry: a Handbook. Rockford, IL: Pierce Chemical Co. 4 pp.
- Schechter, B., R. Silberman, R. Arnon, and M. Wilchek. 1990. Tissue distribution of avidin and streptavidin injected to mice. Effect of avidin carbohydrate, streptavidin truncation and exogenous biotin. *Eur J Biochem*. Apr 30;189(2):327-31.
- Seshagiri, P.B., and P.R. Adiga. 1987. Identification and molecular characterisation of a biotin-binding protein distinct from avidin of chicken egg white and comparison with yolk biotin-binding protein. *Biochim Biophys Acta*. Dec 7;926(3):321-30.
- Steinitz, F. 1898. Ueber das Verhalten phosphorhaltiger Eiweisskörper im Stoffwechsel. *Arch. ges. Physiol*. 75.
- Streaker, E.D., and D. Beckett. 1998. A map of the biotin repressor-biotin operator interface: binding of a winged helix-turn-helix protein dimer to a forty base-pair site. *J Mol Biol*. May 15;278(4):787-800.
- Streit, W.R., and P. Entcheva. 2003. Biotin in microbes, the genes involved in its biosynthesis, its biochemical role and perspectives for biotechnological production. *Appl Microbiol Biotechnol*. Mar;61(1):21-31. Review.
- Subramanian, N., and P.R. Adiga. 1995. Simultaneous purification of biotin-binding proteins-I and -II from chicken egg yolk and their characterization. *Biochem J*. Jun 1;308 ( Pt 2):573-7.
- Tausig, F., and F.G. Wolf. 1964. Streptavidin--a substance with avidin-like properties produced by microorganisms. *Biochem Biophys Res Commun*. 14:205-9
- Weaver, L.M., F. Yu, E.S. Wurtele, and B.J. Nikolau. 1996. Characterization of the cDNA and gene coding for the biotin synthase of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*. Mar;110(3):1021-8.
- Weber, P.C., D.H. Ohlendorf, J.J. Wendoloski, and F.R. Salemme. 1989. Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin. *Science*. Jan 6;243(4887):85 - 88.

- Weiden, P.L., H.B. Breitz, O. Press, J.W. Appelbaum, J.K. Bryan, S. Gaffigan, D. Stone, D. Axworthy, D. Fisher, J. Reno. 2000. Pretargeted radioimmunotherapy (PRIT) for treatment of non-Hodgkin's lymphoma (NHL): initial phase I/II study results. *Cancer Biother Radiopharm.* Feb;15(1):15-29.
- West, S.A., E.T. Kiers, E.L. Simms, and R.F. Denison. 2002. Sanctions and mutualism stability: why do rhizobia fix nitrogen? *Proc. Biol. Sci.* Apr 7;269(1492):685-94.
- White, H.B. III, B.A. Dennison, M.A. Della Fera, C.J. Whitney, J.C. McGuire, H.W. Meslar, P.H. Sammelwitz. 1976. Biotin-binding protein from chicken egg yolk. Assay and relationship to egg-white avidin. *Biochem J.* Aug 1;157(2):395-400.
- White, H.B. III, and C.C. Whitehead. 1987. Role of avidin and other biotin-binding proteins in the deposition and distribution of biotin in chicken eggs. Discovery of a new biotin-binding protein. *Biochem J.* Feb 1;241(3):677-84.
- Wilbur, D.S., P.M. Pathare, D.K. Hamlin, P.S. Stayton, R. To, L.A. Klumb, K.R. Buhler, and R.L. Vessella. 1999. Development of new biotin/streptavidin reagents for pretargeting. *Biomol Eng.* Dec 31;16(1-4):113-8. Review.
- Wilchek, M., and E.A. Bayer. 1989. Avidin-biotin technology ten years on: has it lived up to its expectations? *Trends Biochem Sci.* Oct;14(10):408-12. Review.
- Wilchek, M., and E.A. Bayer. 1990. Introduction to avidin-biotin technology. *Methods Enzymol.*;184:5-13.
- Wilchek, M., and E.A. Bayer. 1999. Foreword and introduction to the book (strept)avidin-biotin system. *Biomol Eng.* Dec 31;16(1-4):1-4. Review.
- Yao, Z., M. Zhang, H. Sakahara, Y. Nakamoto, T. Higashi, S. Zhao, N. Sato, Y. Arano, and J. Konishi. 1999. The relationship of glycosylation and isoelectric point with tumor accumulation of avidin. *J. Nucl. Med.* Mar;40(3):479-83.
- Yao, Z., M. Zhang, H. Sakahara, T. Saga, Y. Arano, and J. Konishi. 1998. Avidin targeting of intraperitoneal tumor xenografts. *J Natl Cancer Inst.* Jan 7;90(1):25-9.
- Yoshikawa T., and W.M. Pardridge. 1992. Biotin delivery to brain with a covalent conjugate of avidin and a monoclonal antibody to the transferrin receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* Nov;263(2):897-903.
- Zhang, S., I. Sanyal, G.H. Bulboaca, A. Rich, and D.H. Flint. 1994. The gene for biotin synthase from *Saccharomyces cerevisiae*: cloning, sequencing, and complementation of *Escherichia coli* strains lacking biotin synthase. *Arch Biochem Biophys.* Feb 15;309(1):29-35.

## **LIITE A: HIGH PERFORMANCE LIQUID CROMATOGRAPHY (HPLC)**

### **Materiaalit ja metodit**

Puhdistettu rhizavidiini analysoitiin geelifiltraatiolla käyttäen Shimanzu HPLC-laitetta varustettuna Superdex 200 HR 10/30 pylväällä (Amerhan Biosciences). Nestefaasina käytettiin 50 mM natriumkarbonaattipuskuria (pH 11), jonka NaCl konsentraatio oli säädetty 150 mM:ksi. Pylväs kalibroitiin käyttämällä markkeriseosta, joka sisälsi thyroglobuliinia, IgG:tä, ovalbumiinia, myoglobiinia ja vitamiini B<sub>12</sub>:tä (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) ja naudan seerumin albumiinia (Roche Diagnostics) molekyylimassa standardeina. Geelifiltraatio suoritettiin D-biotiinin kanssa ja ilman sitä.

### **Tulokset**

Geelifiltraatiokromatografiassa tetrameerinen rhizavidiini havaittiin D-biotiinin puuttuessa yhtenä piikkinä 54 kDa:n kohdalla. D-biotiinin kanssa rhizavidiini eluoitui 31 kDa:n kokoisena.



## LIITE B: DIFFERENTIAL SCANNING CALORIMETRY (DSC)

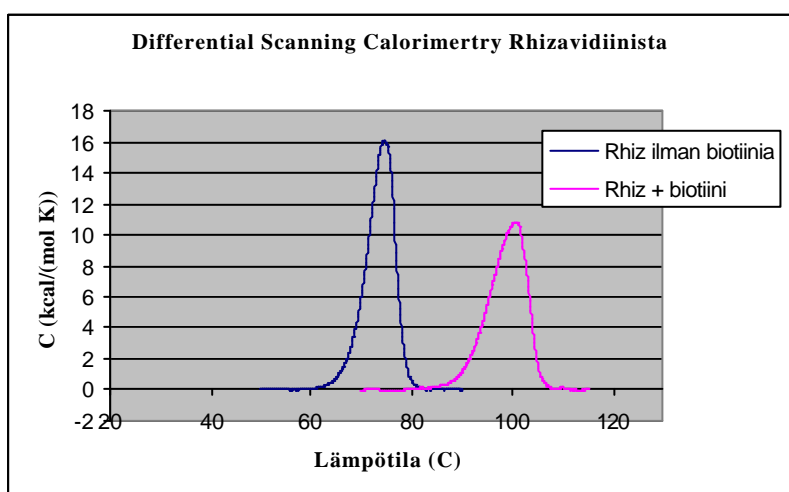
### Materiaalit ja metodit

DSC-laitteen kontrollisolu täytettiin samalla puskurilla, johon rhizavidiini oli liuotettu (0.1 M etikkahappo). Rhizavidiini (4,7  $\mu$ M) analysoitiin DSC:lla biotiinin (12 mM) kanssa sekä ilman biotiinia. Avidiinia liuotettuna 0.1 M etikkahappoon käytettiin kontrollina määrittämisessä. Termogrammit taltioitiin lämpötilan funktiona lämpötilojen 25 °C ja 130 °C välillä nopeudella 55.6 °C/h.

### Tulokset

Yhdiste	$T_m$ (°C)
Rhizavidiini	74,75
Rhizavidiini + biotiini	100,50

Avidiinikontrollien mittaustulokset 0,1 M etikkahapossa näyttivät hyvin samankaltaisilta kuin aiemmin natriumfosfaattipuskurissa (50 mM, pH 7,0) tehdyt mittaukset vaikka selviä mittaustuloksia etikkahapossa ei saatu. Aiemmin raportoidut  $T_m$ -arvot avidiinille natriumfosfaattipuskurissa ovat 83 °C ilman biotiinia ja 117 °C biotiinin kanssa (Gonzales ym., 1999).



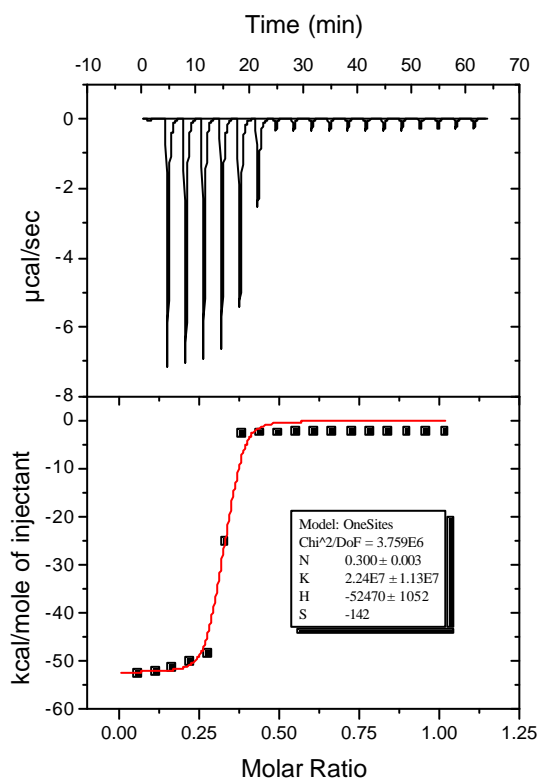
Kuva B1: Differential scanning calorimetry rhizavidiinista ilman biotiinia sekä biotiinin kanssa.

## LIITE C: ISOTHERMAL SCANNING CALORIMETER (ITC)

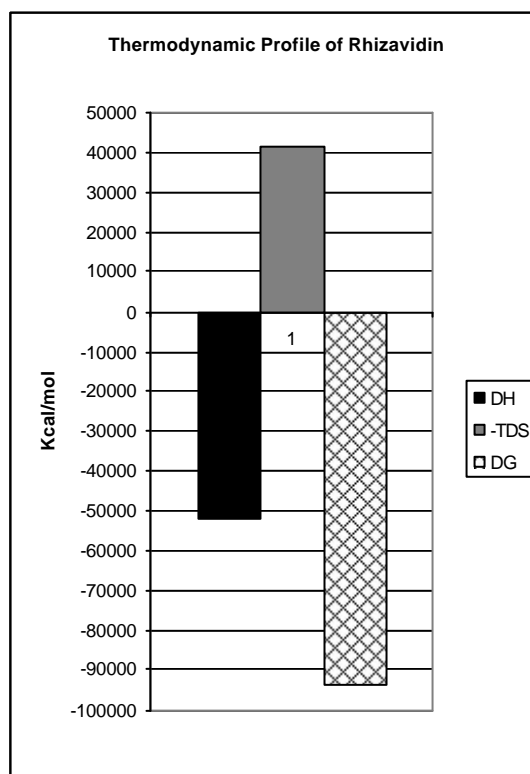
### Materiaalit ja metodit

Rhizavidiini-biotiini interaktion tutkimisessa käytettiin VP-ITC (Microcal®) –laitetta. 0.1 M etikkahapossa oleva rhizavidiini liuotettiin natriumvetyfosfaattipuskuriin (50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_3$ , 100 mM NaCl) pitoisuuteen 0.54 mg/ml. D-biotiini (0.4 mM) liuotettiin puskuriin, joka sisälsi 0.1 mM etikkahappoa ja natriumfosfaattipuskuria (50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_3$ , 100 mM NaCl) samassa suhteessa kuin rhizavidiininäyte. Avidiinia käytettiin kontrollina. ITC-laitteen referenssisolu täytettiin samalla etikkahapon ja natriumfosfaattipuskurin sekoituksella kuin, mihin proteiinit ja D-biotiini oli liuotettu. Mittaukset tehtiin 25 °C käyttämällä 10  $\mu\text{l}$ :n titraatiotilavuuksia (510 rev./min).

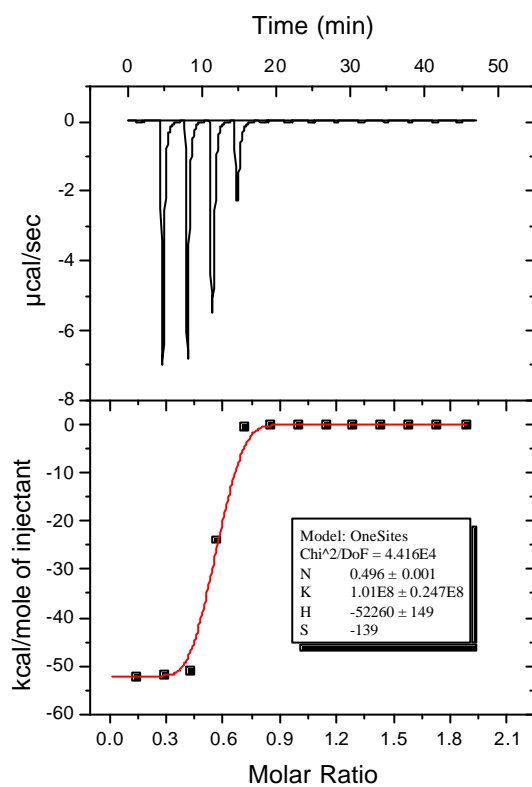
### Tulokset



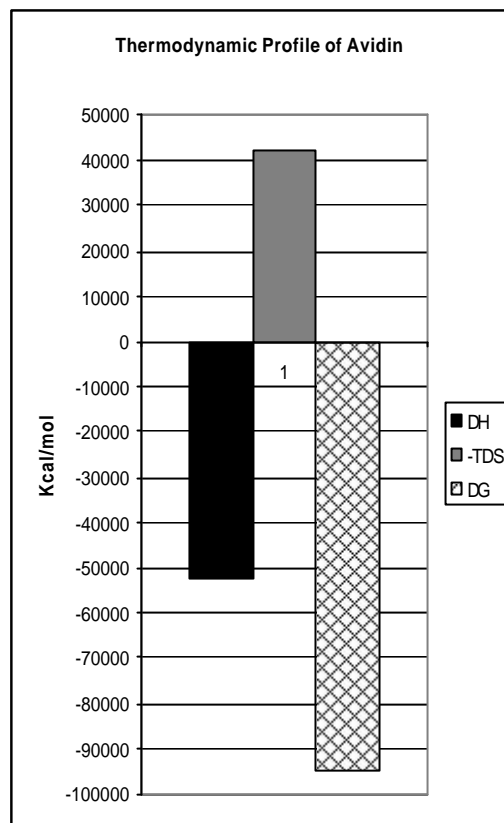
Kuva C1: Kalorimertinen titraatiokäyrä rhizavidiinista



Kuva C2: Rhizavidiinin termodynaaminen profiili



Kuva C3: Kalorimetrinen titraatiokäyrä avidiinista



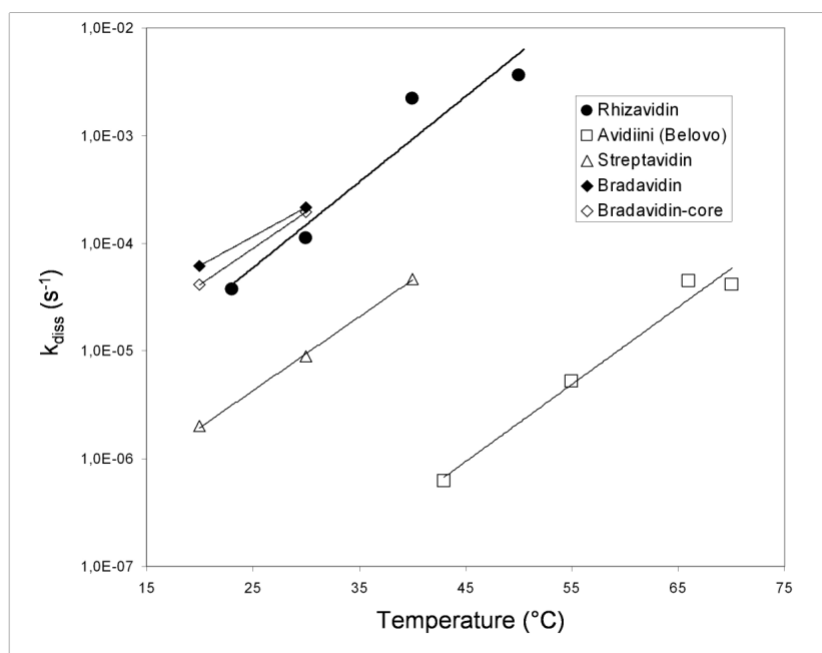
Kuva C4: Avidiinin termodynaaminen profiili

## LIITE D: RADIOBIOTIINIMÄÄRITYS

### Materiaalit ja menetit

Rhizavidiinin dissosiaatiokerroin D-8,9- $^3\text{H}$ -biotiinille määritettiin radiobiotiinikokeella. D-8,9- $^3\text{H}$ -biotiini (21  $\mu\text{M}$ , Amersham) laimennettiin pitoisuuteen 10 nM ja inkuboitii 20 minuuttia 1  $\mu\text{M}$  rhizavidiinin kanssa. Dissosiaatioreaktio käynnistettiin lisäämällä ei-radioaktiivista biotiinia (loppukonsentraatioltaan 50  $\mu\text{M}$ ) seokseen. Sitoutumaton biotiini erotettiin proteiini-ligandi komplekseista useaan otteeseen joko ultrafiltraatiolla 30 000 MW filterin läpi (Microcon-30, amicon., Beverly, MA) tai proteiini-ligandi kompleksin sinkkisulfaatti saostuksella (0.2 M sinkkisulfaatti ja 0.2 M NaOH). Filtraatin tai supernatantin radioaktiivisuus määritettiin tuikelaskimella (LS-7000, Beckman, fullerton, CA). Määritykset tehtiin lämpötiloissa 23, 30, 40 ja 50 °C. (Klumb, Chu ja Stayton 1998).

### Tulokset



Kuva D1: Dissosiaatiokertoimet määritettiin kuvaan lämpötilan funktiona ja verrattiin muihin avidiinin sukulaisproteiineihin. Arvot streptavidiinille on reportoitu Klumb ym. 1998 kokeessa ja arvot bradavidiinille Norlund ym. 2005 tekemässä kokeessa. Diagrammin y-akselin asteikko on logaritminen.

Taulukko D1: Rhizavidiinille määritetyt dissosiaatiokertoimet d-[8,9- $^3\text{H}$ ]biotiinilla

Lämpötila (°C)	23	30	40	50
Dissosiaatiokerroin ( $\text{s}^{-1}$ )	$3,71 \times 10^{-5}$	$1,11 \times 10^{-4}$	$2,22 \times 10^{-3}$	$3,60 \times 10^{-3}$

**LIITE E: LIUKOKSET, REAGENSIT JA KOKOSTANDARDIT****TAE-PUSKURI:**

0.04 M Tris-asetatti

1 mM ADTA

**10 x DNA LASTAUSPUSKURI:**

5 mg bromofenolisininen

5 mg ksyleenisyanoli

300 mg Ficoll 400

Liuoksen tilavuus täytetään vedellä 1 ml:ksi

**S.O.C.-LIUOS:**

2.0 % Bacto-trytone

0.5 % Yeast-extract

10 mM M NaCl

2.5 mM KCl

10 mM MgCl<sub>2</sub>

10 mM MgSO<sub>2</sub>

20 mM glukoosi

**LB-LIUOS:**

10 g Bacto-Tryptone

5 g Bacto-yeast extract

10 g NaCl

Liuoksen tilavuus täytetään vedellä 1 l:ksi.

**LB-AGAR:**

Valmistetaan kuten nestemäinen LB-liuos, mutta seokseen lisätään 15 grammaa Bacto-agaria. Agar sulatetaan liuokseen (121 °C, 20min) ja liuos maljataan. Antibiootit lisätään ennen maljausta jäähtyneeseen (48 C°) agarliuokseen haluttuun konsentraatioon.

**pH 11 –PUSKURI:**50 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 

1 M NaCl

**HILLO I –PUSKURI:**

50 mM Tris-HCL (pH 8)

1 % Triton-X100

2mM EDTA

150 mM NaCl

**PBS:**

276 mM NaCl

16 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 

10.7 mM KCL

2.9 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ **pH 4 –PUSKURI:**50 mM  $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ 

0,5 M NaCl

**SDS-PAGE NÄYTEPUSKURI (2X):**

0.5 ml 0,5 M tris-HCL (pH 6,8)

0.8 ml 10 % SDS

0.4 ml glyseroli

0.04 ml 0,2 % bromifenolisinen

0.2 ml  $\beta$ -merkapttoetanoli8.06 ml  $\text{H}_2\text{O}$ **SDS-PAGE AJOPUSKURI (1x):**

3.03 g Tris

14.4 g glysiini

1.0 g SDS

Liuksen tilavuus täytetään vedellä 1 l:ksi.

**COOMASSIE BRILLIANT BLUE –VÄRJÄYSLIUOS:**

0.05 % Coomassie Brilliant Blue R-250

40 % etanoli

10 % etikkahappo

50 % H<sub>2</sub>O

**VÄRISPOISTO (“DESTAINING”) -LIUOS:**

40 % etanoli

10 % etikkahappo

50 % H<sub>2</sub>O

**SDS-SIIRTOPUSKURI (1x):**

3.03 g Tris

14.4 g glysiini

20 % metanoli

Liuksen tilavuus täytetään vedellä 1 l:ksi.

**PONCEAU S –VÄRJÄYSLIUOS:**

0.05 % Ponceau S

1 % etikkahappo (97 – 100 %)

99 % H<sub>2</sub>O

**PBS-TWEEN (10x):**

0.1 M PBS

0.05 % Tween 20

**DEA-PUSKURI:**

1 M dietanolamiini pH 9.8

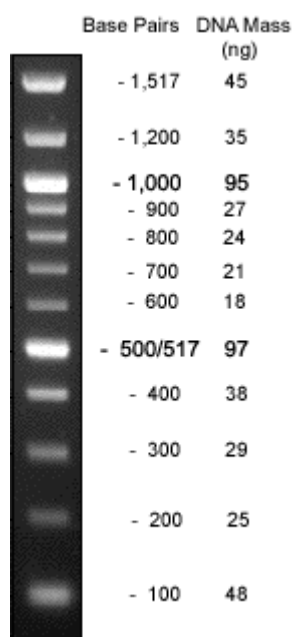
0.5 mM MgCl<sub>2</sub>

100 bp:n DNA-KOKOSTANDARDI (BIOLABS):

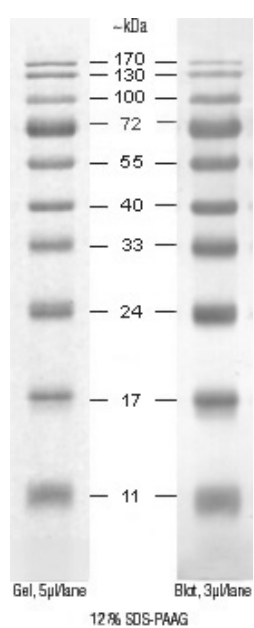
1  $\mu$ l DNA-ladder (Biolabs)

1  $\mu$ l 6 x Loading Dye (Biolabs)

4  $\mu$ l H<sub>2</sub>O



Kuva E1: 100 bp:n DNA-kokostandardi (Biolabs)



Kuva E2: Pageruler™ prestained protein ladder (Fermentas)